

На правах рукописи

Айдаева Салихат Шамиловна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭМПИЕМЕ
ПЛЕВРЫ НА ФОНЕ СТИМУЛЯЦИИ АДГЕЗИОГЕНЕЗА
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.2. – Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России); Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель – доктор медицинских наук, доцент Калашникова Светлана Александровна

Официальные оппоненты:

Самсонова Мария Викторовна

доктор медицинских наук, ФГБУ "Научно-исследовательский институт пульмонологии" ФМБА России, заведующий лабораторией патологической анатомии

Чирский Вадим Семенович

доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, заведующий кафедрой патологической анатомии

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Саратов

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.005.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; и на сайте <http://www.volgmed.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <https://www.volgmed.ru/ru/dsovet/thesis/972/>)

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года.

Учёный секретарь

диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Григорьева Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Эмпиема плевры (ЭП) представляет собой гнойное воспаление в полости плевры, характеризующееся скоплением гнойного экссудата в плевральной полости, увеличивающий риск рецидивов и являющихся причиной развития дыхательной недостаточности [Косарева П.В. с соавт., 2016; Самсонова М.В., Черняев А.Л., 2019].

Согласно действующей клинико-морфологической классификации в развитии ЭП выделяют три стадии: экссудативную, фибринозно-гнойную и стадию организации. Патоморфологические изменения при хронической ЭП отличаются от таковых при остром процессе. Так, при хронической ЭП вовлекаются все слои плевры, ткани легкого и органы средостения, что приводит к значительным функциональным нарушениям [Плеханов А.Н., Николайчук И.В., 2012; Чирский В.С., 2020]. Для ликвидации остаточных плевральных полостей предложено множество способов, как оперативных (торакопластика), так и относительно консервативных (олеоторакс, пломбировка полостей с использованием синтетических материалов, химический плевродез) [Корымасов Е.А., 2017; Strange C., Sahn S.A., 1999]. Обращает на себя тот факт, что при применении данных методик в доступной литературе отсутствует характеристика патоморфоза при хронической ЭП.

Степень разработанности темы

Одним из современных направлений лечения у больных при наличии остаточных полостей является биологическое потенцирование адгезиогенеза, с целью заполнения полости эмпиемы. Не менее перспективным методом стимуляции регенераторных процессов является введение богатой тромбоцитами плазмы (PRP) – плазмолифтинг [Ахмеров Р.Р., 2011]. Клетки соединительной ткани - фибробласты, начинают синтезировать коллаген и эластин, формирующие зрелые спайки. Параллельно происходит стимуляция макрофагов, что активизирует клетки соединительной ткани посредством собственной плазмы.

Данное морфологическое исследование позволит охарактеризовать изменения, происходящие в плевральной полости при применении плазмы, обогащенной тромбоцитами, аутологичной жировой ткани (АЖТ) и оценить возможность сочетанного применения данных биологических субстратов для ликвидации остаточных полостей при хронической ЭП.

Цель исследования: охарактеризовать морфологические изменения при хронической эмпиеме плевры на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза.

Задачи исследования:

1. Определить морфологические признаки развития хронической эндогенной интоксикации (ЭИ) в органах-мишенях (сердце, легкие, печень, почки) при моделировании хронической ЭП и оценить выраженность изменений биохимических маркеров в исследуемых группах.

2. Оценить макро- и микроскопические изменения в плевральной полости при хронической ЭП.

3. Выявить морфологические изменения, возникающие при биологическом потенцировании адгезиогенеза, путем введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, аутологичной жировой ткани и их сочетанного применения.

4. Определить микробную обсемененность и структурно-пространственную организацию экссудата, полученного из плевральной полости крыс с хронической ЭП и при биологической стимуляции адгезиогенеза.

5. Установить роль апоптоза фибробластов в механизме обратного развития спаек при экспериментальной хронической ЭП на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза по экспрессии иммуногистохимических маркеров: caspasa-3, активированной caspasa-3, NF-kB p65.

6. Провести сравнительный анализ эффективности и безопасности способов биологического потенцирования адгезиогенеза при экспериментальной хронической ЭП с использованием иммуногистохимических маркеров (NF-kB p65, FGF-1).

7. Провести корреляционный анализ для выявления взаимосвязей между маркерами хронической ЭИ, уровнем микробной обсемененности и показателями структурно-пространственной организации экссудата, ИГХ-маркерами пролиферации и апоптоза фибробластов при хронической ЭП на фоне биологического потенцирования адгезиогенеза.

Научная новизна работы

При экспериментальном исследовании получены новые данные о морфологических изменениях в плевральной полости при хронической ЭП на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза, включающей следующую интеллектуальную собственность:

Впервые разработан и воспроизведен в эксперименте способ моделирования остаточных плевральных полостей (Рационализаторское предложение №6 от 22.01.2018 г.).

При применении предложенного «Способа биологической стимуляции адгезиогенеза в плевральной полости при остаточных полостях после перенесённых нагноительных заболеваний лёгких и плевры» (Патент на изобретение №2716451, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11.03.2020 г.) впервые получены новые данные о морфологических изменениях остаточной полости эмпиемы при потенцировании спайкообразования. Заявляемый способ позволяет стимулировать адгезиогенез в плевральной полости при нагноительных заболеваниях лёгких и плевры путем заполнения остаточной плевральной полости АЖТ совместно с методикой плазмолифтинга (PRP) с последующей трансформации их в соединительную ткань.

Впервые в патогенезе спайкообразования плевральной полости при экспериментальной хронической эмпиеме плевры выявлен апоптоз-опосредованный механизм запуска обратного развития спаек, заключающийся в увеличении экспрессии маркеров апоптоза фибробластов, формирующих зрелые спайки, что определило возможность и необходимость стимуляции адгезиогенеза при хронической ЭП.

В эксперименте впервые показана прогностическая ценность иммуногистохимических маркеров: NF-kB p65, FGF-1 для оценки риска развития тотального спайкообразования в плевральной полости при биологическом потенцировании адгезиогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные расширяют современные представления о возможности биологической стимуляции адгезиогенеза при хронической ЭП.

В клиническую практику внедрено использование технологии стимуляции адгезиогенеза путем сочетанного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами и АЖТ для ликвидации остаточной полости при хронической ЭП. Диссертация соответствует шифру научной специальности 3.3.2. - Патологическая анатомия согласно пунктам 3-4.

Диссертационное исследование выполнено в рамках государственного задания Минздрава России и НИОКТР 01201361380 от 01.02.2014 г. «Закономерности морфогенеза в норме, патологии и при влиянии дестабилизирующих факторов».

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на проведенном анализе, позволившем оценить актуальность и степень разработанности исследования. При планировании диссертации были определены: цель, задачи, материал, методы исследования, статистическая обработка результатов. Объектами исследования являлись белые нелинейные половозрелые крысы, которым была моделирована хроническая ЭП. Статистическая обработка результатов проведена с использованием современных компьютерных технологий.

Положения, выносимые на защиту

1. При хронической ЭП развивается эндогенная интоксикация, сопровождающаяся морфологическими изменениями в органах-мишенях (сердце, легкие, печень, почки) и увеличением показателей биохимических маркеров продуктов ПОЛ.

2. Морфологические проявления хронической ЭП характеризовались стадийностью изменений с последовательным развитием фибринозно-гнойного воспаления и репаративных процессов, сопровождающихся отграничением остаточной полости эмпиемы.

3. При введении плазмы, обогащенной тромбоцитами, аутологичной жировой ткани и их сочетанного применения при хронической ЭП происходит усиление адгезиогенеза, морфологическим проявлением которого является заполнение остаточной полости внутриплевральными спайками, при этом выраженность и сроки формирования зрелых спаек зависят от способа потенцирования.

4. Внутриплевральные сращения, формирующиеся на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза путем сочетанного введения плазмы, обогащенной тромбоцитами и аутологичной жировой ткани, подвергаются частичной редукции за счет активации механизма апоптоза.

5. Эффективность и оценка риска с точки зрения тотального заращения плевральной полости при различных способах биологического потенцирования

адгезиогенеза при хронической ЭП должна проводиться с использованием ИГХ-маркеров (NF-kB p65, FGF-1), увеличение экспрессии которых свидетельствует об усилении пролиферации фибробластов, стимуляции ангиогенеза и блокировании апоптоза.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты исследований докладывались и были обсуждены на V съезде Российского общества патологоанатомов (г. Челябинск, 2017); Международной научно-практической конференции «Инновации, технологии, наука» (г. Пермь, 2017); Научной конференции, посвященной 145-летию со дня рождения В.Н. Шевкуненко (г. Санкт-Петербург, 2017); XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (г. Петрозаводск, 2018); Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (г. Грозный, 2018); Международном симпозиуме хирургов и клинических анатомов «Proceedings of the 10th international symposium on clinical and applied anatomy (ISCAA)», (Moscow, 2018); Российском Сепсис Форуме «Современные технологии диагностики, лечения и профилактики в интенсивной терапии. Сепсис. Проблемы и современные решения» (г. Пятигорск, 2018); XVIII Международно-практической конференции «Фундаментальная наука и технологии – перспективные разработки» (North Charleston, USA, 2019); Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE» (г. Нижний Новгород, 2019), VIII Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» (г. Санкт-Петербург, 2019); XV Конгрессе Международной ассоциации морфологов (г. Ханты-Мансийск, 2020); XXI Международной научно-практической конференции «Fundamental and applied sciences today XXI» (North Charleston, USA, 2020); International Scientific Conference «SCIENTIFIC RESEARCH OF THE SCO COUNTRIES: SYNERGY AND INTEGRATION» (Пекин, Китай, 2020); а также на ежегодных конференциях научно-практического общества врачей-патологоанатомов Ставропольского края (г. Ставрополь, 2016-2020), и ежегодных итоговых научных конференциях Волгоградского государственного медицинского университета (г. Волгоград, 2016-2021).

