

Оценка процедур мезотерапии препаратом Cugasen участницами и врачом исследователем по 5-ти бальной шкале

<i>Показатели</i>	<i>Субъективная оценка участниц (n = 21)</i>	<i>Оценка врача</i>
Оценка результата		
После 2 процедур	4,3	4,4
После 4 процедур	4,8	4,8
Через 4 месяца после окончания курса	5,0	4,9
Эффективность курса лечения		
— Уменьшение яркости окраски	4,8	4,6
— Уменьшение выраженности сосудистого рисунка	4,7	4,5
— Увлажнение кожи	5,0	4,8
— Выравнивание рельефа кожи	4,8	4,8
— Соответствие ожидаемому результату	4,7	4,7
— Общая оценка	4,8	4,7

ЛИТЕРАТУРА:

1. Мезотерапия: шаг вперед или два шага назад? Дискуссия на сайте Общества специалистов эстетической медицины. Amin S. P., Phelps R. G., Goldberg D. J. Mesotherapy for Facial Skin Rejuvenation: A Clinical, Histologic, and Electron Microscopic Evaluation. Dermatologic Surgery. 2006; 32, 12; 1467-1472.
2. Рахимуллина О. Эффективность современных косметологических методов: мнения специалистов и пациентов. Инъекционные методы в косметологии. 2010;1: 2-8.
3. Орасмяэ-Медер Т., Эрнандес Е. Пептидные технологии в косметике: тенденции и перспективы. Косметика и медицина. 2010; 2: 46-53.
4. Хавинсон В. X., Малинин В. В. Влияние коротких пептидов на иммунопатологические процессы при старении. Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова. 2008; 28, 3: 139-142
5. Day D. J., Littler C. M., Swift R. W., Gottlieb S. The wrinkle severity rating scale: a validation study. Am J Clin Dermatol. 2004; 5, 1: 49-52.
6. Khavinson V. Kh., Malinin V. V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel. Karger, 2005.

А. И. Пономарев, А. В. Коротков, О. Г. Макеев

**ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ, КОНСЕРВИРОВАННЫХ
В ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ АТМОСФЕРЕ КСЕНОНА**

*Уральский государственный медицинский университет
Институт медицинских клеточных технологий
г. Екатеринбург*

Аннотация

Наиболее активно используемый раствор для хранения эритроцитов в настоящее время не достаточен для накопления резерва эритроцитов, в том числе редких фенотипов. Поэтому необходим новый консервирующий раствор для более продолжительного хранения. В данной статье говорится о совершенно новой разработке, где в качестве консервирующего агента был использован ксенон. Описываются методы исследования и полученные в ходе работы результаты.

Ключевые слова: эритроциты, ксенон, разработка, консервация, ЦФДА-1.

Консервация крови и ее компонентов всегда представляла интерес для практической медицины. Переливание консервированных эритроцитов проводится по различным показаниям, наиболее распространенными из которых являются острая и хроническая анемия, массивные кровопотери, гемобластозы и другие. Прошло чуть менее века с момента первых сообщений о консервации изолированных эритроцитов человека в растворе цитрата-глюкозы при +4 °С [14, 15], однако до сих пор не сформулированы преимущества тех или иных способов хранения крови, применяемых в рутинной практике. Наиболее используемым способом является применение различных модификаций раствора ЦФДА, названного по аббревиатуре основных исходных компонентов: цитрат натрия, фосфатный буфер, декстроза, аденин. Принцип консервирующего действия раствора обусловлен поддержанием рН и нормальных показателей гликолиза, а также наличием субстрата для синтеза свободного пула аденилатов. Рекомендуемый срок хранения эритроцитарной массы по данному способу составляет 30 суток с момента взятия материала. Однако этот срок не достаточен для накопления резерва эритроцитов, в том числе редких фенотипов, подвергающихся утилизации за истечением 30-ти суточного срока хранения.

Разработки новых консервирующих растворов для более продолжительного хранения эритроцитарной массы ведутся постоянно [5, 13]. Большого успеха в этом направлении до сих пор не достигнуто, поэтому основные проблемы, возникающие при хранении эритроцитов, по-прежнему актуальны. Самыми значимыми из них остаются осмотическое набухание, образование микропор в мембранах и возрастающий гемолиз, связанный с окислением гемоглобина [8, 11, 2]. В настоящее время принято считать, что механизмы окисления гемоглобина посредством супероксид радикалов и активных форм кислорода являются ведущими повреждающими агентами при консервации эритроцитов [10, 7].

