

На правах рукописи

**ГРИГОРЬЕВ**  
Сергей Евгеньевич

**КОРРЕКЦИЯ СИНДРОМА  
ПОСТСПЛЕНЭКТОМИЧЕСКОГО ГИПОСПЛЕНИЗМА  
ТАФЦИНСОДЕРЖАЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ  
В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**  
(экспериментальное исследование)

**14.01.17 – хирургия**  
**14.03.03 – патологическая физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук на базе научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

*Апарцин Константин Анатольевич*

**Научный консультант:**

доктор биологических наук

*Лепехова Светлана Александровна*

**Официальные оппоненты:**

*Дамбаев Георгий Цыренович* – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН (заведующий кафедрой госпитальной хирургии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации)

*Лишманов Юрий Борисович* – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН (руководитель лаборатории радионуклидных методов исследования Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт кардиологии» СО РАМН)

**Ведущая организация**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «26» декабря 2013 года в 12<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

*Петрова Ирина Викторовна*

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Синдром постспленэктомического гипоспленизма (ПСГ) – это патологическое состояние, вызываемое аспленизацией организма [Апарцин К.А., 2001]. Спленэктомия по-прежнему остается чрезвычайно распространенной операцией [Усольцев Ю.К., 1998; Ибрагимов Р.А. и др., 2007; Рагимов Г.С., 2009], в связи с чем не теряет своей актуальности проблема послеоперационных гипоспленических расстройств. Понимая важность функций селезенки для организма, хирурги стремятся к сохранению этого органа [Шапкин Ю.Г. и др., 2000; Сабиров Ш.Р., 2006; Mossadegh S. et al., 2013]. Однако обширные травматические повреждения, тотальное поражение пульпы опухолевым или инфекционным процессом приводят к спленэктомии. Удаление селезенки в ряде случаев является единственным эффективным способом лечения некоторых гематологических заболеваний [Байтаева Д.А., Бессмельцев С.С., 2011; Kawashima I. et al., 2013; Trindade E.N. et al., 2013]. Спленэктомии производят и при выполнении комбинированных онкологических операций [Афанасьев С.Г. и др., 2011; Ена И.И. и др., 2011], а также некоторых хирургических вмешательств на поджелудочной железе [Гульман М.И. и др., 2005; Эдвин Б. и др., 2007; Аносенко С.А., 2012].

Постспленэктомический гипоспленизм характеризуется выраженным снижением резистентности организма к возбудителям инфекций и клинически проявляется гнойно-септическими осложнениями, респираторными инфекционными заболеваниями, сепсисом [Шапкин Ю.Г. и др., 2009; Rodriguez Gomez M. et al., 1997; Machesky K.K. et al., 1998].

Распространенным методом хирургической профилактики ПСГ является аутотрансплантация ткани селезенки [Szendroi T., 1997; Leemans R. et al., 1999; Черышкин А.Л. и др., 2012]. Этот метод эффективен в профилактике поздних осложнений спленэктомии, но в раннем послеоперационном периоде его влияние на патологический процесс незначительно [Шапкин Ю.Г. и др., 2004; Черышкин А.Л. и др., 2012], что связано с длительной регенерацией трансплантированной селезеночной пульпы [Saito E., Balint A. et al., 2012; Marques R.G. et al., 2012]. Кроме того, выполнение аутотрансплантации не всегда возможно технически по ряду причин (размножение пульпы, тотальное септическое поражение и т.д.).

В эксперименте предложен эффективный хирургический способ коррекции раннего послеоперационного гипоспленизма – ксенотрансплантация культуры клеток селезенки свиньи [Прокопьев М.В., 2001]. Главным препятствием для пересадки культуры клеток свиной селезенки в клинических условиях являются положения действующего законодательства, ограничивающие пересадку ксеногенных материалов.

Такие методы медикаментозной профилактики, как вакцинация от наиболее распространенных возбудителей инфекции и/или длительная антибактериальная терапия, оказываются малоэффективными и не несут патогенетической направленности [Григорьев Е.Г., Апарцин К.А., 2001; Waghorn D.J., 1997; Malcolm L. et al., 1999].

В то же время существуют препараты природного и синтетического происхождения, содержащие тафцин – регуляторный тетрапептид, продуцируемый в селезенке

[Najjar V.A., Nishioka K., 1970; Spierer Z., 1977], с дефицитом которого связывают развитие ПСГ [Апарцин К.А., 2001]. В 1977 впервые описано уменьшение количества тафцина в крови после удаления селезенки [Spierer Z., 1977]. Существенное снижение концентрации тафцина в сыворотке крови пациентов, перенесших спленэктомию, подтверждено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Апарцин К.А., 2001]. Возмещение недостатка эндогенного тафцина введением тафцинсодержащих препаратов теоретически могло бы предотвратить негативные последствия спленэктомии, связанные с гипоспленическими расстройствами.

Значимость этой проблемы, нерешенные вопросы теоретического и прикладного свойства предопределили содержание настоящего исследования.

### **Цель исследования**

Разработать патогенетически обоснованный способ коррекции тафциновой недостаточности при гипоспленизме, индуцированном хирургическим вмешательством на селезенке.

### **Задачи:**

1. На модели тафциновой недостаточности, вызванной гипоспленизмом, индуцированным хирургическим путем у крыс изучить влияние заместительной терапии тафцинсодержащими препаратами на показатели летальности и выживаемости.

2. В экспериментах *in vitro* изучить эффект синтетического аналога тафцина на фагоцитарную активность донорских лейкоцитов.

3. Исследовать эффективность воздействия тафцинсодержащих препаратов на характер воспалительной реакции, состояние белковосинтетической функции печени, морфологические изменения печени и легких, а также анемии, вызванных хирургическим вмешательством на селезенке.

4. Оценить результаты патогенетически обоснованной коррекции нарушений иммунитета, возникающих вследствие спленэктомии в раннем послеоперационном периоде.

5. Разработать концептуальную схему саногенеза постспленэктомического гипоспленизма под воздействием тафцинсодержащих препаратов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Тафцинсодержащий препарат Селанк проявляет *in vitro* стимулирующие эффекты эндогенного тафцина на фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов.

2. Эффективность патогенетически направленной коррекции тафциновой недостаточности путем введения тафцинсодержащих препаратов подтверждается снижением летальности/улучшением выживаемости к 21-м суткам после индукции гипоспленизма, уменьшением выраженности печеночной недостаточности воспалительного генеза и анемии, нормализацией показателей иммунного статуса.

3. Проявления тафциновой недостаточности (подавление белково-синтетической функции печени, фагоцитарной активности и клеточного иммунитета, воспалительные повреждения ткани печени и легких, приводящие к гибели животного) поддаются коррекции путем введения тафцинсодержащих препаратов Селанк или Спленопид.

## **Научная новизна**

Раскрыты новые закономерности формирования постспленэктомического гипоспленизма в аспекте приобретенной тафциновой недостаточности и впервые экспериментально продемонстрирована целесообразность заместительного введения тафцинсодержащих препаратов в раннем послеоперационном периоде.

Впервые установлено *in vitro*, что синтетический тафцинсодержащий препарат Селанк обладает стимулирующим действием на фагоцитарную активность лейкоцитов, достигающим максимума при концентрациях препарата  $5,86-11,72 \times 10^{-3}$  мг/мл.

На модели постспленэктомического гипоспленизма (крысы-самцы линии Вистар) впервые продемонстрирована эффективность введения тафцинсодержащих препаратов Селанк или Спленопид, подтвержденная на основании анализа летальности/выживаемости к 21-м суткам после аспленизации, комплексной оценки печеночной недостаточности воспалительного генеза, иммунного статуса.

Созданы теоретические предпосылки для трансляции результатов экспериментальных исследований медикаментозной коррекции приобретенной тафциновой недостаточности, вызванной удалением селезенки, в клиническую практику.

