

Основные показатели течения и исхода родов в исследуемых группах, (M±m)

Параметры	Первая группа (n =32)	Вторая группа (n =32)	Третья группа (n =32)
Спонтанное начало родов	22 (68,8%)	20 (62,5%)	21 (65,6%)
Амниотомия	7 (21,9%)	8 (25,0%)	8 (25,0%)
Дородовое излитие околоплодных вод	3 (9,4%)	4 (12,5%)	3 (9,4%)
Слабость родовой деятельности	2 (6,2%)	4 (12,5%)	5 (15,6%)
Дискоординация родовой деятельности	4 (12,5%)*	—	—
Общая продолжительность родов	7,1±0,4	7,0±0,4	7,6±0,5
Длительность безводного периода	4,8±0,3	5,6±0,3	5,2±0,5
Кесарево сечение	6 (18,8%)	4 (12,5%)	7 (21,9%)
Роды через естественные родовые пути	26 (81,2%)	28 (87,5%)	25 (78,1%)
Кровопотеря (мл): –самопроизвольные роды – кесарево сечение	234,6±5,4 516,7±16,7	235,7±7,7 550,0±28,9	226,1±6,2 514,3±14,3

Примечание: * – p<0,05.

деятельности успешно корригировалась медикаментозно (энзапрост Ф 2,5 мг и окситоцин 2,5 ЕД). При этом длительность родостимуляции не превышала 3,5 ч. Дискоординация родовой деятельности отмечалась только у 4 рожениц (12,5%) в первой группе после дополнительного интрацервикального введения простагландинов. При этом в 2 случаях на фоне нарушения сократительной деятельности матки отмечалось развитие дистресс-синдрома плода, в связи с чем было проведено экстренное кесарево сечение. Таким образом, процент родов, законченных оперативным путем, составлял от 12,5% до 21,9% (p>0,05). При этом у пациенток третьей группы оперативное родоразрешение проводилось в основном с перинатальных позиций. Полученные результаты были сопоставимы с ранее проведенными исследованиями, по данным которых частота кесарева сечения после подготовки шейки матки к родам мифепристомом колебалась от 14,0% до 23,3% [3, 5].

Перинатальных потерь не было. Большинство новорожденных родилось в удовлетворительном состоянии с оценкой по шкале Апгар 7–8 баллов и выше. В состоянии асфиксии в первой группе родилось двое (6,2%) детей (6 – 7 баллов), во второй группе трое (9,4%) (в одном случае оценка по Апгар составила 4–7 баллов, имело место двукратное тугое обвитие пуповины и в двух – 6–7

баллов). В третьей группе в состоянии асфиксии родилось 5 детей (15,6%): у трех из них оценка по Апгар составила 6–7 баллов и в двух наблюдениях – 4–7 баллов (роды осложнились слабостью родовой деятельности, дети извлечены с тугим обвитием пуповины). Ранний неонатальный период в большинстве наблюдений протекал без осложнений. Нарушение мозгового кровообращения I степени гипоксически-ишемического генеза было диагностировано у двух новорожденных (6,3%) в первой и второй группах в каждой и у 4 детей (12,5%) в третьей группе (p>0,05).

Число послеродовых осложнений у рожениц, получавших подготовку мифепристомом, связанных с нарушением инволюции матки было незначительным и наблюдалось в 6,3% случаев в каждой группе. Благоприятное течение послеродового периода у большинства пациенток трех групп свидетельствовало об отсутствии отрицательного влияния мифепристона на инволютивные процессы в миометрии.

Результаты проведенного исследования показали, что применение мифепристона при исходно "незрелой" шейке матки (1–4 балла) является недостаточным и требует дополнительного местного использования простагландинов, что в свою очередь может повышать риск развития гиперстимуляции миометрия и как следствие – развитие дистресса плода. Наибольший эффект исполь-

зования мифепристона отмечен при исходной готовности родовых путей не менее 5 баллов по шкале Бишопа. В связи с этим у беременных с исходно "незрелой" шейкой матки наиболее эффективным, безопасным и экономически более выгодным является сочетание мифепристона с предшествующим введением литической смеси или натрия оксibuтирата (при признаках нарушения жизнедеятельности плода и фетоплацентарной недостаточности).