Работа апробирована на расширенном заседании кафедры морфологии Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России от 11 июня 2020 г., протокол №11; на расширенном заседании кафедры анатомии человека федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13 мая 2021г., протокол №23.

Личный вклад автора

Планирование и проведение исследований, статистическая обработка полученных результатов, анализ и обобщение данных, подготовка публикаций.

Внедрение результатов исследования

Результаты выполненного исследования внедрены в учебный процесс кафедры морфологии, кафедры хирургических дисциплин ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «СтГМУ» Минздрава России, кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «ВолгГМУ».

Практические результаты исследования внедрены в лечебную работу: хирургического отделения №2 ГБУЗ СК «Городская клиническая больница» г. Пятигорска, хирургического торакального отделения ГБУЗ «Волгоградский областной клинический противотуберкулезный диспансер» г. Волгограда, туберкулезного легочно-хирургического отделения ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный противотуберкулезный диспансер», г. Пятигорска.

Результаты научно-исследовательской работы внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии Волгоградского государственного медицинского университета.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 24 научных работ, из которых 9 – в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, в том числе 5 – в журналах, индексируемых в базе Scopus. Получен 1 патент РФ на изобретения, 1 рационализаторское предложение.

Структуры и объем работы

Диссертация состоит из введения, главы обзора литературы, главы материал и методы исследования, глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и списка сокращений. Текст диссертации изложен на 225 страницах машинописного (компьютерного) текста, иллюстрирован 11 таблицами, 149 рисунками. Список литературы содержит 220 источников, из них 105 на русском языке и 115 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен **обзор литературы**, в котором рассматривается клинико-морфологическая характеристика эмпиемы плевры, современные методы стимуляции регенераторных процессов.

Глава 2 посвящена описанию **материала и методов исследования**. Объектом экспериментального исследования стали 450 белых половозрелых нелинейных крыс массой 180-210 г, в соответствии с протоколом исследований, которые не противоречили Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным. Исследование проводили в два этапа: моделирование хронической ЭП и биологическое стимулирование адгезиогенеза с использованием авторских методик. После моделирования хронической ЭП все животные были разделены на пять экспериментальных групп по 90 особей в каждой. В I группе (негативный контроль) животным лечение не проводилось, в остаточную плевральную полость вводили 1,0 мл стерильного физиологического раствора; во II группе (позитивный контроль) животным в плевральную полость

вводили раствор доксициклина (из расчета 20-40 мг/кг). Животным III опытной группы в плевральную полость вводили плазму, обогащенную тромбоцитами (PRP-технологии); в IV опытной группе использовали аутологичную жировую ткань (АЖТ); в V опытной группе применяли сочетанное использование PRP-технологии и АЖТ. Животных выводили из эксперимента на 10, 20 и 30 сут. Внутрплевральные спайки выделяли с сохранением точек фиксации (Воробьев А.А., Бебуришвили А.Г., 2001) и изготавливали серийные срезы на разных сроках эксперимента. Далее окрашивали их гематоксилином и эозином и по ван Гизону. При морфометрическом исследовании спаек определяли объемные доли (ОД): коллагеновых и эластических волокон, фибрина, клеточного состава спаек (лимфоциты, нейтрофильные лейкоциты, фибробласты) и ОД сосудистого русла (Автандилов Г.Г., 2002).

Биохимическая верификация маркеров хронической ЭИ включала определение веществ средней молекулярной массы (BCMM, у.е.), их олигопептидной фракции (мг/л), малонового диальдегида (МДА, ммоль/л) в сыворотке крови животных, выведенных из эксперимента.

Бактериологическое исследование экссудата при ЭП использовали для определения общей микробной обсемененности и микроорганизмов с различными ферментативными свойствами. Для определения структурно-пространственной организации фаций экссудата при ЭП использовали кристаллографическое исследование. По данным, полученным при морфометрии нативных препаратов рассчитывали коэффициент кристаллизации (К).

Иммуногистохимическое исследование проводили непрямым пероксидазным методом с использованием поликлональных кроличьих антител Anti-NF-kB p65 antibody (Abcam, Англия), Anti Caspase-3 antibody (Abcam, Англия) и Anti-aktive Caspase-3 antibody (Abcam, Англия) для определения апоптоза, а также Anti-FGF1 antibody (Abcam, Англия) для определения фактора роста фибробластов (FGF-1). Исследование микропрепаратов осуществляли с использованием микроскопа «LeicaDM 100» (Leica Mikrosystems GmbH, Герм) с цифровой фотокамерой. Выраженность экспрессии оценивали с помощью программы LAS Version 4.2.7 с последующим морфометрическим исследованием позитивно окрашенного материала.

Дизайн исследования представлен на рис.1.

Статистическая обработка проведена стандартными для медико-биологического исследования методами с использованием программных пакетов EXEL 7.0 (Microsoft, USA). Нормальность распределения проверяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, оценка достоверности данных, подчиняющихся нормальному распределению проводили с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Для корреляционного анализа был использован критерий Спирмена.

В главе 3, 4, 5, 6 представлены результаты собственных исследований.

При биохимическом определении маркеров ЭИ в крови установлено, что наибольшая выраженность ЭИ наблюдалась в группе НК, где животные не получали лечения (табл. 1). При морфологическом исследовании органов-мишеней были выявлены морфологические изменения, характеризующиеся

комплексом гемодинамических нарушений, приводящих к воспалительно-дистрофическим изменениям, которые не имели достоверных отличий в экспериментальных группах и не зависели от сроков эксперимента (рис. 2).

При **макроскопическом исследовании** плевральной полости при хронической ЭП на 10 сут во всех экспериментальных группах визуализировалась остаточная полость эмпиемы с различной степенью выраженности адгезиогенеза, которая была ограничена париетальным и висцеральным листками плевры, междолевой бороздой, нижней долей легкого и диафрагмой.

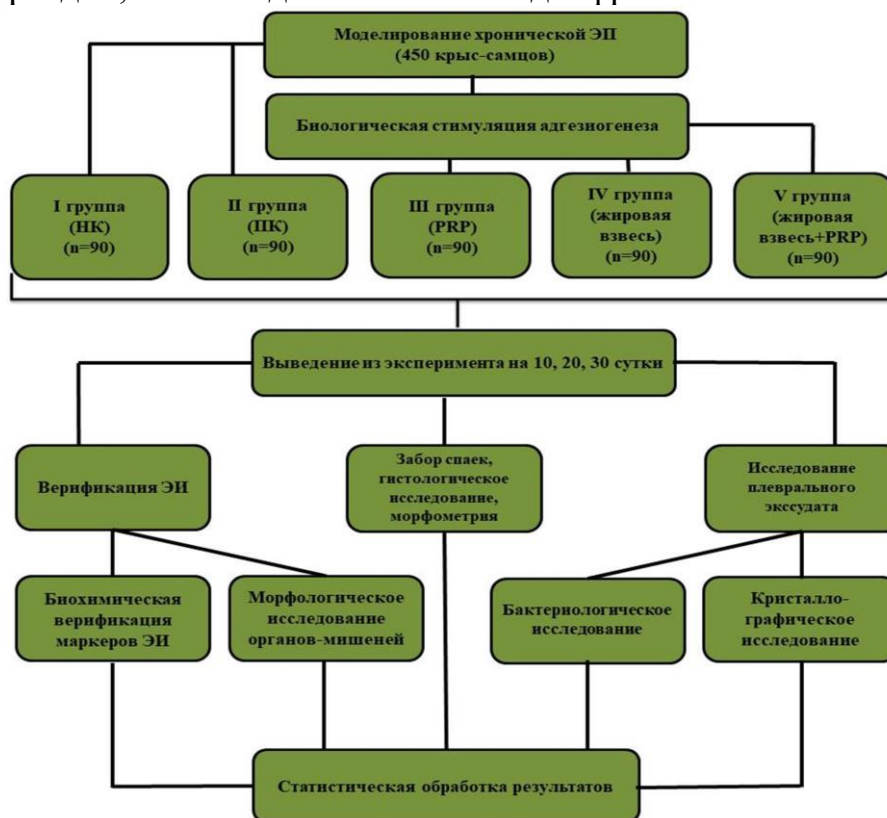


Рисунок 1 – Дизайн исследования при хронической эмпиеме плевры.

Наибольший объем остаточной полости зафиксирован в группе без лечения ($25,4 \pm 3,1 \text{ мм}^3$), в то время как в группе с сочетанным потенцированием адгезиогенеза этот показатель был достоверно ниже - $15,4 \pm 1,1 \text{ мм}^3$ ($p < 0,05$). В I группе остаточная полость была свободной от спаечного процесса и заполнена гнойным содержимым с пропитыванием обоих листков плевры и переходом на субплевральные области ткани легких. Висцеральная плевро утолщена до 1-1,5 мм, в толще которой определялись абсцессы диаметром до 3 мм. Во II группе определялось утолщение обоих листков плевры за счет отека, с очаговыми наложениями фибрина размерами от 3х4 мм до 4х5 мм (рис.3).

В III и IV экспериментальных группах картина была схожа: остаточная полость сужалась за счет формирования тонкостенных сращений, локализованных преимущественно в нижних отделах плевральной полости, а также в области междолевой борозды. Спайки хорошо васкуляризированы, что указывало на активный адгезиогенез. Гнойное содержимое определялось в небольшом количестве преимущественно в нижних отделах остаточной полости, а также единичные абсцессы размерами 3-4 мл плотной консистенции. Максимальное сокращение объема остаточной полости на этом сроке

зафиксировано в V опытной группе (сочетанное применение PRP-технологии и жировой взвеси) за счет формирования множественных плоскостных и единичных паутинных и пленчатых спаек.