## **Практическая значимость**

Проведенные экспериментальные исследования раскрывают перспективы применения тафцинсодержащих препаратов Спленопид и Селанк для профилактики или лечения тафциновой недостаточности как патогенетического компонента постспленэктомического гипоспленизма. Расширены перспективы выполнения радикальных хирургических вмешательств на органах верхнего этажа брюшной полости за счет медикаментозной коррекции побочных эффектов спленэктомии.

Намечены перспективы улучшения непосредственных и отдаленных результатов вмешательства на селезенке, когда органосохраняющая операция не выполнена по техническим, организационным причинам или противопоказана.

Выполнены доклинические исследования новых эффектов препаратов Спленопид и Селанк, что открывает перспективы проведения IIIb фазы клинических исследований применения данных препаратов по новому показанию.

## **Апробация основных положений работы**

Работа поддержана грантом Президента РФ МД-2687.2005.7.

Результаты исследования представлены на: итоговой конференции студенческого научного общества имени И.И. Мечникова Иркутского государственного медицинского университета в 2006 и 2007 гг. (дипломы первой степени); Российской национальной конференции аллергологов и иммунологов и III Российской конференции по иммуноterapiи (Москва, 2006); V конференции иммунологов Урала (Оренбург, 2006); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2007); Объединенном иммунологическом форуме (Санкт-Петербург, 2008); международной научно-практической конференции «Наука в современном информационном обществе» (Москва, 2013); научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2013).

## **Внедрение в практику**

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе госпитальной хирургической клиники ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России и ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН.

## **Личное участие автора**

Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода, самостоятельно проводил анализ литературы. Автором самостоятельно выполнялись все этапы экспериментальной работы на лабораторных животных, статистическая обработка и интерпретация результатов.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 5 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

## **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, трех глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Изложена на 152 страницах машинописного текста и иллюстрирована 16 таблицами и 62 рисунками. Список используемой литературы включает 243 источника, из них 146 на русском и 97 – на иностранных языках.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### ***Общая характеристика экспериментального материала***

Исследование выполнено на основании серии экспериментов *in vitro*, в которую вошли 480 лабораторных стендовых опытов, и 2 серий хронических экспериментов на 204 белых крысах-самцах линии Вистар в возрасте не менее 6 месяцев, с массой тела 160–320 г. В работе использовали тафцинсодержащие препараты – Спленопид и Селанк.

### ***Характеристика препарата Спленопид***

Препарат Спленопид представляет собой лиофилизированную фракцию пептидов, получаемых из селезенки свиньи, изготовлен в НИИ трансплантологии и искусственных органов (г. Москва), зарегистрирован МЗ РФ 19 января 2002 года. Номер регистрационного удостоверения 001938/01-2002. Использовали препарат серии выпуска F-3. Представляет собой порошок светло-желтого цвета, расфасован во флаконы по 0,23 г в каждом. Флаконы закупорены резиновой пробкой и алюминиевым колпачком. Хранили препарат в условиях холодильника при температуре +5 °С, срок годности препарата указан на каждом флаконе (2 года). Перед применением содержимое флакона растворяли в 5 мл 0,9% раствора хлорида натрия в течение 10 минут, не допуская сильного вспенивания.

### ***Характеристика препарата Селанк***

Препарат Селанк представляет собой синтетический гептапептид группы тафцина (капли назальные 0,15%, код EAN 4607155210078, № ЛСР-003338.09),

изготовлен в НИИ молекулярной генетики РАН. В работе использовали препарат серии выпуска 011105; капли назальные, 0,15% раствор во флаконах по 3 мл. Хранили препарат в соответствии с инструкцией при температуре +8 – +10 °С. Описание: бесцветная прозрачная жидкость. Состав: Селанка в пересчете на 100% вещество – 1,5 мг (треонил-лизил-пролил-аргинил-пролил-глицил-пролина диацетата), метилпарагидроксибензоата (нипагина) – 1 мг, воды очищенной – до 1 мл.

### ***Характеристика экспериментов in vitro***

Эксперименты проводили в лабораторном отделе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России совместно с к.б.н. Л.В. Зарицкой. Для изучения влияния препарата Селанк на фагоцитоз были выполнены стендовые исследования *in vitro* ( $n = 480$ ), лейкоциты выделяли из венозной крови доноров ( $n = 12$ ).

В первой серии стендовых экспериментов ( $n = 120$ ) изучали влияние Селанка на состояние фагоцитарной активности нейтрофилов крови в зависимости от концентрации. Оценивали фагоцитарное число и фагоцитарный индекс. В качестве объекта фагоцитоза применены пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в концентрации  $1-2 \times 10^6$ /мл. Во второй серии стендовых экспериментов ( $n = 120$ ) изучали влияние Селанка на кислородзависимый механизм биоцидности с помощью НСТ-теста при стимуляции Селанком. В третьей серии стендовых экспериментов ( $n = 240$ ) изучали метаболическую активность лейкоцитов с помощью метода ЛХЗЛ, отражающей интенсивность генерации клетками активных форм кислорода под влиянием Селанка в различных концентрациях в зависимости от времени экспозиции.

### ***Характеристика экспериментов in vivo***

Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, соответственно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Оперативные вмешательства проводили в операционной в стерильных условиях под общим обезболиванием – внутримышечный наркоз (кетамин, дроперидол, атропин). Этические аспекты исследования были оценены и одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН в рамках этической экспертизы темы НИР 09 «Хирургические методы профилактики и коррекции органной недостаточности при вмешательствах на органах верхнего этажа брюшной полости» (2007–2012 гг.) – протокол заседания Комитета № 21 от 27 сентября 2006 г.

В исследование включали животных после удаления селезенки и резидуальных очагов селезеночной пульпы (добавочная селезенка, спленоз), после резекции 3/5 селезенки и ложной операции (лапаротомия, подсчет сегментов селезенки). Препараты Селанк и Спленид начинали вводить через 1 час после окончания операции. Для хирургической профилактики и коррекции применяли аутотрансплантацию 2 сегментов селезенки в большой сальник, ксенотрансплантацию криоконсервированных клеток селезенки свиньи с подкожным введением через 1 час после окончания операции.

### ***Оценка уровня летальности, выживаемости и неспецифической резистентности (первая серия экспериментов)***

В первую серию экспериментов включили 84 крысы. С помощью рандомизации животные были распределены на группы следующим образом: № 1 ( $n = 12$ ) – введение Спленида крысам после удаления селезенки; № 2 ( $n = 12$ ) – введение

Селанка после спленэктомии; № 3 ( $n = 12$ ) – введение физиологического раствора после спленэктомии; № 4 ( $n = 12$ ) – аутотрансплантация селезенки (АТС); № 5 ( $n = 12$ ) – ксенотрансплантация криоконсервированной культуры клеток свиной селезенки (ККС) после спленэктомии; № 6 ( $n = 12$ ) – резекция селезенки (РС); № 7 ( $n = 12$ ) – ложная операция (ЛО) (табл. 1).

Таблица 1

**Распределение животных на группы в первой серии экспериментов (исследование летальности и показателей неспецифической резистентности)**

№ группы	Характер воздействия	Количество животных
1	СЭ + ежедневные подкожные инъекции Спленипада 600 мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора	12
2	СЭ + ежедневное интраназальное введение 750 мкг/кг Селанка	12
3	СЭ + ежедневные подкожные инъекции 0,2 мл физиологического раствора	12
4	СЭ + аутотрансплантация 2 сегментов селезенки в большой сальник	12
5	СЭ + подкожная инъекция $2 \times 10^6$ ККС в 1 мл взвеси	12
6	Резекция 3/5 селезенки	12
7	Ложная операция (лапаротомия, ревизия селезенки с подсчетом сосудистых сегментов)	12
<b>Всего</b>		<b>84</b>

После спленэктомии Спленипад вводили ежедневно подкожно в количестве 600 мкг/кг (рекомендуемая доза) в 0,2 мл физиологического раствора. Раствор Селанка 0,15% вводили ежедневно интраназально в дозе 750 мкг/кг (рекомендуемая доза). В качестве контроля аспленизированным крысам выполняли ежедневные инъекции физиологического раствора в объеме 0,2 мл (плацебо). Манипуляции на оперированных животных и контроль летальности проводили в интервале 12–15 ч ежедневно на протяжении 21 суток. На 21-е сутки с целью моделирования септицемии внутривенно вводили *E. coli*  $10^6$  КОЕ. Через сутки после введения инфекта производили забор крови.