Таким образом, рациональный подход к выбору метода подготовки к родам с использованием мифепристона, учитывающий исходное состояние родовых путей и особенности течения беременности, позволяет добиться оптимального уровня "созревания" шейки матки и обеспечить благоприятный исход родов для матери и плода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамченко В.В.* Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве (Оксидативный стресс в акушерстве и его терапия антиоксидантами и антигипоксантами). – СПб.: ДЕАН, 2001. – 400 с.
2. *Белоцерковцева Л.Д., Коваленко Л.В., Петина Ю.В.* Особенности ведения индуцированных родов при пролонгированной беременности // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Т. 13, № 3. – С. 106–108.
3. *Гаспарян Н.Д., Карева Е.Н.* Мифепристон в подготовке и индукции родов // Акушерство и гинекология. – 2008. – № 3. – С. 50–53.
4. *Подтетенев А.Д., Стрижова Н.В.* Аномалии родовой деятельности: рук. для врачей. – М.: МИА, 2006. – 128 с.
5. *Сидорова И.С., Габриелян А.Р.* Эффективность различных методов подготовки шейки матки к родам при перенашивании беременности // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2004. – № 6. – С. 24–27.

УДК 616-001.17:611-013.11.003.1

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ

© *Ледовской С.Н., Лазаренко В.А., **Бурда Ю.Е.

* Ожоговое отделение Белгородской областной клинической больницы святителя Иоасафа, Белгород;
Курский государственный медицинский университет, Курск;
** отделенческая больница на ст. Курск ОАО "РЖД"
E-mail: j.e.burda@gmail.com

Исследовали экономическую эффективность применения трансплантации аллогенных диплоидных фибробластов (АДФ) различной степени зрелости в лечении пограничных ожогов IIIA ст. у 30 больных в возрасте от 20 до 67 лет. Несмотря на сопоставимую клиническую эффективность, фибробласты различной степени зрелости отличаются по своим функциональным свойствам и требуют дифференцированных подходов к культивированию. Формирование монослойной культуры эмбриональных фибробластов (ЭФ) происходило примерно в 5,74 раза быстрее, чем зрелых кожных фибробластов (ЗКФ). С целью оптимизации протокола получения АДФ была предпринята попытка сокращения объема наиболее дорогостоящего компонента – эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и замены ее на сыворотку крупного рогатого скота (СКРС). Выявлено, что уменьшение концентрации сыворотки в культуральной среде являлось критичным для деления ЭФ, но источник сыворотки не имел значения. В то же время в отличие от ЭФ попытка заменить ЭТС частично или полностью на СКРС вела к прекращению деления зрелых фибробластов. Для сохранения же культурами способности к пролиферации в условиях пассирования *in vitro* на различных вариантах культуральных сред оптимальной для поддержания жизнеспособности при длительном пассировании ЭФ следует признать среду с содержанием 10% СКРС, а для ЗКФ – 10% ЭТС. При этом себестоимость получения ЭФ оказалась в 12,844 раза дешевле, чем ЗКФ, а поддержание культуры ЭФ дешевле в 2,77 раза по сравнению с ЗКФ.

Ключевые слова: пограничные ожоги, выращивание фибробластов, эмбриональные фибробласты, зрелые фибробласты, экономическая эффективность.

COMPARATIVE ECONOMIC ANALYSIS OF FIBROBLASTS PRIMARY CULTURE AT VARYING DEGREES OF MATURITY OBTAINING FOR BURNS TREATMENT

Ledovskoy S.N., Lazarenko V.A., Burda Yu.E.

**Burn Department of the St. Ioasaph Belgorod Regional Clinical Hospital, Belgorod;
Kursk State Medical University, Kursk;
Departmental Hospital at the Station Kursk of the JSCo "RZD"**