Таблица 1

**Показатели выраженности эндогенной интоксикации
при хронической эмпиеме плевры в динамике эксперимента (M±m)**

Экспериментальные группы	Сроки эксперимента	ВСММ, усл. ед.	Олигопептиды, мг/л	МДА, нмоль/г
I группа (НК)	10 сут	0,54±0,04	273,53±26,81	12,41±0,95
	20 сут	0,50±0,05	269,41±30,72	11,93±1,53
	30 сут	0,47±0,06	257,33±36,93	10,07±2,32
II группа (ПК)	10 сут	0,31±0,04*	192,21±19,31*	9,89±0,81*
	20 сут	0,31±0,04*	179,62±16,67*	9,07±0,91*
	30 сут	0,26±0,09*	161,11±21,33	8,11±0,68
III группа (PRP)	10 сут	0,28±0,05*	169,19±18,27*	8,03±0,97*#
	20 сут	0,26±0,04*	154,23±17,71*	7,87±0,95*#
	30 сут	0,23±0,09*	143,17±19,07*	7,09±0,99*#
IV группа (АЖТ)	10 сут	0,27±0,05*	167,24±17,29*	7,56±0,87*#
	20 сут	0,23±0,04*	156,73±13,86*	7,01±0,95*#
	30 сут	0,21±0,09*	142,47±15,23*	6,13±0,99*#
V группа (PRP+ АЖТ)	10 сут	0,27±0,05*	166,98±12,54*#	7,16±0,87*#
	20 сут	0,23±0,04*	152,16±19,84*	6,34±0,95*#
	30 сут	0,20±0,09*	140,93±18,12*	5,86±0,99*#

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с группой НК ($p<0,05$);

- достоверность различий по сравнению с группой сравнения ($p<0,05$).

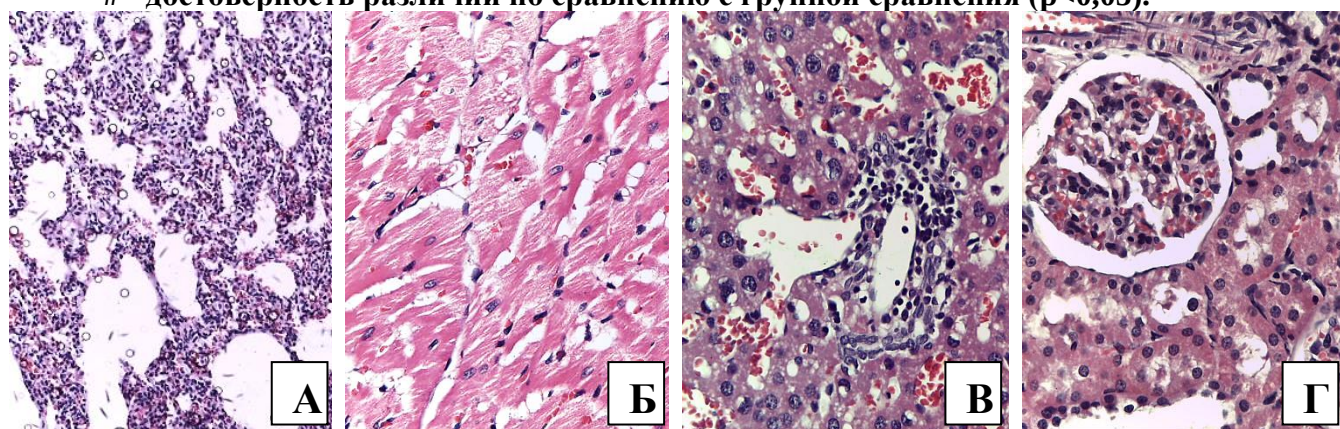


Рисунок 2 – Морфологические изменения органов-мишеней при хронической ЭП.

А – Утолщение межальвеолярных перегородок за счет полнокровия сосудов, диффузной лимфоцитарной инфильтрации и отека в легких крыс на фоне хронической эмпиемы плевры. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х100. Б – Выраженный интерстициальный отек миокарда крыс на фоне хронической эмпиемы плевры. В – Мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, полнокровие синусоидов, периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация на фоне хронической эмпиемы плевры. Г – Вакуольная дистрофия эпителия проксимальных и дистальных канальцев, полнокровие сосудов микроциркуляторного русла на фоне хронической ЭП. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.х400.

При сравнении морфологических изменений при хронической ЭП на 20 сут остаточная плевральная полость визуализировалась во всех экспериментальных группах с наибольшими показателями объема в группе без лечения ($24,2\pm2,3 \text{ мм}^3$) и при введении доксициклина ($23,4\pm2,1 \text{ мм}^3$). В группах с биостимуляцией

адгезиогенеза полость эмпиемы была сравнительно меньше, а у животных IV и V групп этот показатель был достоверно меньше, чем у животных НК и составлял $12,2 \pm 1,1 \text{ мм}^3$ и $10,3 \pm 0,9 \text{ мм}^3$ соответственно ($p < 0,05$).

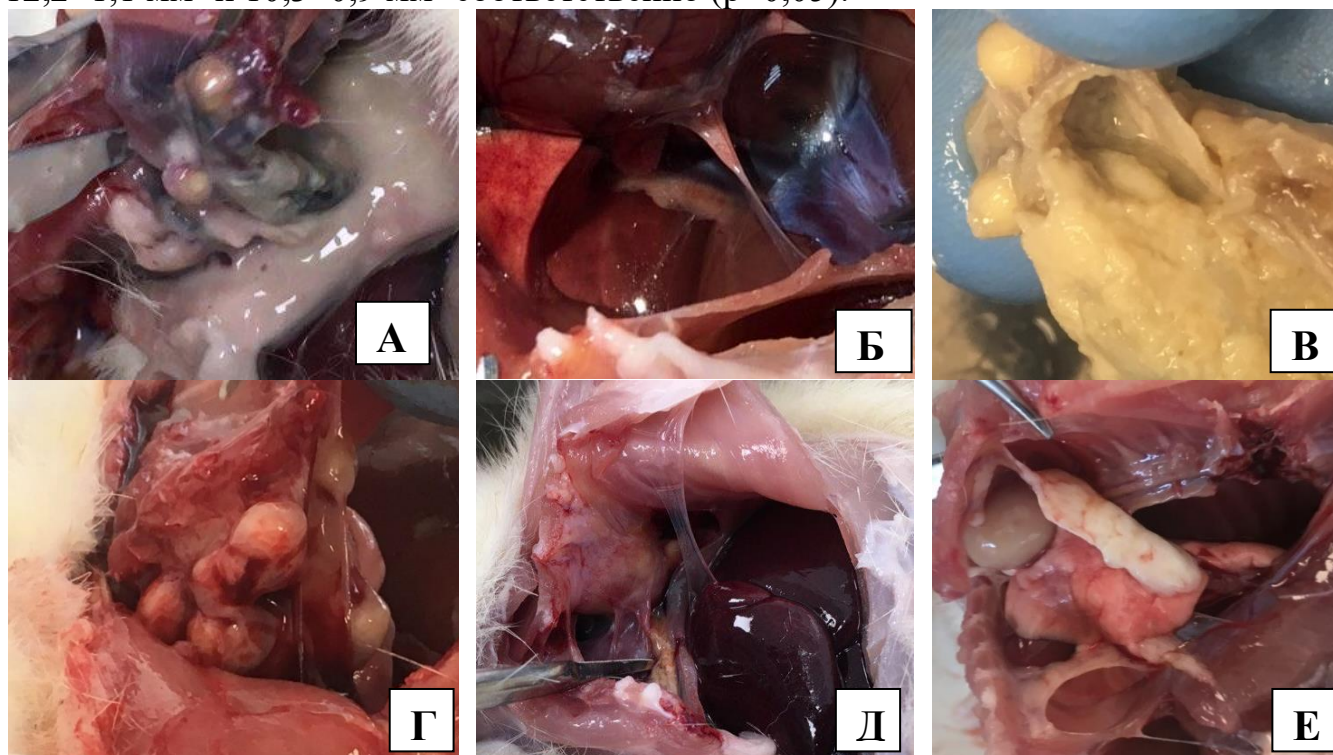


Рисунок 3 – Макроскопическая картина хронической эмпиемы плевры в группах НК (А, Б, В) и V опытной группе с сочетанным введением PRP и аутологичной жировой ткани (Г, Д, Е). А – 10 сут НК; Б – 20 сут НК; В – 30 сут НК; Г - 10 сут PRP+ АЖТ; Д- 20 сут PRP+ АЖТ; Е- 30 сут PRP+ АЖТ.

На 30 сут во всех экспериментальных группах встречались случаи тотального заращения плевральной полости со статистически значимым максимальным значением в группе сочетанного применения биологических стимуляторов адгезиогенеза (26,7%) по отношению к группе НК (6,7%). У животных I группы остаточная полость была заполнена гнойным содержимым. В отличие от НК в группе ПК преобладали множественные пленчатые спайки, которые встречались в 50,0% случаев, а единичные – в 16,7%, представленные плоскостными сращениями. В 23,3% спаечный процесс отсутствовал, а тотальное заращение полости встречалось в 10,0% случаев. При этом средний объем остаточной полости составлял $16,3 \pm 1,4 \text{ мм}^3$. В III опытной группе гнойное содержимое остаточной полости отсутствовало, а средний объем составил $11,8 \pm 0,9 \text{ мм}^3$. Чаще всего обнаруживались множественные плоскостные спайки (53,3%), а единичные лентовидные спайки зафиксированы в 16,7%. В IV опытной группе число животных с тотальным заращением было больше (23,3%), чем в предыдущей. Объем полости эмпиемы был достоверно ниже, по сравнению с НК и ПК, и составлял $8,9 \pm 0,5 \text{ мм}^3$ ($p < 0,05$). В группе с сочетанной биостимуляцией адгезиогенеза наблюдался максимальный положительный эффект. Объем остаточной полости составлял $5,3 \pm 0,8 \text{ мм}^3$, что статистически значимо отличалось от подобного показателя в НК и ПК ($p < 0,05$). Наиболее часто встречались особи с множественными спайками (46,7%) и в 23,3% - единичные (табл. 2).