Летальность и выживаемость оценивали в течение 21 суток, по окончании эксперимента изучали изменение форменных элементов крови, количество ЦИК, показатели фагоцитоза, кислородзависимый механизм биоцидности фагоцитов с помощью спонтанного и индуцированного НСТ-теста. Забор крови в группах № 2 и № 3 не производили, т.к. все животные этих групп к 21-м суткам эксперимента погибли. Забор крови для лабораторного исследования проводили у всех крыс в утренние часы на голодный желудок. У всех погибших животных производили аутопсию с ревизией органов брюшной полости. У выживших животных после забора крови и эвтаназии производили аутопсию с забором легких, печени, лимфатических узлов.

**Оценка эффективности коррекции послеоперационного гипоспленизма тафцинсодержащими препаратами (вторая серия экспериментов)**

Во второй серии экспериментов 120 крыс распределили на группы аналогичным первой серии образом с учетом полученных данных о выживаемости: № 1 ( $n = 18$ ) – введение Спленипада после удаления селезенки; № 2 ( $n = 18$ ) – введение Селанка после спленэктомии; № 3 ( $n = 24$ ) – введение физиологического раствора после спленэктомии; № 4 ( $n = 18$ ) – АТС; № 5 ( $n = 18$ ) – ККС после спленэктомии;



№ 6 ( $n = 12$ ) – РС; № 7 – ЛО ( $n = 12$ ). На 5-е и 7-е сутки (пик развития гипоспленизма) выполняли забор крови и выведение животных из эксперимента. Изучали: общий анализ крови, лейкоцитарную формулу, общее количество лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, биохимические показатели (общий белок, альбумин, общий билирубин, АЛТ, АСТ). Также проводили аутопсию с ревизией брюшной полости на предмет признаков кровотечения и наличия спленозов, выполняли гистологическое исследование органов (легкие, печень, лимфоузлы).

### **Характеристика методов исследования**

#### ***Техника оперативных вмешательств***

Операции проводили через срединную лапаротомию. Ложная операция заключалась в ревизии органов брюшной полости, подсчете сегментов селезенки, ушивании лапаротомной раны. СЭ производили после перевязки всех сегментарных артерий, а также проводили ревизию брюшной полости на предмет резидуальной селезеночной ткани, при выявлении которой выполнялось ее удаление. АТС выполняли после спленэктомии – два центральных сосудистых сегмента, отмытых физиологическим раствором, погружали кисетным швом в прядь большого сальника. РС выполняли после перевязки сегментарных сосудов, при этом оставляли 2/5 органа с сохраненным кровотоком. ККС проводили через 1 час после спленэктомии подкожно на передней брюшной стенке слева инъекционной иглой в толщу подкожной жировой клетчатки. Подготовку клеток селезенки для трансплантации проводили по оригинальной методике, разработанной в научном отделе экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН.

Кровь для исследований забирали из бедренной вены подопытных крыс под эфирным наркозом. Животных фиксировали к операционному столу в положении на спине. После антисептической обработки операционного поля рассекали кожу на внутренней стороне бедра, обнажали сосуд и проводили венепункцию.

#### ***Определение биохимических показателей сыворотки крови***

Определение биохимических показателей сыворотки крови проводили в лаборатории биохимии Иркутской государственной Ордена «Знак Почета» областной клинической больницы (гл. врач – к.м.н. П.Е. Дудин) на анализаторе «Синхрон-5» (Beckman, США). Исследовали: общий белок, альбумин, общий билирубин, АЛТ, АСТ.

#### ***Иммунологические методы исследований***

Состояние фагоцитарной активности нейтрофилов крови оценивали по следующим параметрам: фагоцитарный индекс (ФИ) – отображает процент нейтрофилов, способных к активному захвату частиц; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число частиц поглощенных одним активным нейтрофилом. В качестве фагоцитируемых частиц использовали суспензию инактивированных дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Для оценки кислородзависимой биоцидности нейтрофилов применяли спонтанный НСТ-тест, основанный на реакции восстановления НСТ до нерастворимой формы – диформозана и отложении его гранул внутри и на поверхности фагоцитов. Результат выражали в количестве диформозан-положительных нейтрофилов (в % от общего количества подсчитанных клеток). Для определения функционального резерва нейтрофилов использовали индуцированный НСТ-тест с добавлением в среду инкубации активатора фагоцитарной

реакции. Уровень ЦИК оценивали спектрофотометрически с использованием метода ПЭГ-преципитации (концентрация полиэтиленгликоля составляла 3,9 %), результат выражали в условных единицах.

#### **Общеклиническое исследование крови**

Общий анализ крови выполняли в лабораторном отделе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (ректор – проф. В.В. Шпрах). Подсчитывали количество эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу крови по общепринятым методикам.

#### **Исследование количества Т-лимфоцитов**

Проточная цитометрия выполнена в лаборатории Иркутской государственной Ордена «Знак Почета» областной клинической больницы (гл. врач – к.м.н. П.Е. Дудин) на двулазерном проточном флуориметре Facs Calibur BD, США с использованием крысиных моноклональных антител к CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> фирмы Coltak.

Референтные значения лабораторных показателей определены у 6 здоровых крыс-самцов линии Вистар.

#### **Методы морфологического исследования**

Обзорная световая микроскопия, контроль жизнеспособности клеток для трансплантации были выполнены в лаборатории патоморфологии (зав. – к.м.н. О.А. Гольдберг). Обзорная световая микроскопия выполнена совместно с О.А. Гольдбергом. Для обзорной световой микроскопии материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. На светооптическом уровне исследовали депарафинированные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, гематоксилином и пикрофуксином.

#### **Методы статистической обработки**

Данные представляли в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля). При нормальном распределении в выборке данные представлены в средних величинах со средней квадратической ошибкой. При нормальном распределении в группах для определения достоверности различий использовали параметрический критерий Стьюдента (опыты *in vitro*). Определение значимости различий полученных данных (*p*) в сравниваемых выборках для двух независимых групп проведено по критерию Манна – Уитни (U), для нескольких независимых групп с помощью критерия Крускала – Уолиса (H). Показатели летальности сравнивали с помощью точного метода Фишера (F). Статистическую значимость различий выживаемости доказывали с помощью F-критерия Кокса. Статистическая обработка результатов произведена с помощью пакета программ Statistica 6.0 for Windows.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В экспериментах *in vitro* Селанк последовательно разводили до конечной концентрации  $0,37 \times 10^{-3}$  мг/мл. При анализе влияния на величину фагоцитарного индекса обнаружена тенденция к стимуляции поглотительной функции нейтрофилов, достигающая максимума при концентрации препарата  $5,86-11,72 \times 10^{-3}$  мг/мл ( $p < 0,05$ ). Концентрации Селанка выше  $23,44 \times 10^{-3}$  мг/мл вызывали снижение фагоцитарного индекса (рис. 1).