Эффективность применения технологий, основанных на уменьшении образования активных форм кислорода, была продемонстрирована в нескольких исследованиях. Некоторые из них основаны на применении сорбентов кислорода, использовании гравитационных фильтров для оксигеноредукции

или создании инертной атмосферы с минимизацией доли атмосферного воздуха [3, 6, 12].

В нашем исследовании применялся оригинальный протокол, использующий в качестве консервирующего агента гипербарическую атмосферу ксенона для гипотермического хранения эритроцитов. Теоретической предпосылкой для использования данного способа явилось замещение атмосферного воздуха ксеноном как вне, так и в межклеточном пространстве за счет большей растворимости в биологических объектах и жидкостях при повышенном давлении, что минимизирует окисляющий фактор [1].

Эритроциты (Эр) получали от здоровых доноров и собирали в пробирки с ЭДТА. Все образцы разделяли на плазму и форменные элементы методом афереза на центрифуге (Sigma) при 1950 g в течение 3 минут и 25 С. Супернатант (содержащий плазму и ее компоненты) и верхний лейкоцитарный слой заменяли эквивалентным объемом PBS. Клетки хранили не более 7 суток без использования. Далее готовили 200 мкл аликвоты эритроцитов и помещали в поликарбонатные криопробирки Nalgene Cryo. Образцы разделяли на группы: негативный контроль, свежая кровь, ЦФДА-1, гипербария ксенона. Всего было исследовано 36 образцов, по 9 в каждой группе.

Свежие Эр оценивали немедленно после заготовки аликвот посредством разведения в PBS из расчета 50:50 и взбалтывания на вортексе. Морфологические параметры Эр оценивали с использованием гематологического анализатора (Nihon Cohden). Основной контролируемый параметр: средний объем Эр (MCV).

Качественные параметры Эр оценивали окрашиванием по Романовскому — Гимза. Препараты анализировали на микроскопе Olympus CX 41. Описывали форму и конфигурацию мембран Эр в трех полях зрения (не менее 1000 клеток) при увеличении в 200 раз. Патологические формы Эр — эхиноциты, шистоциты, акантоциты, и др. подсчитывали совместно и обозначали как пойкилоциты. Дегмациты — клетки с разрушенной мембраной по типу сильного локального повреждения («надкушенные клетки»), считали отдельно. Результаты выражали в процентах к общему количеству исследованных клеток.

Количество разрушенных Эр оценивали по уровню свободного гемоглобина в надо-

садочной жидкости, на спектрофотометре Ultrospec pro 1100 при длине волны 490 нм. Гемолизированный раствор Эр получали добавлением 200 мкл бидистиллированной воды с двухкратным замораживанием при -86°C и оттаиванием. Результат абсорбции принимали за 100 процентов. В качестве контроля принимали абсорбцию негемолизированной смеси Эр с буферным раствором.

Для консервации в гипербарической атмосфере использовали специально сконструированную барокамеру со встроенными датчиками давления и температуры. Внутренний объем прибора дает возможность разместить в нем до 18 криопробирок (Nalgene Cryo) с образцами крови. Конструкция прибора позволяет осуществлять продувку требуемым газом до момента консервации и, таким образом, создавать гомогенную газовую атмосферу. В качестве консервирующего вещества использовали инертный газ ксенон высокой степени очистки 99,9999% (Iceblick ltd.)

Для консервации Эр в растворе ЦФДА-1 соответствующие аликвоты Эр смешивали с консервирующим раствором (Фаглюцид), полученным из пакетов для переливания крови (Медсинтез, Россия), из расчета 50 мкл консерванта на 200 мкл эритроцитов, согласно инструкции производителя (1:4).

В качестве негативного контроля использовали эритроциты, выделенные согласно вышеописанному протоколу, которые консервировали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, в отсутствие каких-либо консервантов.

Разогрев образцов проводили на водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$ и интенсивном покачивании в течение 60 секунд. Далее проводили все исследования аналогичные контрольной группе Эр.

Статистическую обработку данных и построение графиков производили с помощью набора прикладных программ GraphPad InStat и Prizm v. 6.02. Результаты считали достоверными при $p < 0.05$.