При **гистологическом исследовании** на 10 сут эксперимента в I группе (НК) остаточная полость была заполнена фибринозно-гнойным экссудатом, с пропитыванием обоих листков плевры и подлежащих участков легочной ткани. На поверхности висцеральной плевры среди единичных нитей фибрина определялось скопление сегментоядерных лейкоцитов, единичных лимфоцитов и макрофагов с разрушением поверхностного и глубокого эластических слоев. Микроскопическая картина в группе ПК характеризовалась наличием гнойно-фибринозного экссудата в плевральной полости, с частичным пропитыванием висцерального и париетального листков. Со стороны мезотелия выявлялись аналогичные изменения, как и в предыдущей группе.

В III опытной группе (PRP-технологии) на этом сроке отмечается формирование грануляционной ткани, которая ограничивала патологический очаг от легочной паренхимы. Выделенные спайки представлены неоформленной соединительной тканью с обилием сосудов, которые формировали единичные спайки и входили в состав пиогенной мембраны. При введении аутологичной жировой ткани (IV опытная группа) среди волокон соединительной ткани определялись островки жировой ткани. При этом количество сосудов соединительной ткани было больше по сравнению с группой, где применялся PRP-метод, которые располагались преимущественно со стороны париетального листка плевры. В V опытной группе с использованием метода сочетанной стимуляции адгезиогенеза микроскопически определялась незрелая соединительная ткань, в составе которой определялись участки жировой ткани, сосуды умеренного кровенаполнения, локализованные преимущественно в местах скопления жировых клеток и со стороны париетальной плевры (рис. 4).

На 30 сут эксперимента при морфологическом исследовании в группе НК сохранялась выраженная диффузная клеточная инфильтрация, представленная нейтрофилами, лимфоцитами и плазматическими клетками. У животных ПК признаки гнойного воспаления были выражены слабо, с сохранением отека и умеренной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией листков плевры. Выделенные спайки были представлены тонкими волокнами соединительной ткани, среди которых определялись разнокалиберные сосуды умеренного наполнения. В III опытной группе остаточная полость была заполнена волокнами соединительной ткани, представленной частично ориентированными по отношению к париетальной и висцеральной плевре пучками. Признаки воспаления были выражены незначительно, в инфильтрате преобладали лимфоциты, макрофаги и плазматические клетки. В IV и V группах формировались множественные спайки, фиксированные по периферии жировой ткани и имеющие признаки зрелой соединительной ткани, диффузная скудная лимфоцитарная инфильтрация как со стороны жировой, так и соединительной ткани, остаточная полость не визуализировалась. В группах с биологической стимуляцией спаечного процесса наблюдалось ускорение созревания соединительной ткани, что подтверждалось полученными данными морфометрического исследования.

В результате комплексного морфометрического исследования установлено, что в группах с биологической стимуляцией адгезиогенеза ОД коллагеновых волокон, формирующих спайки, была значительно выше.

Таблица 2.

Сравнительная характеристика спаечного процесса в плевральной области животных экспериментальных групп при хронической эмпиеме плевры при биологическом стимулировании адгезиогенеза

Экспериментальные группы	Критерии оценки						
	Сроки эксперимента	V остаточной полости, мм ³	Отсутствие спаек, %	Единичные спайки, %	Множественные спайки, %	Тотальное заращение, %	Тип спайки
I группа НК	10 сут	25,4±3,1	43,3	46,7	10,0	0	Pa
	20 сут	24,2±2,3	23,3	66,7	10,0	0	Pa, Pl
	30 сут	19,1±1,6	33,3	46,7	13,3	6,7	Pa, Pl
II группа ПК	10 сут	23,6±2,6	16,7	56,7	26,6	0	Pa, Pl
	20 сут	23,4±2,1	6,7*	33,3	60,0*	0	Pl, Plo
	30 сут	16,3±1,4	23,3	16,7*	50,0*	10,0	Pl, Plo
III опытная группа (PRP)	10 сут	18,9±1,5	20,0	53,3	23,4	3,3	Pa, Pl
	20 сут	18,1±1,8	6,7*	26,6*	60,0*	6,7	L, Plo
	30 сут	11,8±0,9	16,7	16,7*	53,3*	13,3	L, Plo
IV опытная группа (АЖТ)	10 сут	16,2±1,2	13,3*	53,3	26,7	6,7	Pl, L
	20 сут	12,2±1,1*	10,0	20,0*	60,0*	10,0*	Pl, Plo
	30 сут	8,9±0,5*	10,0*	26,7	40,0*	23,3	Pl, Plo, L
V опытная группа (PRP + АЖТ)	10 сут	15,4±1,1	13,3*	46,7	30,0*	10,0*	Pa, Plo
	20 сут	10,3±0,9*	13,3	16,7*	56,7*	13,3*	L, Plo, Pl
	30 сут	5,3±0,8*	3,3*	23,3	46,7*	26,7	Pl, Plo

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с группой НК ($p < 0,05$);

- достоверность различий по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$).

Спайки: L – лентовидные спайки;

Pa – паутинные спайки;

Pl – пленчатые спайки;

Plo – плоскостные (органные) спайки.

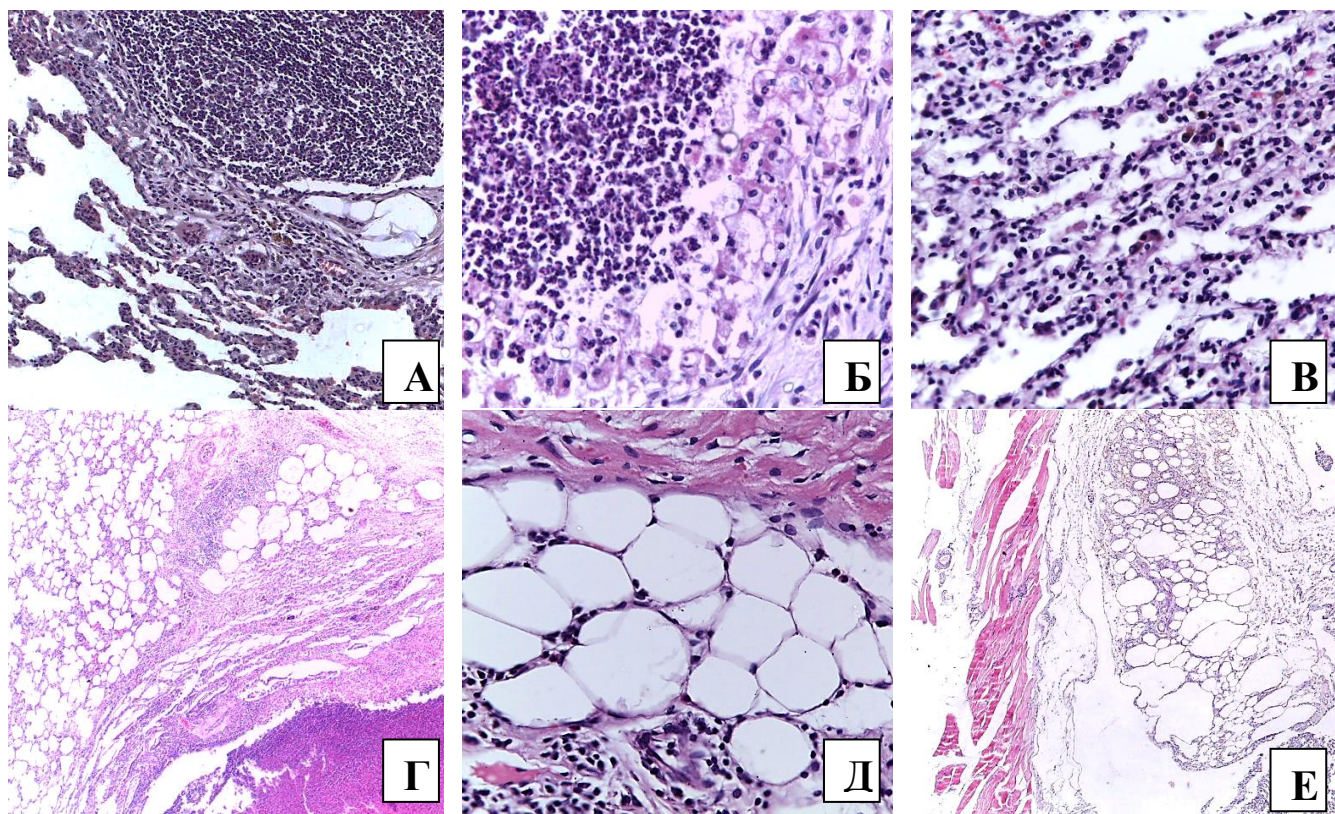


Рисунок 4 – Гистологическая картина плевральной полости при хронической эмпиеме плевры в группах НК (А, Б, В) и V опытной группы с сочетанным введением PRP и аутологичной жировой ткани (Г, Д, Е). А – 10 сут эксперимента НК. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$; Б – 20 сут НК. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$; В – 30 сут НК. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$; Г – 10 сут PRP+ АЖТ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$; Д – 20 сут PRP+ АЖТ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$; Е – 30 сут PRP+ АЖТ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

Так, на 10 сут эксперимента в группе с изолированным применением плазмы, обогащенной тромбоцитами, этот показатель был в 9,4 раза выше, в группе с применением АЖТ в 8,1 раза выше, а при сочетанном потенцировании - в 17,8, по сравнению с группой НК ($p < 0,05$). По мере увеличения сроков эксперимента количество эластических и ретикулярных волокон значительно уменьшалось, что указывало на созревание соединительной ткани. Отмечено, что ОД ретикулярных и эластических волокон в группах с биологической стимуляцией адгезиогенеза была достоверно ниже по сравнению с группой НК и ПК уже на ранних сроках эксперимента. При этом на 20 сут наблюдалось достоверное снижение ОД лейкоцитов по сравнению с группой НК ($p < 0,05$), в особенности у животных V опытной группы. ОД фибробластов в группе с изолированным применением аутологичной жировой ткани и сочетанном потенцировании адгезиогенеза была выше, чем в группах НК, ПК и при использовании PRP-технологии. При сравнении показателей группы позитивного контроля и группы с применением PRP-метода достоверных отличий выявлено не было, несмотря на то, что в группе ПК спайки были менее зрелыми. В группе с использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами, спайки морфологически имели признаки более зрелой соединительной ткани с плотной фиксацией к листкам плевры. Сохранение высоких показателей клеток лейкоцитарного и

лимфоцитарного ряда указывает на риск формирования бесконтрольного спаечного процесса в этих группах, что является неблагоприятным фактором при адгезиогенезе.

