

*На правах рукописи*

**ЖАРКАЯ**  
**Анастасия Валерьевна**

**ТОТАЛЬНАЯ ПАРАТИРЕОИДЭКТОМИЯ  
ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ВТОРИЧНОГО  
ГИПЕРПАРАТИРЕОЗА, МЕХАНИЗМЫ КЛЕТочНОЙ  
КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ  
ПОСЛЕ ТОТАЛЬНОЙ ПАРАТИРЕОИДЭКТОМИИ  
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.01.17 – хирургия

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

Томск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Иркутский научный центр хирургии и травматологии».

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

*Ильичева Елена Алексеевна*

**Научный консультант:**

доктор биологических наук

*Лепехова Светлана Александровна*

**Официальные оппоненты:**

*Слепцов Илья Валерьевич* – доктор медицинских наук, заместитель директора по медицинской части ФГБУ «Санкт-Петербургский многопрофильный центр» Минздрава РФ, профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

*Макаров Игорь Валерьевич* – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней № 1 ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

**Ведущая организация**

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

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года в «\_\_\_» 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 и на сайте [www.ssmu.ru](http://www.ssmu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

*Петрова Ирина Викторовна*

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Согласно регистру Российского диализного общества, 27,7 % больных, получающих заместительную почечную терапию (ЗПТ), имеют явный гиперпаратиреоз (ГПТ) (уровень паратиреоидного гормона (ПТГ) – более 600 пг/мл), а у 8,4 % больных выявляется гиперкальциемия [Бикбов Б. Т., Томилина Н. А., 2014]. В соответствии с международными (K/DOQI, 2003 г.) и национальными рекомендациями Российского диализного общества (2011 г.), паратиреоидэктомия рекомендована больным с тяжелым гиперпаратиреозом. Это понятие включает в себя стойкие сывороточные уровни ПТГ более 800 пг/мл (88,0 пмоль/л), ассоциированные с гиперкальциемией и/или гиперфосфатемией, которые устойчивы к медикаментозной терапии [Ермоленко В. М. и др., 2011].

Хирургическое лечение пациентов с вторичным гиперпаратиреозом можно отнести к одной из наиболее спорных междисциплинарных проблем современной нефрологии, эндокринологии и хирургии. На сегодняшний день количество паратиреоидэктомий (ПТЭ) у пациентов, находящихся на диализе, остается стабильно высоким и составляет 5,7 (4,1–7,8) на 1000 пациенто-лет при использовании цинакалцета и 10,3 (8,0–13,3) – при отсутствии возможности проведения терапии селективными кальцимиметиками. С успешной ПТЭ связывают снижение риска летальности больных, находящихся на ЗПТ [Егшатын Л. В. и др., 2013].

Основной проблемой выбора хирургической тактики при лечении диализных больных, страдающих тяжелым вторичным гиперпаратиреозом, является отсутствие единого мнения в отношении цели операции: стремление к достижению целевых значений ПТГ, отсутствию рецидива заболевания или снижению частоты развития послеоперационного гипопаратиреоза (ПОгПТ) [Stracke S. et al., 2009; Conzo G. et al., 2012; Tsai W. C. et al., 2013]. Используются субтотальные резекции, тотальные паратиреоидэктомии (с/без аутотрансплантации, с/без тимэктомии) и даже расширенные диссекции шеи и верхнего средостения [Евменова Т. Д., Лямина Л. Г., 2011; Егшатын Л. В. и др., 2012; Слепцов И. В. и др., 2014; Vargreira C. E., Cernea C. R., 2010]. При этом отсутствуют исследования, подтверждающие преимущества того или иного объема хирургического вмешательства [Бикбов Б. Т., Томилина Н. А., 2014]. Отсутствуют единые критерии оценки результатов хирургического лечения вторичного ГПТ [Егшатын Л. В. и др., 2012; KDIGO, 2009; Stracke S. et al., 2009; Sharma J. et al., 2012; Sakman G. et al., 2014].