In spite of comparable clinical efficiency, the fibroblasts of varying degrees of maturity differ in their functional characteristics and require differential approaches for cultivation. So economic aspect of allogenic diploid fibroblasts (ADF) of varying degrees of maturity growing has been researched. Forming of monolayer culture of primary fetal fibroblasts (FF) has occurred approximately in 5.74 times quicker than mature skin fibroblasts (MSF) in the standard growing protocol. For the purpose of ADF growing protocol optimization an attempt of the most expensive component, fetal calf serum (FCS), volume reduction and its replacement by bovine serum (BS) has been realized. It has been revealed that the serum concentration decrease in the cultural medium has been crucial for the FF proliferation, but a source of the serum has not been of great importance. At the same time the attempt to replace FCS in part or in full by BS has led to interruption of the MSF proliferation as opposed to the FF. For long-term fibroblast ability to proliferate in conditions of subcultivation *in vitro* at the different variants of cultural media have been evaluated. The optimal for maintenance of the FF proliferation was the medium with 10% of BS, but for the mature fibroblasts – with 10% of FCS. Herewith a first cost of the FF primary culture raising has turned out to be in 12.844 times cheaper than MSF, and the maintenance of the FF is cheaper in 2.77 times as opposed to MSF.

Keywords: fibroblast growing, fetal fibroblast, mature fibroblast, economic efficiency.

Ожоговый травматизм является важной медицинской и социальной проблемой. По данным отечественных авторов [1, 9] общая летальность от ожогов в целом по России колеблется от 2,3% до 3,6%. Из 180–200 тысяч пострадавших, госпитализируемых во все лечебные учреждения России; погибают ежегодно 8–10 тыс. человек. При этом 85–90% – это люди трудоспособного возраста и дети. Из числа выживших 12–15 тыс. человек нуждаются в длительной медицинской, социаль-

но-трудовой и психологической реабилитации. Сразу после выписки из стационара инвалидами было признано 6,9% больных по отношению ко всем лечившимся. Среди инвалидов 82% составляли лица трудоспособного возраста.

Ежегодно регистрируется более 600 тыс. случаев ожоговой травмы. Из числа обожженных, госпитализируемых в стационары, у 60–80% больных также имеются поверхностные и пограничные ожоги II–IIIА степени, не требующие опе-

ративного лечения [3, 4]. Однако обширность этих ожогов во многом определяет тяжесть травмы и её прогноз. В частности является аксиомой то, что исход ожоговой травмы зависит не только от площади глубоких ожогов, но и от площади всего поражения. Пограничные ожоги, или ожоги IIIА степени по классификации, принятой в 1960 г. на XXVII Всесоюзном съезде хирургов, составляют отдельную проблему комбустиологии и пластической хирургии. Несмотря на их способность к самостоятельной эпителизации за счет сохранившихся клеточных элементов дериватов кожи, данный процесс занимает достаточно длительный период, часто сопровождается формированием грубых рубцов, в том числе гипертрофических и келоидных. Эти осложнения, относящиеся к поздним, представляют не только косметическую проблему, но и формируют различные контрактуры, требующие в дальнейшем выполнения многих реконструктивно-восстановительных и пластических операций.

Известно, что для лечения пограничных ожогов используются методы как "открытого" так и "закрытого" ведения ожоговых ран, различного рода реанимационные установки типа "Пеликан", противоожоговые кровати типа "Клиниatron", различные биологические повязки, искусственные покрытия, аэрозоли, мази на гидрофильной и жировой основе, различные методы физиотерапевтического воздействия [8].

На протяжении более десятилетия в клинической практике для лечения пограничных ожогов успешно применяется трансплантация аллогенных диплоидных фибробластов (АДФ) на ожоговые раны [2, 4, 10]. В настоящее время клиническая эффективность трансплантации АДФ, благодаря проведенным исследованиям [12, 13, 15], уже не вызывает сомнений. Однако в различных медицинских учреждениях используют АДФ различной степени зрелости, получаемые как из эмбриональных тканей [11], так и из кожи взрослых доноров [2, 10]. И в том и другом случае описываемая эффективность их трансплантации сопоставима, но фибробласты различной степени зрелости отличаются по функциональным свойствам, требуют дифференцированных подходов к культивированию, а, следовательно, могут значительно отличаться по экономической эффективности.