На 30 сут наблюдалось достоверное снижение ОД лейкоцитов в группах с биологической стимуляцией адгезиогенеза по сравнению с группой НК ($p < 0,05$). ОД фибробластов в группе с изолированным применением аутологичной жировой ткани и сочетанном потенцировании адгезиогенеза была выше, чем в контрольных группах и при использовании PRP-технологии. В группе с использованием PRP спайки морфологически имели признаки более зрелой соединительной ткани с плотной фиксацией к листкам плевры (рис. 5).

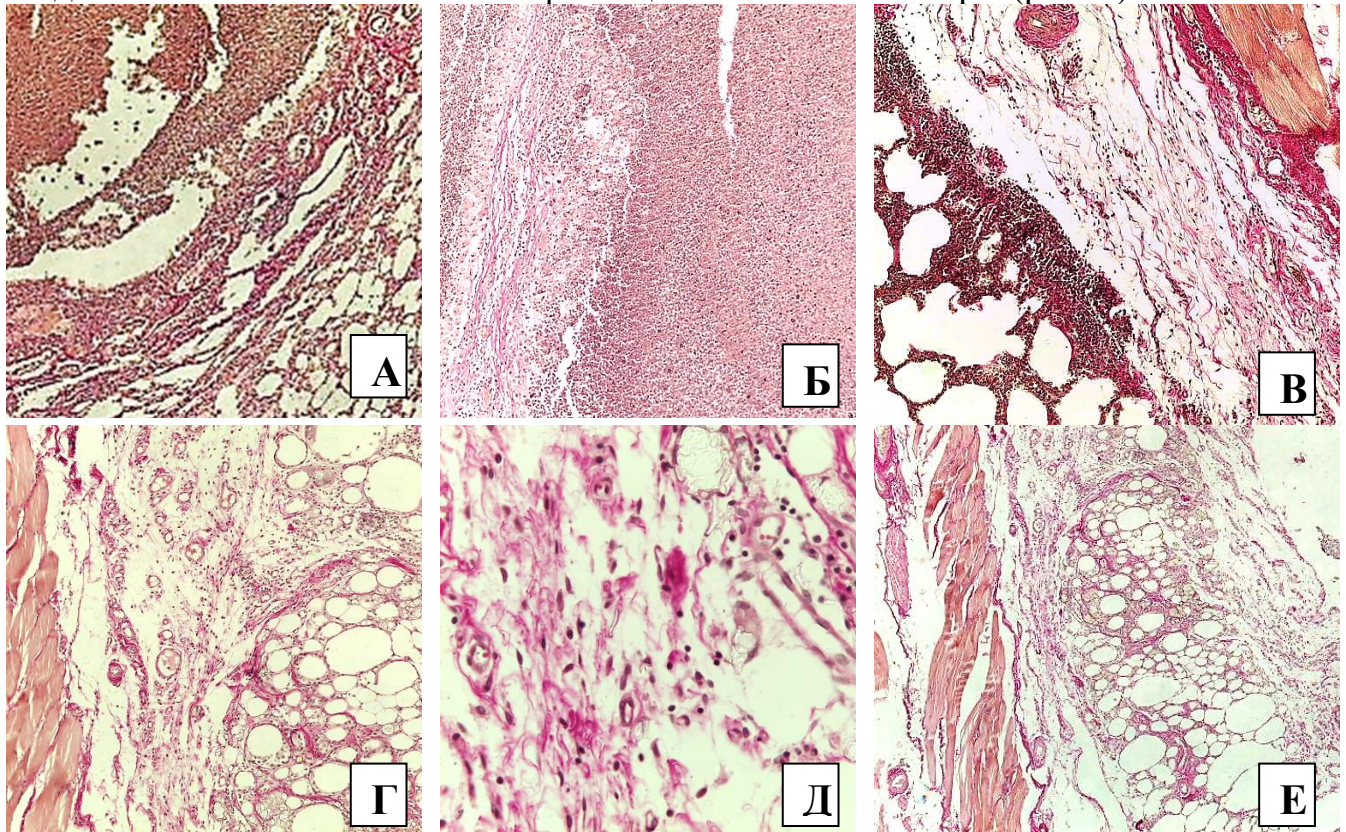


Рисунок 5 – Гистологическая картина плевральной полости при хронической эмпиеме плевры в группах НК (А, Б, В) и V опытной группе с сочетанным введением PRP и аутологичной жировой ткани (Г, Д, Е). А – 10 сут эксперимента НК. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$; Б – 20 сут НК. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$; В – 30 сут НК. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$; Г – 10 сут PRP+ АЖТ. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$; Д – 20 сут PRP+ АЖТ. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 400$; Е – 30 сут PRP+ АЖТ. Окраска по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$.

В табл. 3 приведены результаты морфометрического исследования состава спаек у крыс при хронической ЭП в динамике эксперимента на фоне биологической стимуляции спайкообразования.

Кристаллографическое исследование плеврального экссудата при хронической ЭП выявило нарушение структурно-пространственной организации фаций, характеризующееся отсутствием зональности и наличием патологических кристаллов, во всех экспериментальных группах за исключением группы с сочетанной биологической стимуляцией адгезиогенеза, где уже на 10 сут эксперимента выявлялся завершённый тип кристаллической решетки. При этом

наиболее выраженная деструкция наблюдалась в группе НК, где практически отсутствовала периферическая зона фаций - $11,4 \pm 0,8$ мкм, что было в 16,9 раза меньше, чем в группе с сочетанной стимуляцией адгезиогенеза.

Полученные морфометрические показатели фаций были использованы для вычисления предложенного нами коэффициента (К), табл. 4.

В группе без лечения определялись наибольшие показатели К (0,09). Однако это значение было ниже 0,1 [Патент РФ на изобретение № №2566719, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 22.07.2014 г.], что указывало на наличие воспалительного процесса неспецифической этиологии что является вполне логичным, т.к. моделирование хронической эмпиемы плевры осуществлялось путем введения в плевральную полость *E.coli*.

При **бактериологическом исследовании** экссудата наибольший показатель общей микробной обсемененности выявлен в группе НК (без лечения) на всех сроках эксперимента, при этом снижение показателей было незначительным и статистически незначимо. На фоне применения доксициклина этот показатель был минимальным на всех сроках эксперимента. Так на 10 сут ОМО составила $3,8 \pm 0,07 \times 10^9$ КОЕ/мл, на 20 сут снизилась в 1,6 раза ($2,4 \pm 0,09 \times 10^9$ КОЕ/мл), а на 30 в 1,7 раза ($2,2 \pm 0,08 \times 10^9$ КОЕ/мл), $p < 0,05$. При посеве плеврального экссудата животных опытных групп наблюдается изменение ОМО с тенденцией к снижению, при этом показатель был достоверно ниже, чем в группе без лечения ($p < 0,05$).

Итак, установлено, что стимуляция адгезиогенеза при лечении хронической ЭП приводит к формированию спаек и устранению остаточной полости, вплоть до полной облитерации полости эмпиемы. Однако открытым оставался вопрос, насколько потенцируемый нами процесс адгезиогенеза, являлся контролируемым, и не приведет ли он к тотальному заращению плевральной полости с развитием дыхательной недостаточности.

Для получения ответа нами было проведено **иммуногистохимическое исследование** с использованием маркеров апоптоза (caspase-3, активированная caspase-3, NF-kB) с целью определения его роли в механизме обратного развития спаек при экспериментальной хронической эмпиеме плевры и маркеров клеточной пролиферации (NF-kB, FGF-1). При анализе экспрессии иммуногистохимических маркеров апоптоза на 10 сут эксперимента степень экспрессии каспазы-3 возрастает в ряду: НК → ПК → III группа (PRP-технологии) → IV группа (АЖТ) → V группа (сочетанное потенцирование адгезиогенеза) (рис. 6). На 20 сут в IV и V группах зафиксировано наибольшее значение ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3, в то время как в группах контроля и при изолированном использовании PRP-технологии экспрессия маркеров апоптоза была незначительной, что свидетельствовало о наличии признаков воспаления и замедлении процессов спайкообразования. Обратная картина наблюдалась к концу эксперимента. Так, на 30 сут эксперимента в группах с использованием аутологичной жировой ткани и сочетанной стимуляцией адгезиогенеза ОД иммунопозитивных клеток к каспазе-3 и активной каспазе-3 была минимальной, что подтверждало завершение процессов адгезиогенеза, характеризующегося формированием зрелой соединительной ткани (рис. 7).