Стойкий гипопаратиреоз не имеет полноценной заместительной (в том числе и трансплантационной) терапии и, по данным некоторых авторов, приводит к развитию адинамической костной болезни [Mahajan A. et al., 2009; Chan H. W. et al., 2010] и ухудшению функции трансплантированной почки [Schwarz A. et al., 2007]. Однако это мнение не является общепринятым, подтверждением чего является увеличение количества сообщений о применении тотальной паратиреоидэктомии без аутотрансплантации (АТ) ткани околотитовидных желез (ОЦЖ) [Ockert S. et al., 2002; Lorenz K. et al., 2006; He Q. et al., 2014], где авторы не видят серьезных проблем, связанных с ПОгПТ. Таким образом, отношение к ПОгПТ у пациентов, находящихся на ЗПТ, а также к методам его коррекции нуждается в экспериментальном обосновании.

Наиболее распространенным из трансплантационных методов профилактики и коррекции ПОгПТ в настоящий момент является аутотрансплантация фрагментов ткани ОЦЖ. Общепринятая технология проста, не требует значительных экономических затрат и большого опыта хирурга, однако данная методика не всегда эффективна [Guller U. et al., 2000]. Алло- и ксенотрансплантация не получили распространения в связи с нерешенной проблемой преодоления иммуногенности ткани донора и, соответ-

ственно, низкой продолжительностью функционирования трансплантата [Tanaka Y. et al., 1995; Hasse C. et al., 2000; Nawrot I. et al., 2007]. Работы в области тканевой инженерии ограничены исследованиями *in vitro* [Riter C. S. et al., 2004; Iovino F. et al., 2010]. Отсутствие единого эффективного патогенетически обоснованного лечения ПОгПТ определяет сохранение дискуссии о выборе способа паратиреоидной трансплантации [Лян Н. И. и др., 2014; Aysan E. et al., 2014; Ng J. C. et al., 2014]. Поиск оптимального метода коррекции ПОгПТ осуществляется в эксперименте, однако на сегодняшний день не существует общепринятого стандартизированного способа моделирования ПОгПТ.

Таким образом, отсутствие убедительной аргументации в пользу того или иного объема хирургического вмешательства, необходимости трансплантационной коррекции послеоперационного гипопаратиреоза и эффективности клеточных технологий при послеоперационном гипопаратиреозе предопределила наше исследование.

#### **Степень разработанности темы исследования**

В последние годы проблеме хирургического лечения вторичного гиперпаратиреоза у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии уделено внимание в работах Л. В. Егшатын, Л. Я. Рожинской, Н. С. Кузнецова, Р. П. Герасимчука, Т. Д. Евменовой, Е. М. Мохова, Е. В. Полухиной, А. М. Писаренко, И. В. Слепцова, С. Е. Barreira, Y. Sun, F. F. Chou, S. Stracke, Y. Tominaga, S. Matsuoka, P. Riss, J. Sharma, E. Kandil, R. Schneider, G. Sakman, B. D. Pulgar, M. Hamouda, T. M. Hsieh.

Проблемам повышения эффективности трансплантационных методов профилактики и коррекции послеоперационного гиперпаратиреоза посвящены труды О. С. Попова, М. М. Ларионова, В. А. Зурнаджянц, В. Я. Хрыщановича, С. И. Третьяка, А. Н. Харламовой, М. N. Ohe, I. Nawrot, S. M. Flechner, P. Björklund, G. Conzo, J. C. Ng. Однако в трудах этих ученых применение клеточных технологий не рассматривается в аспекте аутотрансплантации, а также изучения ключевых звеньев саногенеза послеоперационного гипопаратиреоза. Таким образом, отсутствие убедительной аргументации в пользу того или иного объема хирургического вмешательства, необходимости трансплантационной коррекции послеоперационного гипопаратиреоза и эффективности клеточных технологий при послеоперационном гипопаратиреозе предопределило наше исследование.

#### **Цель исследования**

Патогенетическое обоснование расширенной паратиреоидэктомии при вторичном ГПТ и клеточной коррекции экспериментального послеоперационного гипопаратиреоза при сохраненном тиреоидном статусе.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести анализ сопряженности клинико-морфологических признаков заболевания при гиперпаратиреозе у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии, и оценить эффективность эксплорации околощитовидной железы при паратиреоидэктомии.

2. Сравнить непосредственные и отдаленные результаты различных способов хирургической коррекции гиперпаратиреоза у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии.

3. Разработать способ моделирования послеоперационного гипопаратиреоза, исследовать механизмы патогенеза метаболических нарушений в условиях сохраненного тиреоидного статуса.