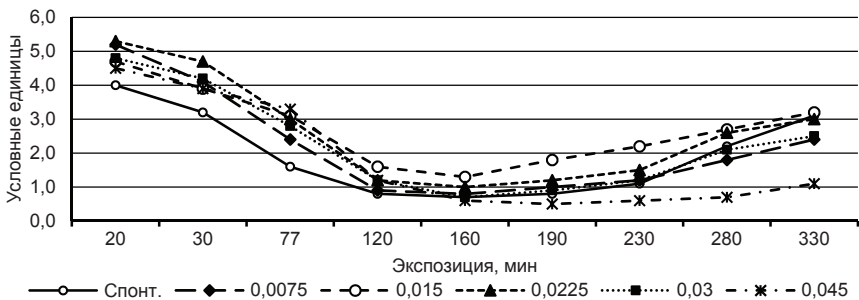


**Рис. 1.** Влияние Селанка на величину фагоцитарного индекса.

При исследовании фагоцитарного числа стимулирующее влияние препарата регистрировалось, начиная с разведения  $5,86 \times 10^{-3}$  мг/мл, а ингибирующее – при концентрации более  $23,44 \times 10^{-3}$  мг/мл. Максимальная активация поглотительной функции нейтрофилов относительно исходной отмечена при концентрации Селанка  $11,72 \times 10^{-3}$  мг/мл ( $p = 0,05$ ). При анализе результатов исследования метаболической активности нейтрофилов выявлено активирующее влияние Селанка на НСТ-тест, также наиболее выраженное при концентрации препарата в среде  $5,86 \times 10^{-3}$  мг/мл ( $p = 0,026$ ). Более высокие концентрации приводили к снижению НСТ-теста, особенно концентрация  $187,5 \times 10^{-3}$  мг/мл ( $p = 0,007$ ).

Добавление Селанка вызывало значимую активацию ЛЗХЛ, по сравнению со спонтанной, при концентрациях препарата от 0,015 до 0,045 мг/мл (рис. 2).

Стимулирующее действие на величину ЛЗХЛ в течение первых 2 часов было практически одинаковым в пробах с концентрациями 0,015–0,045 мг/мл, однако после 2 часов оно сохранялось только для концентрации препарата 0,015 мг/мл. Похожая динамика, но с меньшей амплитудой, отмечена в пробах с концентрацией 0,0225 мг/мл. Более высокие дозы после первоначальной активации приводили к существенному угнетению ЛЗХЛ после 190 и 330 мин экспозиции (концентрация 0,045 и 0,03 мг/мл соответственно), что может свидетельствовать об истощении метаболических резервов лейкоцитов (рис. 2).



**Рис. 2.** Динамика люминолзависимой хемолуминисценции лейкоцитов крови при стимуляции Селанком.

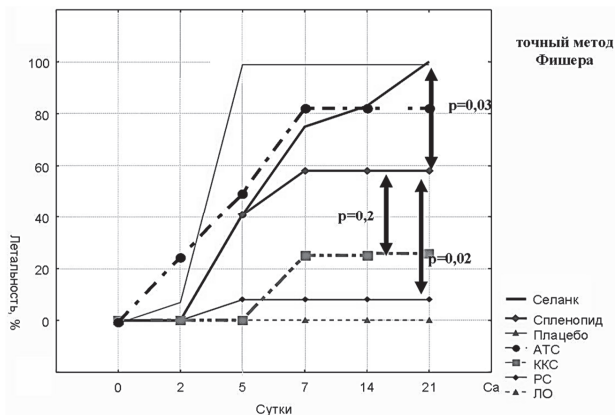
Таким образом, Селанк оказывает стимулирующее влияние на поглотительную и метаболическую функцию нейтрофилов крови *in vitro* в концентрации  $5,86-11,72 \times 10^{-3}$  мг/мл и тормозит активность фагоцитоза при более высоких концентрациях. Селанк оказывает стимулирующее влияние на продукцию лейкоцитами активных форм кислорода в оптимальных концентрациях 0,015–0,0225 мг/мл, а в более высоких дозах подавляет ее.

Стимулирующее влияние Спленопида на активность фагоцитоза *in vitro* было описано К.В. Журавлевым (2011) и в настоящей работе не перепроверялось.

**В первой серии экспериментов** на крысах оценивали летальность и выживаемость после спленэктомии под воздействием тафцинодсодержащих препаратов в течение 21 суток. График летальности представлен на рисунке 3. Данные по выживаемости представлены в таблице 2.

Тот факт, что гибель животных в группах наблюдали с 3–5-х суток после вмешательства на селезенке, позволяет предположить, что на протяжении 1-х суток послеоперационного периода не происходит критического снижения антимикробной резистентности организма, а в дальнейшем развивается истощение компенсаторных резервов, обусловленное индуцированным гипоспленизмом, о чем также сообщает М.В. Прокопьев (2001).

Ближние результаты применения Спленопида и ККС, вероятно, объясняются схожим механизмом саногенного действия, так как в культуре клеток селезенки содержатся активные селезеночные цитокины, накопленные в процессе культивирования [Прокопьев М.В., 2001; Лепехова С.А., 2010], а Спленопид представляет собой готовую лиофилизированную фракцию этих веществ. Скорее всего, по этим же причинам Спленопид оказался эффективнее АТС, обеспечивая большую выживаемость экспериментальных животных (0,41 против 0,16;  $p = 0,05$ ), т.к. длительно регенерирующая ткань селезенки неспособна обеспечить организм необходимыми регуляторными пептидами, контролирующими иммунный ответ.



**Рис. 3.** Летальность в первой серии экспериментов. Значимость различий ( $p$ ) рассчитана с помощью точного метода Фишера.

Таблица 2

**Выживаемость животных в группах в первой серии экспериментов**

Группа	Выживаемость	Стандарт. ошибка	Медиана выживаемости	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Достоверность различий
№ 1	0,41	0,14	8-е сутки	5	–	$p_2 = 0,02$ $p_3 = 0,001$ $p_4 = 0,05$ $p_5 = 0,07$ $p_6 = 0,002$
№ 2	0	–	6-е сутки	5	7	$p_3 = 0,003$ $p_4 = 0,4$ $p_5 = 0,007$ $p_6 < 0,00001$
№ 3	0	–	5-е сутки	5	5	$p_4 = 0,02$ $p_5 = 0,002$ $p_6 < 0,00001$
№ 4	0,16	0,107	5-е сутки	2	7	$p_5 = 0,01$ $p_6 = 0,00005$
№ 5	0,75	0,12	–	–	–	$p_6 = 0,11$
№ 6	0,91	0,07	–	–	–	–

**Примечание:** кумулятивная доля выживших в группах рассчитана по Каплану – Мейеру; достоверность различий проверяли с помощью F-критерия Кокса;  $p_2$  – значимость различий при сравнении с группой № 2;  $p_3$  – с группой № 3;  $p_4$  – с группой № 4;  $p_5$  – с группой № 5;  $p_6$  – с группой № 6.

Результаты выживаемости после резекции селезенки были более успешными, по сравнению с применением тафцинсодержащих препаратов, что вполне объяснимо, т.к. сохранение функциональной пульпы обеспечивает адекватное поступление тафцина и других пептидов селезенки [Шапкин Ю.Г. и др., 2000; Григорьев Е.Г., Апарцин К.А., 2001; Сабиров Ш.Р., 2006; Mossadegh S. et al., 2013].

Моделирование септицемии на 21-е сутки эксперимента путем введения *E. coli*  $10^6$  КОЕ, приводило к существенному повышению лейкоцитов крови животных с введением Спленипада, по сравнению с нормой ( $p_U = 0,003$ ) и ЛО ( $p_U = 0,005$ ). При этом межгрупповых различий у крыс с разными способами профилактики/коррекции постспленэктомического гипоспленизма не было выявлено ( $p_H = 0,4$ ). Процент зрелых нейтрофилов не различался во всех группах ( $p_H = 0,6$ ). Также не различалось процентное отношение эозинофилов ( $p_H = 0,4$ ), моноцитов ( $p_H = 0,9$ ) и лимфоцитов ( $p_H = 0,4$ ). Полученные по окончании эксперимента результаты говорят об отсутствии существенных различий в реактивности животных с разными способами коррекции, переживших критические сроки в течение ПСГ.

Морфология печени и легких характеризуется сохранением структуры и практически не отличается от таковой в группе с ККС. В лимфатических узлах у крыс с введением Спленипада наблюдается активация Т-зависимых зон, что свидетельствует об усилении пролиферации иммунокомпетентных клеток.

Подавление фагоцитарного звена иммунного ответа является одним из основных проявлений постспленэктомического гипоспленизма [Liu D.L., 1995; Burke A., 1998; Попова И.Е., 2006], в то же время основным эффектом тафцина является стимулирующее действие на все этапы фагоцитоза [Najjar V.A., 1970;

Kubo S., 1994; Misra C.K., 2006]. В этой связи изучили изменения основных показателей фагоцитарной активности под воздействием тафцинсодержащих препаратов.