Для демонстрации изменений качественных и количественных характеристик эритроцитов, консервированных в гипербарии ксенона в сравнении со стандартно используемой методикой хранения в ЦФДА-1, строили графики относительно негативного контроля, для которого характерны максимальные изменения в большинстве исследуемых параме-

тров по причине консервации в отсутствие ограждающего раствора. Показатели свежих (неконсервированных) эритроцитов отмечали на графиках пунктирной линией и устанавливали как исходный уровень или норму по анализируемому параметру.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии изменений среднего объема Эр, консервированных в ЦФДА-1, в то время как в контроле и гипербарии изменения данного показателя были статистически достоверными и повышенными относительно нормы в среднем на 5,88% и 8,23%, или на 4,3 и 6,2 фемтолитра соответственно (рис. 1 А).

Подсчет дегмацитов выявил более значительные различия в исследуемых группах. Контрольная группа демонстрировала увеличение количества дегмацитов не менее чем на 230%, в отличие от показателей опытных групп (рис. 1В, 2В).

Количество пойкилоцитов было существенно больше для группы консервации в ЦФДА-1 и составляло 220% и 400% относительно значений гипербарии ксенона и контроля соответственно. Хотя результаты были статистически достоверными только для группы сравнения контроля и ЦФДА-1 ($p < 0,001$), в то время как для групп сравнения — гипербария с ЦФДА-1 или с контролем, достоверность не была установлена (рис. 1С, 2С, D).

Данные по гемолизу свидетельствуют о значительном снижении показателя для гипербарии (на 176,47%) и ЦФДА-1 (на 230, 76%) соответственно. Однако в опытных группах статистически значимых различий не было установлено (рис. 1D).

Обращают на себя внимание данные, полученные при исследовании гемолиза клеток. Пробы с гипербарией неожиданно показали результаты, сопоставимые с эталонным гемо-консервантом ЦФДА-1 по количеству разрушенных клеток. В экспериментах с образцами, консервированными в гипербарии ксенона, можно предположить ведущую роль протективного механизма, вызванного вытеснением молекул кислорода, и, как следствие, минимизацией либо отсутствием свободнорадикального окисления [9, 16, 17]. Наряду с этим, ввиду равновесного замещения азота и кислорода в консервируемой суспензии на инертный газ ксенон, может быть блокирован механизм окисления

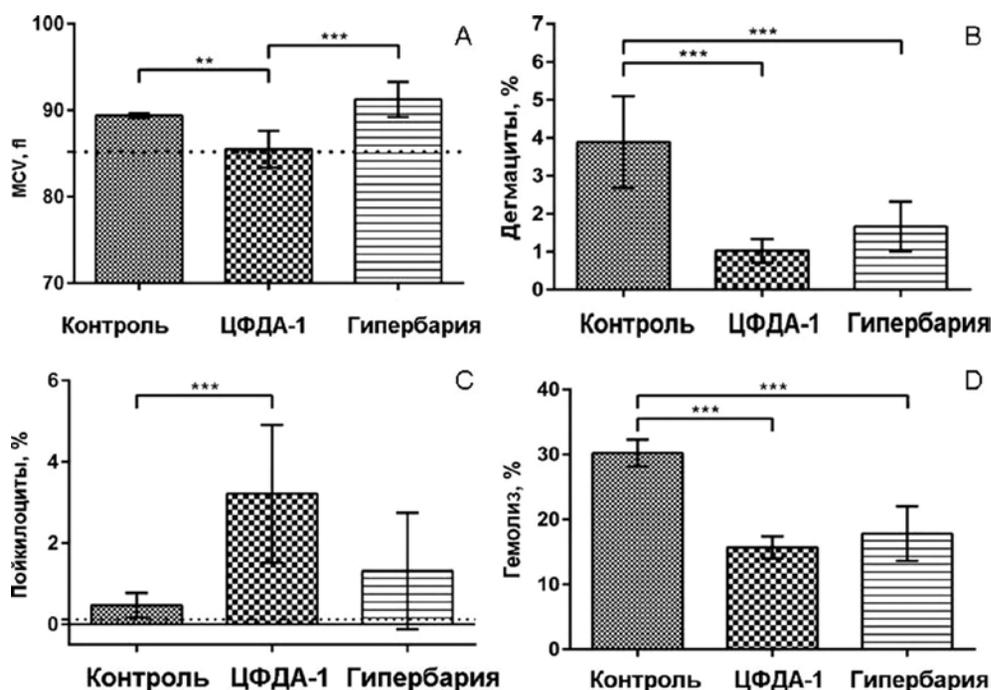


Рис. 1. Показатели расконсервированных эритроцитов:

А — средний объем эритроцитов; В — количество дегмацитов;

С — количество измененных форм Эр (пойкилоциты); D — процент гемолизированных Эр.

Квадратными скобками на графиках помечена достоверность при различных значениях р.