4. Усовершенствовать технологию получения функционально активных клеток околощитовидной железы с высокой степенью жизнеспособности.

5. Оценить эффективность клеточной коррекции и раскрыть механизмы саногенеза экспериментального послеоперационного гипопаратиреоза с сохраненным тиреоидным статусом.

## **Научная новизна**

Показана низкая эффективность интраоперационной эксплорации околощитовидных желез при вторичном гиперпаратиреозе (81 %), которая объясняется отсутствием согласованности функциональной автономии и морфологических изменений в околощитовидных железах, и отсутствием синхронности в морфологической картине ткани околощитовидных желез. Установлена возможность удаления из шейного доступа 80 % эктопированных околощитовидных желез. Доказано отсутствие влияния объема хирургического вмешательства (при сравнении тотальной (ТПТЭ) и субтотальной (СПТЭ) паратиреоидэктомии) на частоту достижения целевых значений паратиреоидного гормона при вторичном гиперпаратиреозе ( $p > 0,95$ ). Показано снижение частоты персистенции вторичного гиперпаратиреоза (с источником, доступным для удаления из шейного доступа) при использовании тотальной паратиреоидэктомии, основанной на удалении околощитовидных желез всех возможных локализаций, доступных из шейного доступа (включая доли щитовидной железы с установленной эктопией, центральную клетчатку шеи и верхнего средостения, верхние рога вилочковой железы), ЧБНЛ = 4.

Разработан способ моделирования послеоперационного гипопаратиреоза с контролируемыми параметрами, включающими отбор животных по полу и возрасту, стандартизацию по объему удаляемой ткани, иссечение околощитовидных желез в капсуле с захватом на 0,1 мм тканей щитовидной железы, который может быть использован для изучения патогенетических механизмов метаболических нарушений и их коррекции (патент РФ № 2573381 от 09.04.2014). Метаболические и электролитные нарушения вследствие удаления околощитовидных желез приводят к нарушению дренирующей функции бронхов с формированием абсцедирующей пневмонии, почечной и сердечной недостаточности.

На модели послеоперационного гипопаратиреоза (самки линии Wistar) впервые продемонстрирована эффективность аутотрансплантации трехсуточной культуры клеток околощитовидных желез, продуцирующих паратиреоидный гормон (инъекционным введением 0,5 мл взвеси, содержащей  $2 \times 10^4$  клеток с жизнеспособностью 99,5 %), подтвержденная на основании анализа летальности/выживаемости к 30-м суткам после паратиреоидэктомии, комплексной оценки кальциевого обмена, гормонального статуса, маркеров воспаления, иммунного ответа.

Выявлено, что саногенные эффекты клеточной трансплантации реализуются посредством раннего восстановления гормонального статуса, обмена кальция, иммунологических показателей 1-го уровня, сохранением неспецифической резистентности, отсутствием морфологических признаков полиорганной недостаточности. Впервые установлено, что трансплантация культивированных аутологических клеток околощитовидной железы значительно повышает выживаемость по сравнению с аналогичным показателем при трансплантации фрагмента околощитовидной железы.

Созданы теоретические предпосылки для трансляции результатов экспериментальных исследований трансплантационной коррекции гипопаратиреоза, вызванного удалением ОЩЖ, в клиническую практику после оперативного лечения гиперпаратиреоза у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Определены преимущества тотальной паратиреоидэктомии с иссечением центральной клетчатки шеи, верхнего средостения и верхних рогов вилочковой железы при лечении гиперпаратиреоза у больных, получающих заместительную почечную терапию. Использование этого вида операции позволяет предотвратить персистенцию гиперпаратиреоза после операции у одного из 4 пациентов в сравнении с субтотальной

паратиреоидэктомией, и у одного из 11 больных – в сравнении с тотальной паратиреоидэктомией без иссечения клетчатки и верхних рогов вилочковой железы. Отсутствие увеличения частоты послеоперационных осложнений, в том числе послеоперационного гипопаратиреоза, позволяет считать такой объем операции оправданным.

Низкая частота выявления функциональной активности трансплантированных фрагментов ткани ОЩЖ после хирургического лечения вторичного гиперпаратиреоза (36 % наблюдений) подтверждает обоснованность проведения дальнейших клинических и экспериментальных исследований, направленных на разработку трансплантационных методов коррекции послеоперационного гипопаратиреоза при рассматриваемой патологии.