Как видно из таблицы 3, количество нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, у животных с введением Спленипада было в пределах нормы и значимо превышало этот показатель в группах с плацебо и АТС ( $p_U = 0,0038$  и  $p_U = 0,003$  соответственно). Наблюдалась тенденция к значимости различий, по сравнению с ксенотрансплантацией ( $p_U = 0,07$ ), при этом медиана в группе животных с введением Спленипада была выше. Отличий от животных с сохраненной и резецированной селезенкой не наблюдалось ( $p_U = 0,22$  и  $p_U = 0,28$  соответственно) (рис. 4).

Фагоцитарный индекс в группе с интраназальным введением Селанка также был в пределах нормальных значений, превышал таковой, в группах с введением плацебо и АТС ( $p_U = 0,0039$  и  $p_U = 0,004$  соответственно). Наблюдалась тенденция к значимости различий, по сравнению с ККС ( $p_U = 0,076$ ). Различий с животными, перенесшими РС и ЛО, не было ( $p_U = 0,6$  и  $p_U = 0,47$  соответственно). Также не было различий между группами с введением Спленипада и Селанка ( $p_U = 0,7$ ) (табл. 3, рис. 4).

Поглотительная способность фагоцитов в группах животных, получавших тафцинсодержащие препараты, была в пределах нормальных показателей и не различалась между этими группами ( $p_U = 0,73$ ).

В группе с введением Спленипада фагоцитарное число превышало таковое в группах с плацебо и АТС ( $p_U = 0,003$  и  $p_U = 0,006$  соответственно), наблюдалась тенденция к значимости различий, по сравнению с ККС ( $p_U = 0,06$ ), при этом отличий от животных с РС и ЛО не было ( $p_U = 0,33$  и  $p_U = 0,6$  соответственно) (табл. 3).

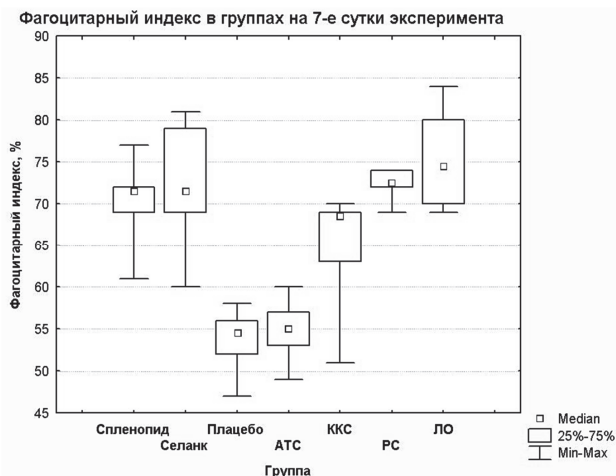
Подобная же картина наблюдалась при оценке фагоцитарного числа в группе с введением Селанка (табл. 3).

Таблица 3

**Показатели фагоцитоза у животных на 7-е сутки эксперимента  
(медиана, верхний и нижний квартили)**

	Экспериментальные группы						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
ФИ (%)	71,5 (69–72)	71,5 (69–79)	54,5*:* <sup>◊</sup> (52–56)	55*:* <sup>◊</sup> (53–57)	68,5 (63–69)	72,5 (72–74)	74,5 (70–80)
	Норма – 65–95 %						
ФЧ	1,95 (1,9–2,0)	2 (1,9–2,1)	1,5*:* <sup>◊</sup> (1,4–1,6)	1,55*:* <sup>◊</sup> (1,5–1,6)	1,85 (1,7–1,9)	1,9 (1,9–2,0)	1,9 (1,9–2,0)
	Норма – 1,9 (1,9–1,9)						
НСТ <sub>сп.</sub> (%)	2* (2–6)	8,5*:* <sup>◊</sup> (8–10)	1*:* <sup>◊</sup> (1–1)	2* <sup>◊</sup> (2–3)	3,5 <sup>◊</sup> (3–4)	4 (4–5)	5 (4–5)
	Норма – 4,0 (4,0–5,0)						
НСТ <sub>инд.</sub> (%)	9,5 <sup>◊</sup> (8–10)	10 <sup>◊</sup> (8–14)	2*:* <sup>◊</sup> (2,5–5)	3*:* <sup>◊</sup> (2–3)	11 <sup>◊</sup> (9–11)	16,5 (9–18)	17,5* (16–18)
	Норма – 15,0 (14,0–16,0)						

**Примечание:** \* – значимые различия по критерию Манна – Уитни, по сравнению с группой с введением Спленипада; \* – по сравнению с группой с введением Селанка; <sup>◊</sup> – по сравнению с нормой.



**Рис. 4.** Фагоцитарный индекс в группах на 7-е сутки эксперимента.

При оценке спонтанного теста с НСТ выявили, что в группе с введением Спленопида этот показатель выше, чем в группе с плацебо ( $p_U = 0,04$ ), в то же время ниже, чем в группе с введением Селанка ( $p_U = 0,04$ ), и не отличается от аналогичного показателя в группах с АТС ( $p_U = 0,7$ ), ККС ( $p_U = 0,2$ ), РС ( $p_U = 0,3$ ) и ЛО ( $p_U = 0,2$ ). Селанк способствовал увеличению этого показателя, по сравнению с плацебо, АТС и Спленопидом ( $p_U = 0,007$ ,  $p_U = 0,01$  и  $p_U = 0,04$  соответственно). Различий с другими группами не наблюдалось: животные после ККС ( $p_U = 0,1$ ), РС ( $p_U = 0,16$ ), ЛО ( $p_U = 0,25$ ) (табл. 3).

При изучении индуцированного теста с НСТ установили, что под влиянием Спленопида этот показатель был выше, чем при введении плацебо и после АТС ( $p_U = 0,003$  и  $p_U = 0,003$  соответственно). Различий с животными, перенесшими ККС и РС, не было ( $p_U = 0,11$  и  $p_U = 0,07$  соответственно). При этом в группе с ЛО процент НСТ-положительных нейтрофилов был выше, чем в группе с введением Спленопида ( $p_U = 0,003$ ). Селанк также способствовал увеличению этого показателя, по сравнению с плацебо и АТС ( $p_U = 0,003$  и  $p_U = 0,003$  соответственно), уступал ЛО ( $p_U = 0,004$ ) и не отличался от ККС и РС ( $p_U = 0,5$  и  $p_U = 0,075$  соответственно). Различий между группами с введением Спленопида и Селанка не было ( $p_U = 0,51$ ) (табл. 3).

Иммунодефицит у спленэктомированных животных сопровождался снижением фагоцитарной активности, что корригировалось применением тафцинсодержащих препаратов. Введение как синтетического тафцина, так и природных пептидов селезенки способствовало нормализации фагоцитарной активности нейтрофилов и их поглотительной способности, не имея различий с органосохраняющими операциями и ККС. Показано, что тафцинсодержащие препараты способствуют сохранению кислородзависимого механизма биоцидности фагоцитов, о чем свидетельствуют показатели НСТ-тестов в спонтанном и индуцированном вариантах. Таким образом,

стимулирующие фагоцитоз эффекты синтетического тафцина, описанные нами в опытах *in vitro*, а также эффекты Спленипада, опубликованные ранее другими авторами [Макаров А.А., 2001; Журавлев К.В., 2011], нашли свое подтверждение в опытах на экспериментальных животных в условиях отсутствия селезеночной пульпы. Стимуляция фагоцитоза является одним из важных саногенных эффектов тафцинсодержащих препаратов, оказывающих воздействие на основное звено развития постспленэктомического иммунодефицита – депрессию фагоцитарной активности.

Для оценки пролонгированного влияния коррекции тафцинсодержащими препаратами на фагоцитоз эти же показатели изучили по окончании эксперимента (21-е сутки) после внутривенного введения *E. coli*.