Таблица 3

Результаты морфометрического исследования клеточного состава спаек у крыс при хронической эмпиеме плевры в динамике эксперимента на фоне стимуляции адгезиогенеза ($M \pm m$, %)

Экспериментальные группы	Морфометрические показатели, ОД (%)							
	Сроки эксперимента	Коллагеновые волокна	Ретикулярные волокна	Фибрин	Лейкоциты	Лимфоциты	Фибробласты	Сосуды
I группа НК	10 сут	0,97±0,6	34,26±2,5	9,59±0,9	22,16±1,4	12,15±1,8	8,64±0,4	12,22±1,8
	20 сут	11,29±1,6	28,53±3,5	6,97±0,9	18,48±2,1	15,39±0,7	10,26±1,1	9,08±0,3
	30 сут	25,19±3,0	12,06±2,3	6,08±0,4	13,93±0,9	16,61±0,5	16,97±2,5	12,16±0,8
II группа ПК	10 сут	7,93±0,9*	28,26±0,8*	9,46±0,8	23,58±0,7	10,97±0,4	8,32±0,6	11,48±1,3
	20 сут	18,57±1,1*	24,89±3,2*	6,91±0,9	18,52±1,8*	14,21±1,2	11,26±1,1*	5,64±0,9*
	30 сут	30,83±3,2	11,56±0,8	5,21±0,6	10,28±2,3	18,12±3,2	17,33±1,8	6,67±0,8*
III опытная группа (PRP)	10 сут	9,11±0,9*	29,84±2,7	10,98±0,7	21,73±3,8	13,57±0,8	8,09±0,8	6,68±1,1*#
	20 сут	22,63±1,4*#	16,05±3,4*#	7,81±0,9	16,72±3,1	16,87±1,1	11,94±0,8	7,98±0,9*#
	30 сут	29,56±3,4	8,74±1,1	6,02±1,3	9,12±2,5	19,06±0,4*	18,15±1,3	9,35±0,5
IV опытная группа (АЖТ)	10 сут	7,91±0,8*#	30,59±4,1	9,13±0,5	21,03±2,9	11,62±1,2	7,24±0,9	12,48±2,1
	20 сут	21,95±3,1*	18,82±3,2*	5,63±0,5*	13,42±1,3*#	18,13±1,5*#	12,34±1,1*	9,71±0,5#
	30 сут	34,42±3,18*	7,87±2,6#	4,93±0,8	8,15±0,4	19,32±1,2	18,63±2,6	6,68±1,2
V опытная группа (PRP + АЖТ)	10 сут	17,28±0,8*#	24,82±1,1*#	5,79±0,4*#	16,11±2,1*#	12,29±0,9	9,85±0,7*#	13,86±2,9
	20 сут	32,92±4,1*#	13,86±0,9*#	5,02±0,1	9,80±0,8*#	8,56±1,2*#	16,86±1,7*#	12,98±0,8*#
	30 сут	35,81±3,4*#	5,08±1,2*#	3,96±2,1*#	6,34±1,1*#	19,45±3,5	19,63±4,1	9,73±0,4*#

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с группой НК ($p < 0,05$); # - достоверность различий по сравнению с предыдущим сроком эксперимента ($p < 0,05$).

Таблица 4

Кристаллография фаций плевральной жидкости у крыс с хронической эмпиемой плевры на фоне потенцирования адгезиогенеза ($M \pm m$)

Морфометрические параметры	Экспериментальные группы											
	НК			I (PRP)			II (АЖТ)			III (PRP+ АЖТ)		
	10 сут	20 сут	30 сут	10 сут	20 сут	30 сут	10 сут	20 сут	30 сут	10 сут	20 сут	30 сут
Д, мм	1,1±0,2	1,2±0,2	1,1±0,3	1,2±0,2	1,1±0,2	1,1±0,2	1,0±0,3	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,3	1,0±0,2	1,0±0,3
ТПЗ, мкм	11,4±0,8	33,5±8,6#	27,3±4,2	86,5±15,8*	72,9±10,1*	83,1±6,5*	162,9±14,9*	138,2±15,7*	183,5±17,2*	193,2±12,5*	193,2±25,1*	199,3±21,8*
ТЦЗ, мкм	1088,6±10,2	1166,5±25,4	1072,7±10,8	1113,5±18,4	1027,1±18,1	1016,9±12,9	837,1±25,2	1061,8±28,1	1016,5±17,5	906,8±19,8	801,6±17,9	800,7±17,3
СВК, усл. ед.	1,1±0,8	1,1±0,1	1,0±0,2	1,6±0,3	2,7±0,5	4,2±0,6*#	1,8±0,2*	4,3±0,2*	6,2±0,9*	3,1±0,9*	6,9±0,9*#	9,4±0,5*
Коэффициент, (К)	0,09	0,03#	0,04	0,03*	0,03	0,05	0,01*	0,03	0,03*	0,01*	0,03	0,04

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с группой НК ($p < 0,05$); # - достоверность различий по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$).

где: Д – диаметр капли, мм; ТПЗ – толщина периферической зоны фации, мкм; ТЦЗ – толщина центральной зоны фации, мкм; СВК – степень ветвления кристаллов, ед.; К – коэффициент, мм^{-1} ; $K = (ТЦЗ) \times (СВК) / (ТПЗ) \times (Д)$

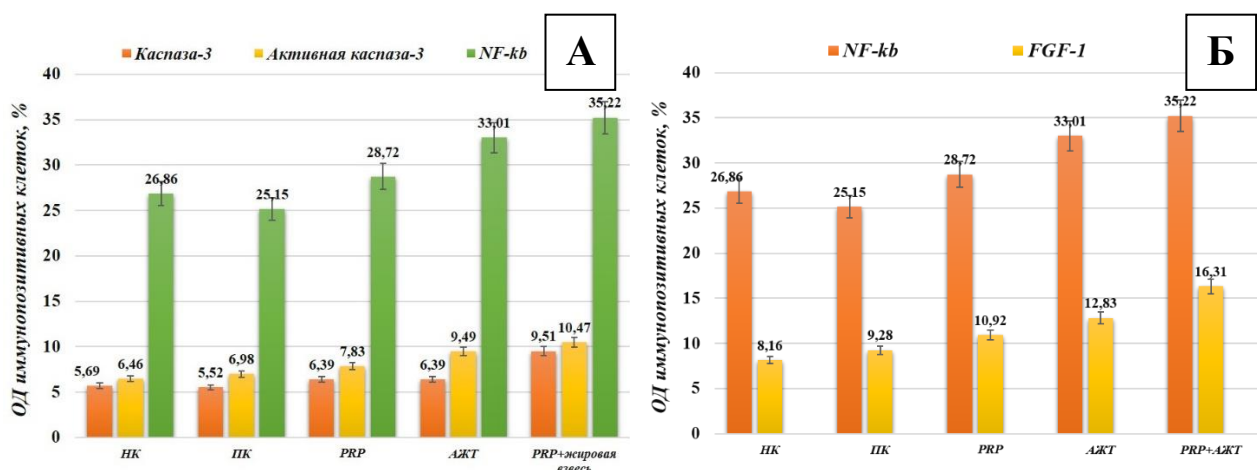


Рисунок 6 – Сравнительная характеристика экспрессии ИГХ-маркеров в экспериментальных группах при хронической эмпиеме плевры на 10 сут, $p < 0,05$. А - каспаза-3, активная каспаза-3 и NF-kb. Б - NF-kb и FGF-1.

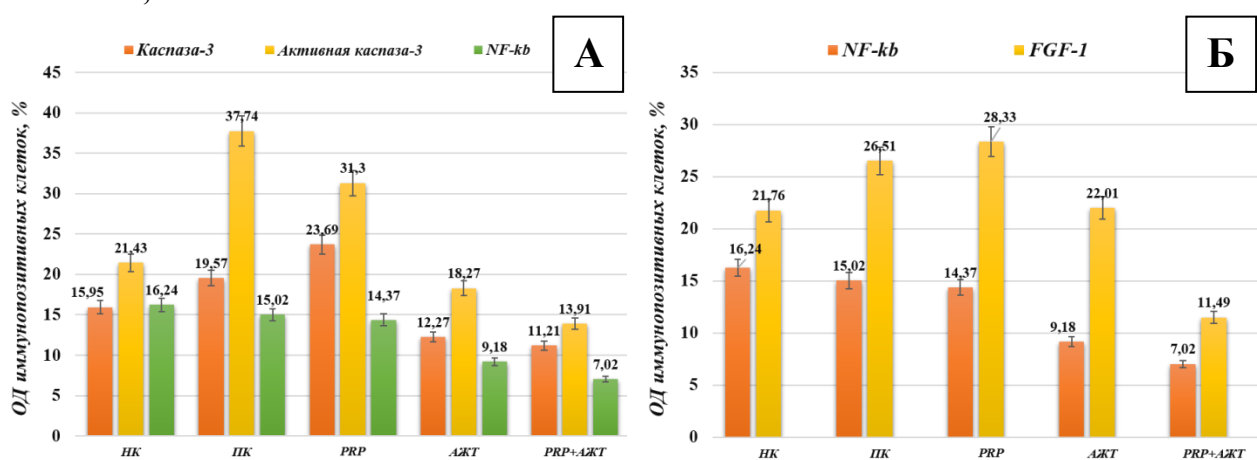


Рисунок 7 – Сравнительная характеристика экспрессии ИГХ-маркеров в экспериментальных группах при хронической эмпиеме плевры на 30 сут, $p < 0,05$. А - каспаза-3, активная каспаза-3 и NF-kb. Б - NF-kb и FGF-1.

При анализе иммунопозитивного материала к маркерам апоптоза и NF-kB выявлена их обратная зависимость от экспрессии каспазы-3 и активной каспазы-3 ($k=0,91$). В группе без лечения и при изолированном применении плазмы, обогащенной тромбоцитами, ОД иммунопозитивных клеток к FGF-1 и NF-kB возрастала к 30 сут, что свидетельствовало о неконтролируемом спайкообразовании. В IV и V опытных группах наибольшее значение ОД иммунопозитивно окрашенных клеток к фактору роста фибробластов-1 наблюдались на 20 сут, что указывало на высокую синтетическую активность фибробластов. При этом на 30 сут в группе с сочетанной стимуляцией адгезиогенеза показатели иммунопозитивного материала к FGF-1 были достоверно ниже, что указывает на снижение активности фибробластов и формирование зрелой соединительной ткани и свидетельствовало о безопасности биостимуляции.