Разработанная технология выделения и культивирования клеток ОЩЖ и проведенные экспериментальные исследования раскрывают перспективы применения трансплантации культуры аутологичных клеток ОЩЖ в клинических исследованиях.

Клинико-экспериментальное обоснование использования тотальной паратиреоидэктомии с иссечением центральной клетчатки шеи, верхнего средостения и верхних рогов вилочковой железы с ауто трансплантацией культуры клеток ОЩЖ может быть использовано при проведении трансляционных исследований, направленных на улучшение отдаленных результатов хирургического лечения почечного гиперпаратиреоза у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии.

### **Методология и методы исследования**

Для достижения цели диссертационного исследования были применены теоретические и экспериментальные общенаучные методы.

Работа выполнена на основании клинического и экспериментального разделов исследования. Клинический раздел исследования представлен ретроспективным анализом результатов хирургического лечения пациентов с вторичным гиперпаратиреозом, находящихся на заместительной почечной терапии. Экспериментальный раздел исследования включает 2 серии опытов *in vivo* и *in vitro*. Этапы работы соответствуют поставленным задачам.

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

**1.** При вторичном гиперпаратиреозе выполнение расширенной тотальной паратиреоидэктомии с удалением околощитовидных желез всех возможных локализаций, доступных из шейного доступа (включая доли щитовидной железы с установленной эктопией, центральную клетчатку шеи и верхнего средостения, верхние рога вилочковой железы), предпочтительнее операции, основанной на эксплорации околощитовидных желез. Преимуществом операции определено снижение риска персистенции заболевания с источником, доступным из шейного доступа.

**2.** При развитии экспериментального гипопаратиреоза с сохраненным тиреоидным статусом ключевым механизмом исхода метаболических нарушений установлено снижение неспецифической резистентности организма.

**3.** Эффективность ауто трансплантации культивированных клеток околощитовидной железы, подготовленных по разработанной технологии, превосходит ауто трансплантацию фрагментов ткани околощитовидной железы в эксперименте и является патогенетически обоснованным методом коррекции послеоперационного гипопаратиреоза.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов исследования обеспечена объемом клинического и экспериментального материала с применением современных лабораторных и инструментальных методов исследования, адекватного цели и задачам исследования, применением статистической обработки полученных результатов.

Материалы исследования представлены на 22-м (24) Российском симпозиуме с международным участием «Эндокринная хирургия 2003–2014 гг.» (Санкт Петербург, 2014), II Всероссийском конгрессе с участием стран СНГ «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2014), IV научно-практической конференции молодых ученых Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (Иркутск, 2014).

#### **Внедрение в практику**

Результаты диссертационного исследования используются в лечебном процессе в хирургическом торакальном отделении ГБУЗ ИОКБ, в учебном процессе ИНЦХТ.

#### **Личное участие автора**

Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода, самостоятельно проводил анализ литературы. Автором выполнены все этапы экспериментальной работы на лабораторных животных, статистическая обработка и интерпретация результатов. Автор принимал непосредственное участие в лечебном процессе пациентов: ассистирование при операциях, ведение медицинской документации. Автором проведен сбор данных, формирование базы данных и ее анализ.

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 6 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК, 1 патент РФ.

#### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы о материалах и методах исследования, трех глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы.

Текст изложен на 198 страницах, иллюстрирован 38 таблицами и 59 рисунками. Библиография включает 198 источников, из них 70 на русском и 128 на иностранных языках.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование выполнено на основании клинических исследований и серий экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Работа является итогом научных исследований, выполненных автором в соответствии с планом научно-исследовательской работы ИНЦХТ (НИР 063 «Биомедицинские технологии профилактики и лечения органной недостаточности в реконструктивной и восстановительной хирургии», сроки выполнения 2013–2018 гг.)

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН (протокол заседания № 9 от 09.11.2012 г.).

#### **Характеристика клинических наблюдений**

Проведен анализ лечения 34 пациентов, находившихся на лечении в торакальном хирургическом отделении ГБУЗ ИОКБ в период с 2005 по 2014 гг.