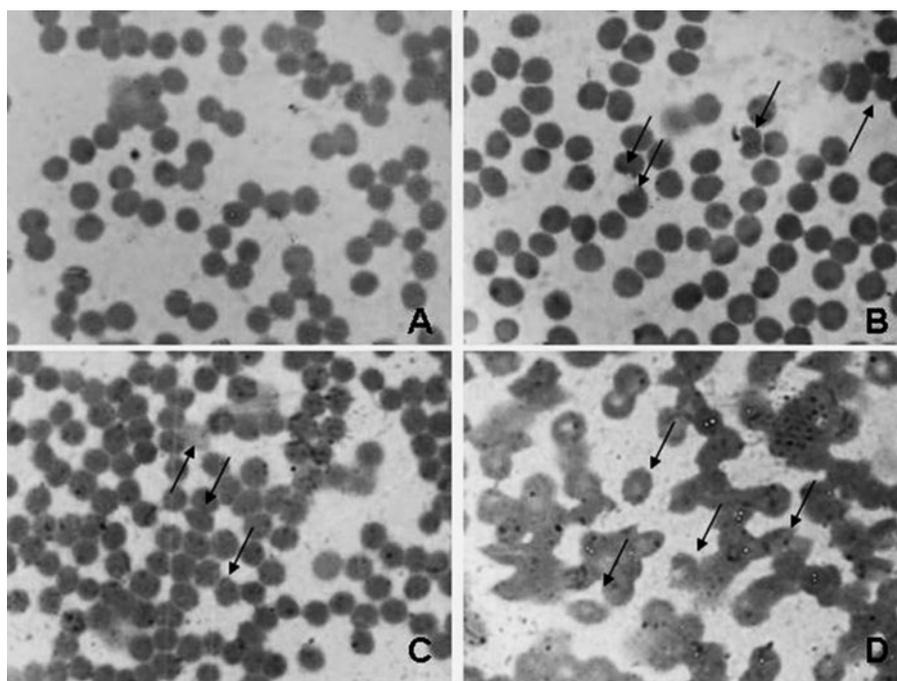
Во всех случаях $p < 0,05$. Наибольшая достоверность помечена тремя звездочками — $p < 0,001$

гемоглобина, который играет важную роль в инициации каскада реакций, разрушающих эритроциты [4]. По всей видимости, как эффект раствора ЦФДА-1 опосредован через минимизацию окислительного стресса посредством мембранопротекторов и биоантиоксидантов, так и избыточное давление ксенона способно консервировать клетки путем равновесной экстракции ксеноном кислорода, вследствие исключения последнего в качестве донора свободных радикалов. Эти данные согласуются с результатами исследований интактной группы эритроцитов, которая с течением времени демонстрировала значительное прогрессирование литического эффекта, достигая максимума к 30 суткам хранения.

Важной характеристикой сохранности суспензии является количество пойкилоцитов — клеток с зубчатой мембраной. Процесс трансформации дискоцита в пойкилоцит может быть связан с образованием промежуточных форм эритроцитов — сфероцитов и с длительным периодом пребывания клеток в изоосмотической среде и постепенным осмотическим набуханием. В результате последнего клетки со временем начинают пропускать

через свою мембрану избыточное количество воды, которое требуется, чтобы уравнять гиперосмотическую среду внутри клеток. Такие клетки отличаются морфометрически и после трансфузии могут не пройти спленальный контроль со стороны организма, что приведет к их немедленной утилизации.

Из полученных результатов следует, что наибольшее количество таких клеток наблюдалось в группе с ЦФДА-1 (рис. 2D, 1C), в то время как негативный контроль неожиданно продемонстрировал минимальное значение показателя. Однако при дальнейшем анализе мазков этой группы выяснилось, что в данной группе преобладают дегмациты, замещающие пойкилоциты (рис. 2B, 1B). Дегмациты — это стромальные элементы разрушенных эритроцитов с разрушенными мембранами. Процесс их образования может быть обусловлен окислением гемоглобина и последующим разрушением Эр, так как на организменном уровне образование дегмацитов происходит по причине недостатка Г-6-ФД, который необходим для перехода окисленного глутатиона в восстановленную форму, инактивирующую активные формы кислорода. Примечательно, что во всех



**Рис. 2. Мазки расконсервированных эритроцитов.
Окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение в 400 раз.**

A — свежие эритроциты. B — негативный контроль (стрелками показаны дегмациты). C — гипербария ксенона (стрелками показаны пойкилоциты). D — ЦФДА-1 (стрелками показаны пойкилоциты)