В табл. 5 представлены морфометрические показатели экспрессии иммунногистохимических маркеров при хронической эмпиеме плевры на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза в эксперименте.

Таблица 5 Морфометрические показатели экспрессии иммуногистохимических маркеров при хронической эмпиеме плевры на фоне биологической стимуляции адгезиогенеза в эксперименте (ОД, %)

Экспериментальные группы	ОД иммунопозитивных клеток, %				
	Сроки эксперимента	NF-kb	Каспаза-3	Активная каспаза -3	FGF-1
I группа НК	10 сут	26,86±0,5	5,69±0,8	6,46±1,2	8,16±0,5
	20 сут	27,13±1,3	7,01±1,8	8,63±0,5	11,52±0,4
	30 сут	16,24±1,6	15,95±2,9	21,43±1,8	21,76±3,4
II группа ПК	10 сут	25,15±1,2	5,52±0,4	6,98±1,9	9,28±1,2
	20 сут	23,38±0,3	11,01±1,1*	13,90±0,5*	18,21±0,8*
	30 сут	15,02±1,4	19,57±2,5	37,74±0,5*	26,51±1,5*
III опытная группа (PRP)	10 сут	28,72±0,8	6,39±1,9	7,83±0,5	10,92±1,5
	20 сут	24,09±1,6	10,38±0,9*	11,78±0,8*	19,85±0,5*
	30 сут	14,37±1,5	23,69±1,1*#	31,30±0,3*	28,33±2,3*
IV опытная группа (АЖТ)	10 сут	33,01±1,4*#	6,39±1,9	9,49±2,9	12,83±1,2*#
	20 сут	12,76±1,1*#	23,22±3,1*#	39,72±2,9*#	32,12±0,8*#
	30 сут	9,18±0,8*#	12,27±3,2*#	18,27±2,1*#	22,01±2,3*#
V опытная группа (PRP+ АЖТ)	10 сут	35,22±0,8*#	9,51±2,7*#	10,47±1,2*#	16,31±0,8*#
	20 сут	11,37±1,5*#	35,16±1,3*#	53,83±0,5*#	37,02±1,5*#
	30 сут	7,02±1,2*#	11,21±0,5*#	13,91±0,9*#	11,49±3,2*#

Примечание: *- достоверность различий по сравнению с группой НК ($p<0,05$);

- достоверность различий по сравнению с группой сравнения ($p<0,05$).

Проведенный **корреляционный анализ** подтвердил полученные нами данные о наличии сильных и умеренных взаимозависимостей между интегральными показателями хронической эндогенной интоксикации, общей микробной обсемененности, структурно-пространственной организации фаций плевральной жидкости и морфометрическими характеристиками плевральных спаек при хронической эмпиеме плевры на фоне потенцирования адгезиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами и аутологичной жировой тканью.

В **заключении** проведено обсуждение полученных результатов и их сопоставление с данными литературы, подведены итоги полученных результатов. Таким образом, результаты экспериментального исследования доказали эффективность биологического стимулирования адгезиогенеза для устранения остаточной полости при хронической ЭП. При этом сочетанное использование плазмы, обогащенной тромбоцитами, и аутологичной жировой ткани является наиболее безопасным методом биологической стимуляции спайкообразования, которое не приведет к тотальному заращению плевральной полости.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая эмпиема плевры сопровождается развитием хронической эндогенной интоксикации, характеризующейся достоверным увеличением биохимических маркеров, по сравнению с референтными значениями: ВСММ – в 3,1 раза, олигопептидной фракции – в 2,7 раза ($p<0,05$). Морфологические проявления развития эндогенной интоксикации на фоне эмпиемы плевры, обнаруженные в органах-мишенях (легких, сердце,

печени, почках) характеризовались комплексом гемодинамических нарушений, приводящих к воспалительно-дистрофическим изменениям, и были наиболее выражены в группе негативного контроля.

2. Морфологические изменения при хронической эмпиеме плевры характеризовались стадийностью изменений с последовательным развитием фибринозно-гнойного воспаления и репаративных процессов, при этом на всех сроках эксперимента определялось утолщение плевральных листков, отека, лейкоцитарной инфильтрации и разрастание грануляционной ткани с умеренно полнокровными сосудами (на 30 сут). При этом состав спайки в динамике эксперимента менялся, так, на 10 сут в их каркасе преобладали ретикулярные и эластические волокна (ОД $34,26 \pm 2,5\%$) с признаками воспаления (ОД лейкоцитов $22,16 \pm 1,4\%$). В то время как к окончанию эксперимента сращения приобретали признаки зрелости (ОД коллагеновых волокон $25,19 \pm 3,0\%$, ОД фибробластов $16,97 \pm 2,5\%$, $p < 0,05$).

3. Морфологические изменения, возникающие при биологическом потенцировании адгезиогенеза при хронической ЭП, путем введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, аутологичной жировой ткани и их сочетанного применения характеризовались возникновением спаек на 10 сут эксперимента во всех группах, при этом сочетанное введение плазмы, обогащенной тромбоцитами с аутологичной жировой тканью способствовало более раннему созреванию спаек (на 20 сут), по сравнению с другими способами потенцирования ($p < 0,05$).

4. При микробиологическом исследовании плеврального экссудата кроме *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, определялись гемолитические формы и лактозонегативные штаммы, при этом общая микробная обсемененность была максимальной в I группе ($11,9 \pm 0,18 \times 10^9$ КОЕ/мл) и минимальной – в группах позитивного контроля и сочетанной биостимуляции ($2,2 \pm 0,08$ и $2,1 \pm 0,09 \times 10^9$ КОЕ/мл соответственно). Нарушение структурно-пространственной организации фаций экссудата, характеризующееся нарушением зональности и незавершенным типом кристаллизации выявлено во всех группах, кроме группы с сочетанным использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами, и аутологичной жировой ткани, при этом наиболее выраженная деструкция наблюдалась в группе негативного контроля.

5. При анализе экспрессии иммуногистохимических маркеров апоптоза и созревания клеток фибробластического ряда было проведено сопоставление степени зрелости спаек плевральной полости и возможных путей ремоделирования соединительной ткани на различных сроках эксперимента. При сравнении экспрессии каспазы-3 и активной каспазы-3 достоверных отличий не выявлено, при этом степень экспрессии каспазы-3 возрастала в ряду: негативный контроль → позитивный контроль → PRP-технологии → аутологичная жировая ткань → сочетанное потенцирование адгезиогенеза. Экспрессия NF-κB фактора, была обратно пропорциональна экспрессии каспазы-3.

6. Анализ экспрессии FGF-1 показал сопоставимость результатов в группе НК и при изолированном применении PRP-технологии, где показатели ОД иммунопозитивных клеток возрастали к 30 сут эксперимента ($21,76 \pm 3,4\%$ и $28,33 \pm 2,3\%$ соответственно), что в сочетании с увеличением процента иммунопозитивных клеток к NF-kB фактору свидетельствовало о неконтролируемом спайкообразовании. В то же время при сочетанной стимуляции адгезиогенеза ОД иммунопозитивных клеток к FGF-1 была достоверно ниже, и составила $11,49 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$), что свидетельствовало о безопасности применения данного способа ликвидации остаточной полости эмпиемы.

7. При проведении корреляционного анализа выявлены сильные и умеренные взаимосвязи между маркерами хронической ЭИ, уровнем микробной обсемененности, показателями структурно-пространственной организации экссудата и морфометрическими параметрами клеточного состава спаек, ИГХ-маркерами пролиферации/апоптоза фибробластов при хронической ЭП на фоне биологического потенцирования адгезиогенеза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Стимуляция адгезиогенеза с использованием биологических технологий может быть рекомендована для проведения клинических исследований.
2. Кристаллографическое исследование плеврального экссудата может быть рекомендовано для определения эффективности проводимого лечения при хронической ЭП.
3. При хронической ЭП наиболее эффективным способом потенцирования адгезиогенеза следует считать и рекомендовать к применению сочетанное использование плазмы, обогащенной тромбоцитами и аутологичной жировой ткани.
4. Для решения вопроса об эффективности и безопасности применения новых методов биологической стимуляции адгезиогенеза рекомендовано использовать линейку ИГХ-маркеров, включающие: caspasa-3, NF-kB, FGF-1.
5. Изолированное использование плазмы, обогащенной тромбоцитами, для стимуляции адгезиогенеза повышает риск неконтролируемого спайкообразования и тотального заращения плевральной полости, в связи с этим не может быть рекомендовано для клинических исследований.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты диссертационного исследования объективизируют данные о возможной стимуляции спайкообразования в плевральной полости и могут быть использованы в дальнейшем поиске эффективных методов ликвидации остаточных полостей при хронической ЭП, в том числе с использованием биотехнологий. Актуально проведение экспериментальных исследований, направленных на морфологическую оценку отсроченных результатов потенцирования адгезиогенеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Айдаева, С.Ш. Клинико-анатомические исследования спаечного процесса в плевральной полости при эмпиеме плевры / С.Ш. Айдаева, С.А.

Калашникова, А.В. Калашников. - Текст : непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. - 2017. – №3 (59). – С. 13-15.

2. Калашников, А.В. Морфология внутрибрюшинных и межплевральных сращений / А.В. Калашников, С.А. Калашникова, С.Ш. Айдаева. - Текст : непосредственный // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов, 1-4 июня 2017г. / редкол.: О.В. Макарова; ФГБНУ НИИМЧ. - Москва: Изд-во Группа МДВ, 2017. – С. 128-129.