Критерием включения в исследование было наличие показаний к хирургическому лечению вторичного ГПТ у пациентов, находящихся на ЗПТ, в соответствии с рекомендациями Российской ассоциации эндокринологов (2006, 2011 гг.) [Дедов И. И., Мельниченко Г. А., 2011] и Национальными рекомендациями по минеральным и костным нарушениям при хронической болезни почек (ХБП) Российского диализного общества (2011 г.).

Медиана возраста пациентов составила 50 лет (47; 57), в их числе 19 женщин (56 %), 15 мужчин (44 %). В качестве метода ЗПТ на момент оперативного лечения у 85,3 % пациентов применяли программный гемодиализ, у 5,9 % – перитонеальный диализ, у 8,8 % ЗПТ осуществлена трансплантацией почки. Медиана длительности анамнеза

по основному почечному заболеванию у пациентов с ХБП С5 Д (31 пациент) составила 17 (11; 22) лет, суммарной длительности ЗПТ – 84 (60; 130) месяца, длительности гемодиализа – 7 (3; 11) лет, длительности анамнеза по ГПТ – 3 (2; 4) года.

При анализе частоты исходов оперативного лечения выделяли группы пациентов в зависимости от объема выполненного хирургического вмешательства, уровня ПТГ (целевыми уровнями ПТГ считали в соответствии с рекомендациями KDIGO (2009 г.) для пациентов с ХБП 5 Д и в соответствии с рекомендациями K/DOQI (2003 г.) на 3–4-й стадии ХБП у пациентов с функционирующим почечным трансплантатом). ПО-гПТ считали снижение уровня ПТГ ниже целевых значений на момент цензурирования. Под персистенцией ГПТ понимали выявление ПТГ выше целевых значений в сроки до 6 месяцев, под рецидивом («возвратный ГПТ») – свыше 6 месяцев [Калинин А. П., Майстренко Н. А., Ветшев П. С., 2004].

Всего было выполнено 36 оперативных вмешательств, из них 34 первичных (16 – СПТЭ, 13 – ТПТЭ I, 5 – ТПТЭ II) и 2 повторных. После выписки из хирургического стационара пациенты обследованы в сроки от 3 до 95 месяцев.

### **Характеристика экспериментальных исследований *in vivo***

Работа была выполнена на базе научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии». Животных содержали в условиях вивария на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» (виварий I категории, вет. удостоверение 238 № 000360 от 30 апреля 2013 г., служба ветеринарии Иркутской области), со свободным доступом к воде и пище с соблюдением стандартных операционных процедур [Лепехова С. А., 2012]. В эксперимент включали крыс-самок в возрасте 6–10 месяцев весом 250–300 г.

Дизайн исследований – рандомизированное контролируемое исследование.

Всего в исследование включены 144 крысы линии Wistar, распределение на группы представлено в таблице 1.

**Таблица 1** – Распределение животных на группы в первой и второй сериях эксперимента

<b>Группа</b>	<b>Характер воздействия</b>	<b>Сутки забора</b>	<b>Кол-во животных</b>
0	Топографо-анатомические исследования		10
1.1	Модель гипокальциемии с использованием электрокоагуляции	3, 14, 30	22
1.2	Разработанная модель гипокальциемии		22
2.1	Разработанная модель гипокальциемии с заместительной терапией		28
2.2	Разработанная модель гипокальциемии с аутотрансплантацией фрагмента ОЦЖ		28
2.3	Разработанная модель гипокальциемии с аутотрансплантацией культуры клеток ОЦЖ		28
1.2	Разработанная модель гипокальциемии	30	6
Норма	Интактные животные		6
<b>Всего</b>			<b>150</b>

В первой серии исследований было проведено изучение особенностей топографо-анатомического строения щитовидной железы и ОЦЖ на основании острых опытов на крысах-самках в возрасте 6–10 месяцев. Вторым этапом была разработка способа моделирования пострезекционной гипокальциемии.

Во второй серии исследований всем животным было выполнено моделирование гипокальциемии по оригинальной методике («Способ моделирования пострезекционной гипокальциемии», патент РФ № 2573381), далее, в зависимости от способа воздействия, животных распределяли на группы.

Все экспериментальные животные находились на одинаковой диете. Заместительная терапия проводилась животным из группы 2.1 на протяжении всего срока наблюдения и животным из группы 2.3 на протяжении 2 дней до аутотрансплантации в объеме 0,012 мкг альфакальцидола («TEVA», Израиль) в сутки, 0,12–0,15 мг кальция глюконата («Виал», Россия) в сутки. Расчет дозы альфакальцидола проводили из учета 0,006 мкг на 100 г массы тела животного [Nefti E. et al., 1983; Nakatsuka K. et al., 1992]. Препараты добавляли в корм животным. Летальность контролировали в течение 30 суток.