группах количество дегмацитов коррелирует со степенью гемолиза во время хранения. Из графиков следует, что эти показатели имеют зависимость близкую к прямопропорциональной, означенное дает возможность предположить, что основным механизмом, повреждающим эритроциты во время хранения, является окисление. При этом дегмациты могут быть заключительным и, следовательно, необратимым звеном в цепочке превращений дискоцит-сфероцит-пойкилоцит, в то время как промежуточные звенья этой цепи могут носить обратимый характер. По-видимому, одним из наиболее важных оценочных показателей Эр после консервации, наряду с гемолизом, может быть дегмацитоз, в то время как другие параметры вместе или по отдельности являются только триггерами последнего.

В кондуктометрических показателях, регистрирующих изменение среднего объема Эр после консервации, не наблюдается значительных отличий в сравнении с другими описанными параметрами, однако отличия являются статистически достоверными и могут быть объяснены с позиции кессонного эффекта (рис. 1А). Возможно ксенон, растворенный в достаточных

количествах в мембранах эритроцитов на этапе консервации и хранения, не может быстро покидать их во время расконсервации по причине повышенной тропности к липидам при избыточном давлении. В то же время в эритроцитах, консервированных в отсутствие каких-либо консервантов, могло произойти осмотическое набухание, вызванное пребыванием в остаточных количествах плазмы во время хранения, так как гематокрит эритроцитов, полученных методом афереза, не может превышать 80%. Тем самым, имеющегося количества плазмы, с одной стороны, было достаточно для изоосмотического сфероцитоза, а с другой — недостаточно для образования пойкилоцитов в интактной группе. Данные факты могут свидетельствовать о разности механизмов, объясняющих увеличение среднего объема для исследуемых групп, так как условия их начальной гидратации и время хранения были одинаковыми.

В проведенных исследованиях показано консервирующее действие гипербарической атмосферы ксенона на суспензии Эр. В регистрируемых параметрах встречаются некоторые различия в морфофункциональных характеристиках клеток, консервированных

разными способами, однако в ключевом показателе гемолиза гипербарическая консервация Эр с использованием ксенона демонстрирует практически одинаковые значения. Наряду с этим, при микроскопии мазков не выявлено существенных изменений структуры и формы клеток, а наблюдаемая картина была, в целом, в пределах нормы, и демонстрировала отсутствие противоречий в морфометрии, полученной при анализе мазков и при кондуктометрическом, и при спектрофотометрическом исследовании. Это дает надежду, что при подборе оптимальных значений давления газа, а так же способа дегазации, существует перспектива улучшения результата.

Выводы:

1. Консервирующее действие гипербарической атмосферы ксенона сопоставимо с действием конвенционального гемоконсерванта ЦФДА-1, который в настоящее время широко распространен в мире для краткосрочного хранения изолированных эритроцитов периферической крови.

2. Консервирующее действие ксенона на суспензию эритроцитов может быть объяснено с позиций аноксии и, как следствие, блокады основных механизмов, окисляющих мембраны, опосредованных через образование активных форм кислорода.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Довгуша В. В., Довгуша Л. В. «Физические механизмы физиологического и биологического действия инертных газов на организм» 2012 Санкт-Петербург. Типография «Пресс-Сервис», 228 с.
2. An AFM approach of RBCmicro and nanoscale topographic features during storage Santacruz-Gomez K., Silva-Campa E., Álvarez-García S., Mata-Haro V., Soto- Puebla D., Pedroza Montero M., Int. J. Med. HealthBiomed. Pharm. Eng. 8 (2014) 410-413
3. Anaerobic storage of red blood cells. Yoshida Tatsuro, Shevkoplyas Sergey S. «Blood Transfus» 2010; 8: 220-36.
4. Biopreservation of red blood cells-the struggle with hemoglobin oxidation. Kanas T, Acker JP. FEBS J. 2010. 277 (2): 343-56.
5. Comparison of Adsol and CPDA-1 blood preservatives during simulated massive resuscitation after hemorrhage in swine. Buchholz D. H., Borgia J. F., Ward M., Miripol J. E., and Simpson J. M. «TRANSFUSION» Volume 39, 1999.
6. Fresh blood for everyone? Balancing availability and quality of stored RBCs. Dzik W. Transfus Med 2008; 18: 260-5.
7. H₂O₂ injury in [beta] thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. Scott MD. Free Radical Biol 2006. Med 40, 1264-1272.
8. Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A. et al., Exp Cell Res (2015). Electronic access <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.009i>.
9. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. Brune B., Zhou J., von Knethen A. // Kidney. Int. Suppl. 2003. Vol. 84. P. S22–24.
10. Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of [alpha] -hemoglobin to membrane. Murakami K & Mawatari S. Arch Biochem Biophys 2003. 417, 244-250.
11. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in theBloodBank. Cluitmans J. C., Hardeman M. R., Dinkla S., Brock R., Bosman G. J., BloodTransfus. (10) 2012, 12-18.
12. Successful storage of RBCs for 10 weeks in a new additive solution. Hess JR, Rugg N, Knapp AD, et al. Transfusion 2000; 40: 1012-6.
13. Synthesis and antifreeze activity of fish antifreeze glycoproteins and their analogues. Peltier, R. et al. Chem. Sci. 2010, 1, 538551.
14. The preservation of living red blood cells in vitro. I. Methods of preservation. Rous P & Turner JR. J Exp Med 1916, 23, 219-237.
15. The preservation of living red blood cells in vitro. II. The transfusion of kept cells. Rous P & Turner JR. J Exp Med 1916, 23, 239-248.
16. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind. Bruick R. K., McKnight S. L. // Science. 2002.— Vol. 295.— P. 807-808.
17. Tyrrell R. M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. Applegate L. A., Luscher P., // Cancer Res. 1991.— Vol. 51.— P. 974-978.