Целью исследования явилось проведение сравнительного анализа затрат на получение готовых к трансплантации культур из эмбриональных и взрослых тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было проведено исследование сроков получения монослойной культуры фибробластов из оди-

накового объема донорской ткани на стандартном и модифицированном протоколе. В качестве первичного материала использовали фрагменты 5×5 мм, полученные из поверхностных тканей плода на сроке 6–8 нед. беременности или с помощью дерматома при аутодермопластике из кожи взрослого донора. Полученный материал подвергали 10-минутной экспозиции в 0,1% растворе гипохлорита натрия, после чего трижды отмывали стерильной средой MEM. Затем донорский материал в стерильных условиях измельчали с помощью офтальмологических ножниц до минимально возможных фрагментов (0,01–0,1 мм³), добавляли 25 мл полной культуральной среды (среда MEM с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 2 мМ/л β-меркаптоэтанол), тщательно ресуспендировали, переносили в пластиковый культуральный флакон с площадью дна 75 см² и помещали в CO₂-инкубатор во влажную атмосферу с 5% CO₂ при 37°С. Через сутки все не прикрепившиеся фрагменты удаляли с помощью отсоса, а к прикрепленной части добавляли свежую полную культуральную среду в прежнем объеме. В дальнейшем каждые трое суток производили смену ½ объема среды во флаконах до момента формирования монослойной культуры.

В работе использованы следующие реактивы и расходные материалы: питательная среда MEM, жидкая стерильная, 450 мл (HyQlone, USA), ЭТС для культур эукариотических клеток, жидкая, стерильная, 500 мл (Панэко, Москва, Россия), СКРС для культур эукариотических клеток, жидкая, стерильная, 400 мл (БиолоТ, Санкт-Петербург, Россия), 0,02% раствор трипсина-версена (ПанЭко, Москва, Россия), β-меркаптоэтанол жидкий, стерильный, 100 мл (Sigma Aldrich, USA), флаконы культуральные пластиковые, площадь дна 75 см² (Nunc, Дания).

Статистический анализ проведен с использованием параметрических методов дисперсионного анализа, критерия Стьюдента и метода множественных сравнений Крускала-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сроки формирования монослоя эмбриональных и зрелых кожных фибробластов представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, при условии использования стандартного протокола, формирование монослойной культуры фетальных фибробластов происходит примерно в 5,74 раза быстрее, чем зрелых кожных фибробластов. В связи с этим была предпринята попытка оптимизировать протокол получения фетальных фибробластов за счет сокращения объема наиболее дорогостоящего компонента – эмбриональной телячьей сыворотки

(ЭТС) и замены ее на сыворотку крупного рогатого скота (СКРС). Сроки формирования монослойной культуры ЭФ на различных объемах сыворотки представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, уменьшение концентрации сыворотки в культуральной среде является критичным для деления фибробластов, но источник сыворотки не имеет принципиального значения, что позволило заменить дорогостоящую сыворотку эмбрионов коров на значительно

более дешевую сыворотку взрослых особей рогатого скота.

С другой стороны, была предпринята попытка модификации протокола получения зрелых кожных фибробластов с целью:

1) ускорить срок формирования монослойной культуры;

2) сократить себестоимость получения культуры клеток.

Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 1

Сроки формирования монослойной культуры взрослых и эмбриональных фибробластов при условии использования стандартного протокола (в сутках)

№ линии	ЭФ	ВФ
1	5	26
2	4	23
3	5	28
4	5	29
5	5	30
6	6	32
7	5	34
8	5	29
9	6	27
10	4	29
M±tm	5,00±0,41	28,70±1,89*

Примечание: * – статистическая значимость различий между группами $p < 0,05$.

Таблица 2

Сроки формирования монослойной культуры эмбриональных фибробластов при условии модификации стандартного протокола (в сутках)

№ линии ЭФ	МОДИФИКАЦИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ						
	Стандартный (1)	7% ЭТС (2)	5% ЭТС (3)	2% ЭТС (4)	10% ЭТС+10% СКРС (5)	10% СКРС (6)	5% СКРС (7)
1	5	12	24	нет	5	5	нет
2	4	15	нет	нет	4	4	нет
3	5	19	32	нет	5	5	нет
4	5	19	нет	нет	5	5	нет
5	5	17	21	нет	5	6	нет
6	6	нет	нет	нет	5	6	нет
7	5	19	25	нет	5	5	нет
8	5	14	23	нет	4	5	нет
9	6	21	нет	нет	6	7	нет
10	4	21	нет	нет	4	5	нет
M±tm	5,00 ^(2,3,5,6) ±0,41	17,44 ^(1,3,5,6) ±2,07	25,00 ^(1,2,5,6) ±3,67	-	4,80 ^(1,2,3) ±0,39	5,30 ^(1,2,3) ±0,51	-

Примечание: в скобках в верхнем регистре статистически значимые ($p < 0,05$) различия между сроками формирования монослоя на соответствующих модификациях культуральной среды.