Анализ количества нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, показал, что во всех группах под воздействием различных способов коррекции ФИ оставался в пределах нормальных значений к 21-м суткам эксперимента, и не различался во всех группах ( $p_H = 1,0$ ). Также во всех группах сохранялась поглотительная способность нейтрофилов, что характеризовалось нормальным средним количеством микробных частиц, поглощенных одним нейтрофилом. Различий ФЧ не было при всех способах коррекции/профилактики ( $p_H = 0,3$ ) (табл. 4).

В изучаемых условиях показатель восстановления НСТ фагоцитами в спонтанном тесте под влиянием Спленипада к 21-м суткам не отличался от нормы ( $p_U = 0,2$ ). При этом во всех остальных группах наблюдалось снижение этого показателя, по сравнению с нормальными значениями: АТС ( $p_U = 0,04$ ), ККС ( $p_U = 0,002$ ), РС ( $p_U = 0,003$ ), ЛО ( $p_U = 0,007$ ). Процент восстановления НСТ в индуцированном тесте снижался во всех группах, по сравнению с нормой: коррекция Спленипадом ( $p_U = 0,003$ ), АТС ( $p_U = 0,04$ ), ККС ( $p_U = 0,003$ ), РС ( $p_U = 0,003$ ), ЛО ( $p_U = 0,003$ ). При этом в группе с введением Спленипада этот показатель превышает таковой в группе с ККС ( $p_U = 0,05$ ) (табл. 4).

Результаты исследования показателей фагоцитоза крови экспериментальных животных на 21-е сутки показали, что стимулирующее действие Спленипада на фагоцитоз сохраняется на протяжении всего изученного послеоперационного периода.

Таблица 4

**Показатели фагоцитоза у животных на 21-е сутки эксперимента (медиана, верхний и нижний квартили)**

	Экспериментальные группы				
	Спленипад	АТС*	ККС	РС	ЛО
ФИ (%)	67 (59–74)	67 (64–70)	69 (65–77)	68 (66–77)	64 (59–70)
	Норма – 65–95 %				
ФЧ	3,35 (2,9–3,5)	3,15 (2,9–3,4)	2,95 (2,7–3,1)	3,65 (3,3–3,9)	3,2 (2,9–4,1)
	Норма – 1,9 (1,9–1,9)				
НСТ <sub>сп.</sub> (%)	2,5 (1,0–5,0)	1,0 <sup>◊</sup> (1,0–1,0)	1,5 <sup>◊</sup> (1,0–2,0)	2,0 <sup>◊</sup> (1,0–2,0)	2,0 <sup>◊</sup> (1,0–2,0)
	Норма – 4,0 (4,0–5,0)				
НСТ <sub>инд.</sub> (%)	2,5 <sup>◊</sup> (2,0–4,0)	1,5 <sup>◊</sup> (1–2)	1,5 <sup>*◊</sup> (1,0–2,0)	2,0 <sup>◊</sup> (2,0–3,0)	2,5 <sup>◊</sup> (2,0–3,0)
	Норма – 15,0 (14,0–16,0)				

**Примечание:** \* – значимые различия по критерию Манна – Уитни, по сравнению с группой с введением Спленипада; ◊ – по сравнению с нормой; \* – в группе выжило 2 крысы.



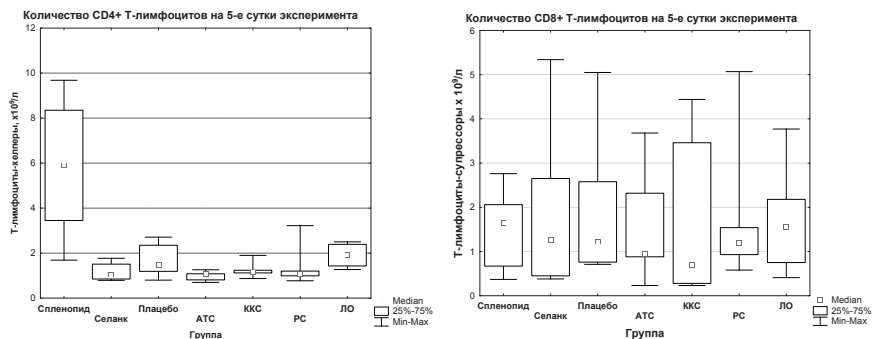
Несмотря на то, что синтетический тафцин обладает выраженным стимулирующим фагоцитоз эффектом, животные, получавшие для коррекции гипоспленизма Селанк, не дожили до конца эксперимента, хотя в этой группе две крысы пережили пик летальности и погибли после 16-х суток послеоперационного периода. Можно предположить, что имел место описанный нами выше факт истощения метаболических резервов лейкоцитов с течением времени под действием рекомендованных доз Селанка.

При определении количества ЦИК в крови животных через сутки после введения инфекта (*E. coli*), установлено, что в группе с введением Спленипада их количество (5,5 (1–8) у.е.) было существенно ниже, нежели в других группах: АТС – 23 (14–32) у.е. ( $p_U = 0,05$ ), ККС – 30,5 (29–67) у.е. ( $p_U = 0,004$ ), РС – 30,5 (27–35) у.е. ( $p_U = 0,01$ ), ЛО – 22,5 (16–50) у.е. ( $p_U = 0,02$ ). Состоящие из антигена, антитела и компонента ЦИК в норме поглощаются макрофагами [Назаренко Г.И., Кишкун А.А., 2000], таким образом, выявлен еще один эффект Спленипада – улучшение элиминации ЦИК, обусловленный, вероятно, стимуляцией фагоцитарной активности макрофагов.

Одним из механизмов развития постспленэктомического иммунодефицита является нарушение пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов [Павлова И.Е., 2006; Масляков В.В., 2011; Tuchscherer D., 2013]. В этой связи представляет большой интерес изучение влияния тафцинсодержащих препаратов на Т-клеточное звено иммунитета. В соответствии со сроками наиболее манифестных проявлений ПСГ, анализ изменения Т-клеточного состава провели на 5-е и 7-е сутки эксперимента.

Установлено, что на фоне выраженного лейкоцитоза ( $20,97 \times 10^9/\text{л}$ ) в группе с введением Спленипада, начиная с 5-х суток, происходит усиление пролиферации лимфоцитов ( $9,88 \times 10^9/\text{л}$ ) и, в частности, Т-клеток ( $\text{CD}3^+$ ) ( $7,2 \times 10^9/\text{л}$ ), количество которых превышает таковое, по сравнению с другими группами. При введении Селанка общее количество лимфоцитов составляет  $4,66 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,03$ ), Т-лимфоцитов –  $2,55 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,01$ ); в группе с введением плацебо общее количество лимфоцитов –  $4,8 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,015$ ), Т-лимфоцитов –  $3,53 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,02$ ); в группе с АТС –  $3,07 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,002$ ) и  $2,39 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,005$ ); в группе с ККС –  $3,09 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,005$ ) и  $1,99 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,009$ ); в группе с РС –  $7,18 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,6$ ) и  $2,13 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0009$ ); в группе с ЛО –  $4,98 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,01$ ) и  $2,82 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,01$ ) соответственно.

При изучении фенотипа Т-лимфоцитов, установлено, что в группе с введением Спленипада преобладала дифференцировка в сторону Т-лимфоцитов-хелперов ( $5,9 \times 10^9/\text{л}$ ), количество которых, уже начиная с 5-х суток, превышало таковое по сравнению с другими группами: после введения Селанка количество  $\text{CD}4^+$ -лимфоцитов составило  $1,05 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0004$ ), плацебо –  $\text{CD}4^+$ -лимфоцитов –  $1,46 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0009$ ), АТС –  $1,08 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0005$ ), ККС –  $1,14 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0004$ ), РС –  $1,05 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,0004$ ), ЛО –  $1,92 \times 10^9/\text{л}$  ( $p_U = 0,002$ ) (рис. 5). При этом количество  $\text{CD}8^+$ -Т-лимфоцитов во всех группах не различалось ( $p_H = 0,82$ ) (рис. 5).