Проводили забор крови для лабораторных исследований. После эвтаназии проводили аутопсию с забором тканей в области оперативного вмешательства и трансплантации, тканей легких, миокарда, печени, почек для приготовления микропрепаратов.

### **Характеристика экспериментальных исследований *in vitro***

Выделение, культивирование клеток ОЦЖ выполняли в клеточном боксе научного отдела экспериментальной хирургии Иркутского научного центра хирургии и травматологии. За основу разработанного метода были взяты методы M. L. Brandi et al. (1986) и С. А. Лепеховой (2007). Стендовые исследования по разработке методики были выполнены с использованием клеток, полученных от кроликов ( $n = 10$ ).

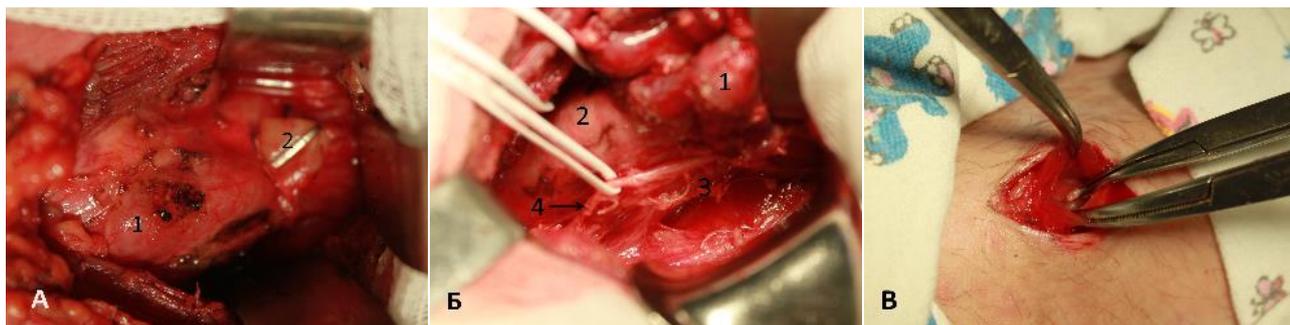
Дезагрегацию клеток проводили с использованием раствора коллагеназы, механического измельчения. Добивались удаления клеточного детрита, фрагментов капсулы. Далее выделенные жизнеспособные клетки культивировали в матрицах Ру с использованием стандартных питательных сред и добавок («Панэко», Россия) по методу Р. Фрешни (1989). Культивирование проводили в стандартных условиях в течение 3 суток и однократной сменой питательной среды с элементами субкультивирования. После снятия культуры полученные клетки центрифугировали в течение 5 минут при 1700 об./мин. После удаления надосадочной жидкости в клеточную взвесь добавляли раствор NaCl 0,9% до концентрации  $2 \times 10^4$  клеток в 0,5 мл суспензии, затем клетки трансплантировали.

### **Характеристики методов исследования**

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

Технология выполнения субтотальной ПТЭ. После выполнения поперечно-дугообразного доступа по Кохеру выделяли края грудинно-подъязычной и грудинно-щитовидной мышц. Между этими мышцами острым путем формировали туннель. В результате этого полностью освобождалась передняя поверхность грудинно-щитовидных мышц, укрывающих паренхиму щитовидной железы. Следующим этапом операции производили мобилизацию латеральной поверхности нижнего полюса щитовидной железы. Следующим этапом проводили выделение ВГН и его отведение с использованием эластичного турникета. Интраоперационная эксплорация проводилась в стандартной последовательности. Поиск ОЦЖ осуществляли в местах их наиболее частой локализации: верхних – дорсально от ВГН, нижних – вентрально, при необходимости перевязывали нижнюю щитовидную артерию или ее ветви. При отсутствии ОЦЖ в типичных местах расположения продолжали поиск в соответствующих отделах клетчатки шеи и средостения (за пищеводом, перед трахеей). Мобилизацию контрлатеральных ОЦЖ выполняли аналогично. Стремилась к визуализации не менее 4 ОЦЖ. После завершения эксплорации шеи проводили макроскопическую оценку найденных ОЦЖ и принимали решение об оставлении наименее измененной ОЦЖ или ее части размером  $5 \times 5$  мм (не более 60 мг). Фрагмент ОЦЖ

оставляли на месте или перемещали на осевом кровотоке в более поверхностные слои шеи с маркировкой металлической клипсой (рисунок 1А).