О. В. Прохорова, И. В. Лаврентьева, Т. А. Обоскалова

РЕПРОДУКТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ СТУДЕНЧЕСКОЙ МОЛОДЕЖИ: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

*Уральский государственный медицинский университет
Кафедра акушерства и гинекологии
г. Екатеринбург*

Аннотация

В данной статье рассматривается соотношение уровня сексуальной активности студентов-медиков с уровнем использования ими контрацепции. Интересовал вопрос об источнике информации по поводу сексуальной жизни и методам контрацепции. Важно понимать, насколько студенты УГМУ могут быть источником достоверной информации в этом вопросе, и имеется ли вероятность развить волонтерское движение среди студентов старших курсов в вопросах сохранения репродуктивного здоровья.

Ключевые слова: контрацепция, репродуктивное здоровье, студенты.

Всемирная организация здравоохранения и организация объединенных наций определили репродуктивное здоровье как «...состояние полного физического, умственного и социального благополучия, а не просто отсутствие болезней или недугов во всех вопросах, касающихся репродуктивной системы и ее функций и процессов. Охрана репродуктивного здоровья определяется как сочетание методов, способов и услуг, которые способствуют репродуктивному здоровью и благополучию за счет предупреждения и устранения проблем, связанных с репродуктивным здоровьем».

Особое место в исследованиях репродуктивного и сексуального здоровья занимают социологические исследования. Это обусловлено социальным характером проблем репродуктивного и сексуального здоровья, таких как распространение инфекций, передающихся половым путем (ИППП), включая ВИЧ/СПИД, высокий уровень аборт, в том числе в юном возрасте, рискованное поведение, насилие и т.д. Социологические исследования дают возможность выяснить степень информированности населения по различным вопросам репродуктивного и сексуального здоровья, наиболее предпочитаемые источники информации и методы профилактики ИППП и нежелательной беременности [1].

По мнению ряда отечественных авторов, при проведении исследований в области репродуктивного и сексуального здоровья особое

место должно отводиться учету потребностей подростков, как одной из наиболее уязвимых групп населения [1, 2, 3]. Беспорядочные половые связи, случайные беременности и ранние роды в значительной степени являются результатом низкой сексуальной культуры молодежи. Ситуация осложняется плохой информированностью молодежи по вопросам контрацепции. Часто подобная информация носит искаженный характер, что связано с особенностями ее основных источников (сверстники, литература и телевидение).

Цель исследования — определение степени информированности студентов Уральского государственного медицинского университета (УГМУ) по вопросам репродуктивного здоровья.

Настоящее исследование проводилось на базе кафедры акушерства и гинекологии УГМУ в 2013-2014 гг. Для изучения особенностей репродуктивного поведения студенческой молодежи было произведено анонимное анкетирование 177 студентов IV и VI курсов педиатрического и медико-профилактического факультетов УГМУ. Исследование осуществлялось путем добровольного анонимного анкетирования с помощью анкеты-опросника, специально разработанной с учетом поставленных задач и включавшей 20 вопросов.

Среди всех респондентов юноши составляли лишь четверть (25,4%), подавляющее