**Рис. 5.** Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в группах на 5-е сутки эксперимента.

Описанный ранее А.А. Косых с соавт. эффект стимуляции Т-лимфоцитов при введении Спленопида пациентам с сохраненной селезенкой, заключающийся в увеличении индекса дифференцировки за счет увеличения Т-лимфоцитов-хелперов [Косых А.А., 2011], нашел подтверждение в наших исследованиях и проявляет себя в условиях аспленизации как саногенный фактор. На 7-е сутки сохраняется описанное действие Спленопида в виде пролиферации Т-лимфоцитов за счет Т-хелперного звена, при этом более выражено, чем в группе с ксенотрансплантацией ( $p_U = 0,04$ ). Морфологическим эквивалентом увеличения количества Т-клеток под действием препарата является активация Т-зависимых зон лимфатических узлов.

Синтетический тафцин (Селанк) не проявил себя как стимулятор Т-лимфатического ответа ни на 5-е, ни на 7-е сутки, и по результатам не отличался от плацебо. Отсутствие этого эффекта, наряду с предположительным истощением метаболических резервов лейкоцитов, считаем причинами недостаточной коррекции иммунологических гипоспленических расстройств на фоне введения препарата.

Кроме иммуногенных свойств тафцинсодержащих препаратов, изучили их влияние на течение анемии в условиях гипоспленизма. В нашем исследовании анемия в группе аспленизированных животных протекала в тяжелой форме, количество эритроцитов крови у крыс с введением плацебо составило  $0,99 \times 10^{12}/л$  ( $0,92-1,08$ ) на 7-е сутки эксперимента, что подтверждает известные данные [Прокопьев М.В., 2001; Лепехова С.А., 2010]. В группе со Спленопидом количество эритроцитов ( $2,55 \times 10^{12}/л$  ( $2,39-3,29$ )) было больше, чем в группе с введением плацебо ( $p_U = 0,003$ ) и после АТС ( $p_U = 0,003$ ), не отличаясь от групп с РС ( $p_U = 0,8$ ) и ККС ( $p_U = 0,7$ ). Отметим, что введение Селанка практически полностью корригировало анемию, на 7-е сутки количество эритроцитов крови ( $4,25 \times 10^{12}/л$  ( $4,1-4,7$ )) в группе с введением Селанка превышало все группы, уступая лишь ЛО ( $6,05 \times 10^{12}/л$  ( $5,9-6,18$ )) ( $p_U = 0,003$ ). По окончании эксперимента (21-е сутки) количество эритроцитов ( $5,63 \times 10^{12}/л$  ( $5,4-5,98$ )) в группе с введением Спленопида не отличалось от нормы ( $p_U = 0,68$ ), в то время как в группах с АТС и ККС сохранялась анемия ( $p_U = 0,04$  и  $p_U = 0,03$ ).

Более легкое течение анемии после СЭ и полное ее купирование по окончании эксперимента под действием тафцинсодержащих препаратов, по нашему мне-

нию, играет одну из ключевых ролей в саногенезе при ПСГ, так как достаточное количество эритроцитов обеспечивает адекватный транспорт кислорода клеткам, предотвращает развитие ацидоза в условиях септического процесса и возможно участвует в сохранении кислородзависимого механизма биоцидности фагоцитов.

Установлено, что Спленопид способствовал сохранению белковосинтетической функции печени лучше, чем Селанк, при этом сохранял этот эффект на всем протяжении эксперимента, что подтверждается более высоким уровнем альбумина (11 (10–12) г/л) и общего белка (62,5 (62–64) г/л) крови, по сравнению с крысами после АТС (8 (8–9) г/л,  $p_U = 0,004$  и 59 (58–60) г/л,  $p_U = 0,003$ ) по окончании эксперимента. При этом различий по содержанию альбумина крови по сравнению с другими группами не было ( $p_H = 0,8$ ), также не было различий по содержанию общего белка с группами после ККС ( $p_U = 0,5$ ) и РС ( $p_U = 0,6$ ). Сохранение синтетической функции печени в условиях гипоспленизма, сравнимое с такими эффективными методами как ККС и органосохраняющая операция, говорит о хорошем протезировании функции селезенки путем введения ее активных веществ в составе Спленоида.

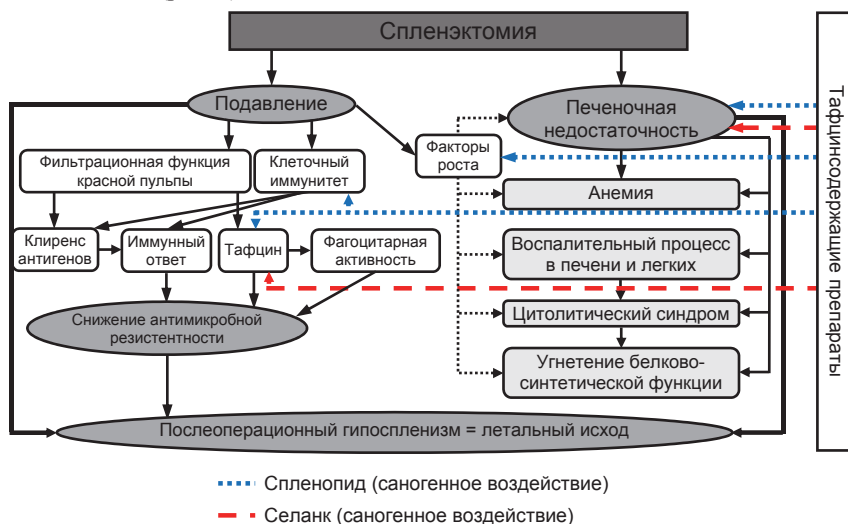
При оценке выраженности цитолитического синдрома под воздействием тафцинсодержащих препаратов на пике развития постспленэктомического гипоспленизма (7-е сутки эксперимента) установили, что повышения АЛТ в группах животных, получавших в качестве терапии тафцинсодержащие препараты, не было (группа с введением Спленоида – 57 МЕ/л, Селанка – 42,5 МЕ/л). Выраженный цитолитический синдром наблюдался в группе аспленизированных крыс с введением плацебо – 153,5 МЕ/л, при этом наблюдались значимые различия, по сравнению с группами с введением Спленоида ( $p = 0,003$ ) и Селанка ( $p = 0,003$ ). В группах с ККС и РС наблюдалось незначительное повышение АЛТ – 62,5 и 65,5 МЕ/л соответственно. В группах животных после АТС и ЛО значение АЛТ было в пределах нормальных значений. Отсутствие цитолиза в группах, получавших тафцинсодержащие препараты, подтверждается морфологически сохранением балочной структуры печени, в то время как в группе с плацебо наблюдался некроз гепатоцитов.

Таким образом, применение тафцинсодержащих препаратов при синдроме постспленэктомического гипоспленизма является эффективным методом, снижающим летальность (Спленопид) и повышающим выживаемость аспленизированных крыс. Заместительная терапия препаратами тафцина имеет четкое теоретическое и экспериментальное обоснование, воздействует на основные патогенетические механизмы развития гипоспленизма, не уступает по эффективности (Спленопид) изученным ранее действенным способам лечения и профилактики ранних осложнений после спленэктомии. Установленный факт отсутствия снижения летальности на 21-е сутки на фоне введения Селанка, возможно, объясняется несоответствием выбранной дозы (рекомендованная в аннотации для назального введения в пересчете на массу тела лабораторного животного) поставленной задаче.

Метод может быть рекомендован для клинических исследований применения по новому назначению – IIIb фаза для последующего применения в клинической практике. При этом назначение Спленоида (исходя из существующих показаний к его применению) представляется более обоснованным для профилактики гной-

но-воспалительных проявлений гипоспленизма в раннем послеоперационном периоде, а Селанка (из тех же соображений) – для профилактики или коррекции астенического синдрома, как следствия развития гипоспленизма. К сожалению, в настоящее время Спленопид отсутствует в Государственном реестре лекарственных средств (<http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>, обновленный поиск 26 сентября 2013 г.), в связи с чем его клинические исследования не могут быть проведены на территории Российской Федерации, однако полученные нами данные, безусловно, подтверждают доклиническую эффективность данного препарата для заместительной терапии тафциновой недостаточности после аспленизации. Что касается Селанка, то представленные в работе результаты могут явиться частью комплекса доклинических исследований эффективности его применения для коррекции тафциновой недостаточности как патогенетического механизма формирования ПСГ.