**Рисунок 1** – Интраоперационное фото: А – субтотальная ПТЭ – фрагмент ОЩЖ перемещен на переднюю поверхность щитовидной железы и маркирован клипсой (1 – щитовидная железа, правая доля; 2 – фрагмент ОЩЖ); Б – тотальная ПТЭ – вид после удаления ОЩЖ и центральной клетчатки шеи (1 – щитовидная железа; 2 – трахея; 3 – пищевод; 4 – левый ВГН); В – этап аутотрансплантации фрагментов ОЩЖ в плечелучевую мышцу.

Остальные ОЩЖ удаляли. Дренажирование операционной раны проводили с помощью силиконовых трубчатых дренажей по способу Петрова – Винника [Мятяшин И. М., Глузман А. М., 1979]. Операцию заканчивали послойным ушиванием раны.

*Технология выполнения ТПТЭ I типа (ТПТЭ I).* Доступ и эксплорацию ОЩЖ проводили аналогично технологии СПТЭ. После завершения эксплорации все найденные ОЩЖ удаляли. Проводили макроскопическую оценку удвоенных ОЩЖ, наименее измененную ОЩЖ или ее часть размером  $5 \times 5$  мм использовали для трансплантации.

*Технология выполнения ТПТЭ II типа (ТПТЭ II).* Доступ проводили аналогично технологии СПТЭ. После отведения ВГН с использованием эластичного турникета производили двухстороннее иссечение клетчатки шеи и верхнего средостения в одном блоке с ОЩЖ и верхними рогами тимуса. В зону диссекции попадала клетчатка от гортани и глотки, вдоль пищевода и трахеи, медиально от общей сонной артерии до уровня дуги аорты слева и плечевого ствола справа, верхнего средостения с верхними рогами вилочковой железы (рисунок 1Б).

При наличии узлов в щитовидной железе проводилась резекция щитовидной железы (либо гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия – при наличии соответствующих показаний к хирургическому лечению узлового зоба). После завершения шейного этапа проводили макроскопическую оценку удаленных ОЩЖ, наименее измененную ОЩЖ или ее часть размером  $5 \times 5$  мм использовали для трансплантации.

*Аутотрансплантация фрагментов ткани ОЩЖ* выполнялась по методике Уэллса [Wells S. A. et al., 1986] в верхнюю конечность, на которой не было функционирующей артериовенозной фистулы (рисунок 1В).

*Способ моделирования по И. Г. Джиеву с деструкцией тканей ОЩЖ электрокоагуляцией.* Для доступа к щитовидной железе выполняли воротничкообразный разрез в области шеи, выделяли щитовидную железу и ОЩЖ. К ОЩЖ подвели монополярный электрод диаметром 1 мм и воздействовали в течение 1 с, после чего рану послойно ушивали.

*Оперативное вмешательство при моделировании по оригинальному способу.* Производили угловой разрез кожи с формированием косынообразного лоскута. Отпрепарированный кожный лоскут отводили на зажиме. Мобилизовали слюнные железы в бессосудистой зоне. Тупым путем разделяли грудино-подъязычные мышцы по срединной линии и отводили на держалках. Визуализировали гортань и трахею. Под-

водили операционный микроскоп. При помощи микрохирургических инструментов мобилизовали щитовидную железу и ОЩЖ. Пинцетом подтягивали кверху ОЩЖ, ножницами отсекали ОЩЖ, резецируя при этом щитовидную железу, после чего наносили на поверхность дефекта ткани щитовидной железы клей «Сульфакрилат» с использованием инъекционной иглы 30G. Рану послойно ушивали.

*Аутотрансплантация фрагментов ОЩЖ у животных проводилась в широчайшую мышцу спины аналогично методике Уэллса.*

*Техника аутотрансплантации культуры клеток.* Через 3 суток после ПТЭ животным из группы 2.3 инъекционным способом после обработки кожи раствором антисептика вводилась взвесь культуры аутологичных клеток в объеме 0,5 мл при помощи иглы 23G в край широчайшей мышцы спины справа.