Сроки формирования монослойной культуры зрелых кожных фибробластов при условии модификации стандартного протокола (в сутках)

№ линии ЗКФ	МОДИФИКАЦИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ						
	Стандартный (1)	7% ЭТС (2)	15% ЭТС (3)	20% ЭТС (4)	30% ЭТС (5)	10% ЭТС+ 10% СКРС (6)	10% СКРС (7)
1	26	нет	23	21	29	24	нет
2	23	нет	19	18	22	24	нет
3	28	нет	26	23	нет	28	нет
4	29	нет	24	22	29	29	нет
5	30	нет	30	24	41	29	нет
6	32	нет	32	24	27	27	нет
7	34	нет	27	27	33	33	нет
8	29	нет	29	25	24	31	нет
9	27	нет	24	23	23	28	нет
10	29	нет	29	23	36	29	нет
M±tm	28,70 ⁽⁴⁾ ±1,89	-	26,30 ⁽⁴⁾ ±2,41	23,00 ^(1,3,5,6) ±1,49	29,33 ⁽⁴⁾ ±4,14	28,22 ⁽⁴⁾ ±1,93	-

Примечание: в скобках в верхнем регистре статистически значимые ($p < 0,05$) различия между сроками формирования монослоя на соответствующих модификациях культуральной среды.

Как видно из представленных данных, увеличение содержания ЭТС в культуральной среде способствует сокращению сроков формирования монослойной культуры, но лишь до определенных пределов (20%). В то же время, в отличие от эмбриональных фибробластов, попытка заменить ЭТС частично или полностью на СКРС ведет к прекращению деления зрелых фибробластов.

На заключительном этапе данного исследования представлялось необходимым провести сравнительный анализ длительности сохранения культурами способности к пролиферации в условиях пассирования *in vitro* на различных вариантах культуральной среды. Для пассирования использовали стандартную концентрацию 10^5 клеток/мл среды, которую вносили в объеме 10 мл в культуральный флакон с площадью дна 25 см^2 . Дальнейшее культивирование проводили в условиях влажной атмосферы с 5% CO_2 при 37°C . Результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Как видно из таблиц, уменьшение концентрации сыворотки ниже 10% способствует прекращению размножения клеток в культуре. При этом для ЗКФ остается критичным эмбриональное происхождение сыворотки. Следовательно, оптимальной для поддержания жизнеспособности при длительном пассировании ЭФ следует признать среду с содержанием 10% СКРС, а для ЗКФ – 10% ЭТС.

Исходя из полученных данных, представлялось интересным определить себестоимость получения равного количества эмбриональных и зрелых фибробластов и последующего поддержания жизнеспособности линии в культуре. Для определения стоимости культуральных сред была рассчитана средняя стоимость каждого из компонентов на основании прайс-листов двух российских дистрибьюторов реактивов и расходного материала для культур клеток, предлагающих полный спектр продукции: ПанЭко (Москва), БиолоТ (Санкт-Петербург).

В соответствии с представленными показателями стоимость 1 л оптимальной среды для получения и поддержания культуры ЭФ составила: $128,25 \times 2 + 394,2 / 4 = 355,05$ руб., для получения ЗКФ: $128,25 \times 2 + 3634 \times 0,4 = 1710,1$, а для поддержания ЗКФ: $128,25 \times 2 + 3634/5 = 983,3$ руб (табл. 6).

С целью получения монослойной культуры из первичного материала необходимо дважды в неделю производить замену половины культуральной среды во флаконе с культурой на свежую с целью поддержания оптимальной концентрации необходимых для жизнедеятельности и размножения клеток веществ [14]. Общий объем среды во флаконе с площадью дна 25 см^2 составляет 15 мл. Учитывая срок формирования монослоя первичной культурой, для ЭФ необходимо было $15 + (15 / 2 \times 1) = 22,5$ мл среды, а для ЗКФ – $15 +$