Полученные результаты легли в основу концептуальной схемы саногенного воздействия тафцинсодержащих препаратов на патогенез постспленэктомического гипоспленизма (рис. 6).



**Рис. 6.** Концептуальная схема саногенного воздействия тафцинсодержащих препаратов на развитие синдрома постспленэктомического гипоспленизма.

В аспекте трансляции результатов проведенных исследований в клиническую практику представляется, что гипотеза тафциновой недостаточности как компонента ПСГ может быть положена в основу перспективного направления патогенетической медикаментозной коррекции этого состояния, что требует переноса исследований на стадию клинических испытаний. Проведена экспериментальная разработка метода профилактики осложнений в раннем послеоперационном периоде после удаления селезенки при ее заболеваниях или повреждениях – еще одного направления, расширяющего возможности хирургии селезенки.

## ВЫВОДЫ

1. Введение тафцинсодержащих препаратов способствует повышению выживаемости на модели тафциновой недостаточности, вызванной гипоспленизмом, индуцированным хирургическим путем. Назначение Спленопида приводит к статистически значимому снижению летальности у аспленизированных крыс до 21-х суток наблюдения, по сравнению с плацебо ( $p_F = 0,03$ ) и Селанком ( $p_F = 0,03$ ). Введение Селанка не снижает летальность на 21-е сутки эксперимента.

2. Синтетический аналог тафцина Селанк в концентрациях  $5,86-11,72 \times 10^{-3}$  мг/мл обладает максимальным стимулирующим действием на фагоцитарную активность донорских нейтрофилов *in vitro*. Выявлено стимулирующее дозозависимое действие Селанка на фагоцитоз за счет увеличения фагоцитарного индекса, поглотительной способности, активации кислородзависимого механизма биоцидности и усиления метаболизма лейкоцитов.

3. Эффективность коррекции тафцинсодержащими препаратами гипоспленизма, вызванного хирургическим вмешательством на селезенке, обусловлена сохранением белковосинтетической функции печени, купированием цитолитического синдрома, анемии, ограничением воспалительной реакции легких и печени.

4. Патогенетически направленное применение тафцинсодержащих препаратов при гипоспленизме, индуцированном хирургическим вмешательством на селезенке в раннем послеоперационном периоде, способствует активации неспецифической резистентности за счет увеличения количества фагоцитирующих нейтрофилов, их поглотительной способности, сохранения кислородзависимого механизма биоцидности, элиминации циркулирующих иммунных комплексов. Спленопид усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов с дифференцировкой в сторону Т-хелперного звена иммунного ответа. Морфологическим эквивалентом стимуляции клеточного иммунитета под действием Спленопида является пролиферация Т-зависимых зон в лимфоузлах.

5. Саногенные механизмы воздействия тафцинсодержащих препаратов на проявления постспленэктомического гипоспленизма в эксперименте совпадают с известными эффектами эндогенного тафцина, что позволяет рассматривать их применение в качестве способа профилактики или коррекции приобретенной тафциновой недостаточности после спленэктомии.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При наличии выраженных проявлений гипоспленизма в раннем послеоперационном периоде показано назначение препарата Селанк (назальные капли) под контролем фагоцитарной активности клеток крови.

2. Введение препарата Спленопид (после повторной регистрации его в Государственном реестре лекарственных средств) для коррекции инфекционно-воспалительных осложнений спленэктомии следует проводить в дозировке, рекомендованной в инструкции по применению.

3. Нарушение антимикробной, противовирусной резистентности после спленэктомии является показанием к применению Спленопида.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Григорьев С.Е., Батеха В.И. Оценка эффективности медикаментозной коррекции постспленэктомического гипоспленизма // 73-я итоговая конференция студенческого научного общества им. И.И. Мечникова: Тез. докл. – Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2006. – С. 9.
2. Григорьев С.Е. Влияние заместительной коррекции постспленэктомического гипоспленизма препаратом Спленопид на состояние иммунной системы в эксперименте // 74-я итоговая конференция студенческого научного общества им. И.И. Мечникова: Тез. докл. – Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2007. – С. 14.
3. **Апарцин К.А., Зарицкая Л.В., Григорьев С.Е., Лепехова С.А. Возможности применения препарата селанк для медикаментозной коррекции постспленэктомического гипоспленизма // Аллергология и иммунология. – 2006. – Т. 7, № 3. – С. 429.**
4. Григорьев С.Е., Лепехова С.А., Апарцин К.А. Оценка эффективности медикаментозной коррекции постспленэктомического иммунодефицита // Иммунология Урала. Матер. V конф. иммунологов Урала (Оренбург, 30 октября – 1 ноября 2006 г.). – 2006. – № 1 (5). – С. 94–95.
5. Григорьев С.Е., Лепехова С.А., Зарицкая Л.В., Апарцин К.А. Коррекция постспленэктомического иммунодефицита в эксперименте // Сиб. консилиум. Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Матер. 3-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. (Новосибирск, 7–9 ноября 2007 г.). – Новосибирск, 2007. – № 7 (62). – С. 32.
6. **Григорьев С.Е., Лепехова С.А. Апарцин К.А. Коррекция постспленэктомического гипоспленизма препаратом Спленопид в эксперименте // Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2 (11), № 2–3. – С. 191–192.**
7. **Апарцин К.А., Гумеров Р.Р., Галеев Ю.М., Попов М.В., Гольдберг О.А., Григорьев С.Е., Травников А.И., Дехнич В.М. Диссеминированный спленоз после спленэктомии // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2009. – № 10. – С. 53–55.**
8. **Каргин А.Г., Апарцин К.А., Хороших О.В., Григорьев С.Е., Зарицкая Л.В., Батунова Е.В., Прокопьев М.В., Лепехова С.А. Изменение субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток вследствие аспленизации // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2009. – Т. 89, № 6. – С. 105–106.**
9. **Каргин А.Г., Рой Т.А., Апарцин К.А., Зарицкая Л.В., Постовая О.Н., Батунова Е.В., Лепехова С.А., Прокопьев М.В., Григорьев С.Е., Кувшинов А.Г. Развитие иммунодефицита вследствие аспленизации // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2009. – Т. 90, № 7. – С. 100–101.**
10. Григорьев С.Е., Зарицкая Л.В., Лепехова С.А., Апарцин К.А. Метаболическая коррекция тафциновой недостаточности при гипоспленизме // Матер. докл. междунар. науч.-практ. конф. «Наука в современном информационном обществе» (Москва, 3–4 апреля 2013 г.). – М., 2013. – Т. 1. – С. 23–27.
11. Григорьев С.Е., Лепехова С.А., Апарцин К.А. Трансляционные исследования тафцинсодержащих препаратов для коррекции постспленэктомического гипоспленизма // Матер. науч. конф. «Фундаментальные науки медицине», посв. 10-летию медицинского факультета НГУ (Новосибирск, 16–20 октября 2013 г.). – Новосибирск, 2013. – С. 124–125.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АТС	– аутотрансплантация селезенки
ККС	– ксенотрансплантация клеток селезенки
КОЕ	– колониобразующие единицы
ЛО	– ложная операция
ЛХЗЛ	– люминолзависимая хемилюминесценция
НСТ	– нитросиний тетразолий
ПСГ	– постспленэктомический гипоспленизм
РС	– резекция селезенки
СЭ	– спленэктомия
ФИ	– фагоцитарный индекс
ФЧ	– фагоцитарное число
ЦИК	– циркулирующие иммунные комплексы

---

Подписано в печать 20.11.2013. Бумага офсетная. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № 102-13.

---

РИО НЦРВХ СО РАМН

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел 29–03–37. E-mail: arleon58@gmail.com)