3. Калашников, А.В. Применение плазмолифтинга для потенцирования адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры / А.В. Калашников, С.Ш. Айдаева. - Текст : непосредственный // Морфология : материалы XIV Конгресса международной ассоциации морфологов, Астрахань, 19-22 сентября 2018 г. / редкол.: В.В. Банин; Астраханский государственный медицинский университет. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018.- Т. 153, № 3. - С.125-126.

4. Калашникова, С.А. Морфологические особенности адгезиогенеза на фоне плазмолифтинга / С.А. Калашникова, С.Ш. Айдаева, А.В. Калашников. - Текст : непосредственный // Морфология : материалы XIV Конгресса международной ассоциации морфологов, Астрахань, 19-22 сентября 2018 г. / редкол.: В.В. Банин; Астраханский государственный медицинский университет. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018. - Т. 153, № 3. - С. 126.

5. Айдаева, С.Ш. Морфологический анализ плевральных и перитонеальных спаек / С.Ш. Айдаева, А.В. Калашников, С.А. Калашникова. - Текст : непосредственный // Морфология : материалы XIV Конгресса международной ассоциации морфологов, Астрахань, 19-22 сентября 2018 г. / редкол.: В.В. Банин; Астраханский государственный медицинский университет. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018.- Т. 153, № 3. - С. 13.

6. Kalashnikov, A.V. Description of the stimulated pleural adhesion formation / A.V. Kalashnikov, Salimov D.Sh., S.Sh. Aydaeva // Морфология : материалы международной конференции Proceedings of the 10th international symposium on clinical and applied anatomy (ISCAA), Москва, 13-16 сентября 2018 г. / редкол.: С.С. Дудукин. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018. – Том 153, №S3-1. – С. 56.

7. Kalashnikov, A.V. Morphological justification of pleural adhesion stimulation / A.V. Kalashnikov, Salimov D.Sh., S.Sh. Aydaeva // Морфология : материалы международной конференции Proceedings of the 10th international symposium on clinical and applied anatomy (ISCAA), Москва, 13-16 сентября 2018 г. / редкол.: С.С. Дудукин. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018. – Том 153, №S3-1. – С. 56-57.

8. Kalashnikov, A.V. Clinical and anatomical characteristic of the pleural cavity in pleural empyema / A.V. Kalashnikov, Vorobyov A.A., Salimov D.Sh., S.Sh. Aydaeva // Морфология : материалы международной конференции Proceedings of the 10th international symposium on clinical and applied anatomy (ISCAA), Москва, 13-16 сентября 2018 г. / редкол.: С.С. Дудукин. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2018. – Том 153, №S3-1. – С. 57.

9. Калашников, А.В. Стимуляция адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры / А.В. Калашников, А.А. Воробьев, Д.Ш. Салимов, С.А. Калашникова, С.Ш. Айдаева. - Текст : непосредственный // Новости хирургии. – 2018. - Том 26, №4. – С. 412-420.

10. Калашников, А.В. Клинико-морфологическая характеристика внутриплевральных спаек при эмпиеме плевры / А.В. Калашников, С.Ш. Айдаева, С.А. Калашникова. - Текст : непосредственный // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования.– 2018. – С.83-89.

11. Айдаева, С.Ш. Экспериментальная стимуляция внутриплевральной адгезии / С.Ш. Айдаева, А.В. Калашников, С.А. Калашникова. - Текст : непосредственный // Морфология : материалы VIII съезда медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов, Воронеж, 23-26 мая 2019 г. / редкол.: В.В. Банин; Воронежский

государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко. – Санкт-Петербург: Изд-во Левша, 2019. - Т. 155, № 2. - С. 11.

12. Калашникова, С.А. Клинико-морфологические аспекты внутриплевральной адгезии / С.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, А.В. Калашников. - Текст : непосредственный // Fundamental science and technology – promising developments XVIII. - 2019. – Vol. 1. - С. 9-11.

13. Калашникова, С.А. Биостимуляция спайкообразования в комплексном лечении хронической эмпиемы плевры / С.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, А.В. Калашников. - Текст : непосредственный // East European science jornal. - 2019. – Vol. 6, № 2(42). - С. 23-26.

14. Калашникова, Е.А. Технология липофилинга при переломе ребер / Е.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, А.В. Калашников, С.А. Калашникова. - Текст : непосредственный // V всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VOLGAMEDSCIENCE» : материалы международной конференции, Нижний новгород, 13-14 марта 2019 г. / редкол.: Л.В. Боровкова, Г.О. Гречканев, Т.М. Мотовилова; Приволжский исследовательский медицинский университет. – Нижний Новгород: Изд-во ПИМУ, 2019. – С. 50-51.

15. Хачатрян, С.А. Морфология плевральных спаек при стимулированном адгезиогенезе / С.А. Хачатрян, **С.Ш. Айдаева**, Е.А. Калашникова. - Текст : непосредственный // VII международный молодежного медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» : материалы VII международного молодежного медицинского конгресса, Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г. / редкол.: Н.А. Гавришева; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. Академика И.П. Павлова. – Санкт-Петербург: Изд-во Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. Академика И.П. Павлова, 2019.– С. 316.

16. Калашникова, Е.А. Хирургическая тактика ведения эмпиемы плевры с использованием PRP-технологии / Е.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, С.А. Хачатрян. - Текст : непосредственный // VII международный молодежного медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019» : материалы VII международного молодежного медицинского конгресса, Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г. / редкол.: Н.А. Гавришева; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. Академика И.П. Павлова. – Санкт-Петербург: Изд-во Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. Академика И.П. Павлова, 2019.– С. 490-491.

17. Калашникова, С.А. Роль апоптоза при оценке эффективности биологической стимуляции адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры / С.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, Е.А. Калашникова, Л.В. Полякова, В.П. Филиппова. - Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=30019> (дата обращения: 18.08.2020). DOI: 10.17513/spno.30019.

18. Калашникова, С.А. Использование иммуногистохимических маркеров в оценке выраженности адгезиогенеза в плевральной полости при биологическом потенцировании / С.А. Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, Полякова Л.В., Калашникова Е.А., Филиппова В.П.. - Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=30170> (дата обращения: 05.10.2020). DOI: 10.17513/spno.30170.

19. Айдаева, **С.Ш.** Стимуляция спаечного процесса в плевральной полости при экспериментальном моделировании хронической эмпиемы плевры / С.Ш. Айдаева, С.А.Калашникова, Е.А.Калашникова. - Текст : непосредственный // Беликовские чтения : материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции, Пятигорск, 2020 г. / редкол.: М.В. Черников; Пятигорский медико-фармацевтический университет. –

Пятигорск: Изд-во Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2020.– с. 576-581.

20. Калашникова, С.А. Применение PRP-технологий для стимуляции адгезиогенеза в эксперименте/ С.А.Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, А.В.Калашников. - Текст : непосредственный // Морфология : материалы XV Конгресса международной ассоциации морфологов, Ханты-Мансийск, 21-22 октября 2020 г. / редкол.: В.В. Банин; Ханты-Мансийская государственная медицинская академия. – Санкт-Петербург: Изд-во Эскулап, 2020. - Т. 157, № 2-3. - С. 92.

21. Калашникова, С.А. Применение кристаллографии плеврального выпота в диагностике хронической эмпиемы плевры / С.А.Калашникова, **С.Ш. Айдаева**, Е.А.Калашникова. - Текст : непосредственный // Евразийский союз ученых. - 2020. - № 8 (77). - С. 5-9. DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2020.5.77.

22. Kalashnikova, S.A. Structural and spatial organization of pleural fluid in chronic pleural empyema against the background of PRP technology / Kalashnikova S.A., **S.Sh. Aidaeva**, Kalashnikov A.V. // Proceedings of the International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”. Part 3 - Reports in English. – 2020. – P. 145-155.

23. Калашников, А.В. Экспериментальная оценка эффективности применения биологической стимуляции адгезиогенеза при остаточных плевральных полостях / Калашников А.В., Калашникова С.А., Воробьев А.А., Салимов Д.Ш., **С.Ш. Айдаева**. - Текст : непосредственный // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. Т. – 15, №3. – С.338-342. DOI: 10.14300/mnnc.2020.15080.

24. Айдаева, С.Ш. Апоптоз-опосредованный механизм деградации спаек при стимулированном адгезиогенезе / **С.Ш. Айдаева**, С.А. Калашникова, Л.В.Полякова, А. В.Калашников. - Текст : непосредственный // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. - №4. – С. 37-41.

Рационализаторские изобретения и патенты на изобретения

1. Айдаева С.Ш. Способ моделирования остаточных плевральных полостей (рационализаторское предложение). / А.В. Калашников, А.А. Воробьев, Д.Ш. Салимов, С.А. Калашникова // Рационализаторское предложение №6 от 22.01.2018.

2. Патент на изобретение №2716451 Российская Федерация. Способ биологической стимуляции адгезиогенеза в плевральной полости при остаточных полостях после перенесённых нагноительных заболеваний лёгких и плевры / Калашников А.В., Воробьев А.А., Салимов Д.Ш., Калашникова С.А., Айдаева С.Ш. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11.03.2020 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЖТ	– Аутологичная жировая ткань
ВСММ	– Вещества средней молекулярной массы
ИГХ	– Иммуногистохимия
КОЕ	– Колониеобразующие единицы
МДА	– Малоновый диальдегид
НК	– Негативный контроль
ОМО	– Общая микробная обсемененность
ПОЛ	– Перекисное окисление липидов
ПК	– Положительный контроль
ЭИ	– Эндогенная интоксикация
ЭП	– Эмпиема плевры
FGF	– Фактор роста фибробластов
PRP	– Platelet Rich Plasma (плазма, обогащенная тромбоцитами)
NF-kB p65	– Транскрипционный фактор