### ***Методы диагностики в клинике***

Кроме стандартного клинико-лабораторного обследования, включавшего общий анализ крови, биохимические показатели, проводились электрокардиография, фиброгастродуоденоскопия, ультразвуковое исследование сердца, органов брюшной полости и забрюшинного пространства, сосудов.

Биохимические исследования проводили в лаборатории ГБУЗ ИОКБ, в анализ включены следующие показатели: общий кальций, фосфор, ионизированный кальций, щелочная фосфатаза (единицы измерения – ммоль/л, Ед/л).

ПТГ определяли с использованием радиоиммунологического метода (единица измерения – пг/мл), иммунохемилюминесцентного анализа (единица измерения – пмоль/л); при переводе единиц измерения использовали формулу: пг/мл  $\times$  0,105 = пмоль/л.

Осмотр голосовых складок проводили врачи отоларингологического отделения ГБУЗ ИОКБ (заведующий отделением – Ш. Д. Исхаков) методом непрямой ларингоскопии.

Оценку функции трансплантата ОЩЖ выполняли по методике упрощенного теста Казановы [Schlosser K. et al., 2004].

### ***Методы исследования в эксперименте***

Кровь для исследований забирали при помощи катетера HELMFLON G24 0,7  $\times$  19 мм из бедренной вены наркотизированных крыс. Для определения нормальных показателей использовали сыворотку крови 6 интактных крыс, содержащихся в одинаковых условиях с экспериментальными. Радиоиммунологические исследования (ПТГ) выполняли на базе Центра нуклеарной диагностики ГБУЗ ИОКБ, единица измерения – пг/мл. Определение уровня ионизированного кальция проводили с использованием электродного метода, единица измерения – ммоль/л. Иммунологические исследования и определение общего числа лейкоцитов, лейкоцитарной формулы проводили в лабораторном отделе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ДПО ИГМАПО Минздрава РФ. Морфологические исследования микропрепаратов выполнены на базе лаборатории патоморфологии ИНЦХТ совместно с ведущим научным сотрудником к.м.н. О. А. Гольдбергом. Контроль бактериальной контаминации проводили на всех этапах выделения клеток [Старке Г., 1970]. Подсчет жизнеспособности клеток проводили с помощью теста на исключение красителя [Фрешни Р., 1989].

### ***Методы статистической обработки***

Статистическая обработка результатов произведена с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows [Боровиков В. П., Боровиков И. П., 1997]. Данные представляли в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля) [Бащинский С. Е., 1997]. Определение значимости различий полученных данных (*p*) в сравниваемых выборках проведено по критериям Манна – Уитни (U), Вилкоксона (W), Хи-

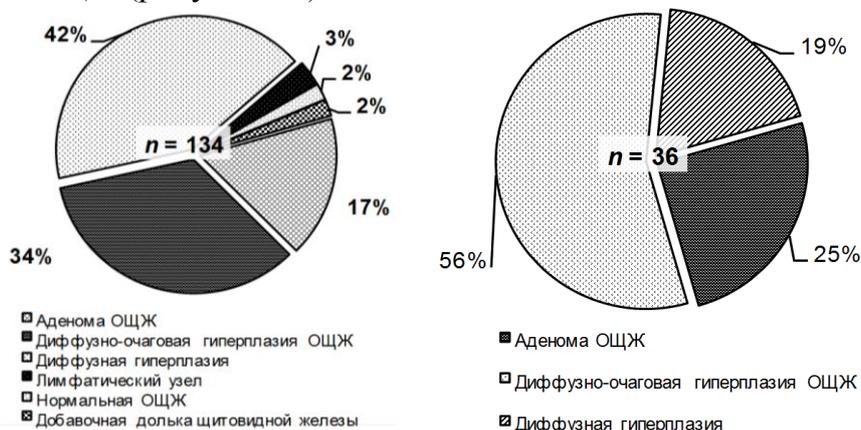
квадрат, F-критерия Кокса, точного метода Фишера, по методу Каплана – Мейера с использованием теста Вилкоксона с поправкой Пето [Боровиков В. П., Боровиков И. П., 1997; Гланц С., 1998; Реброва О. Ю., 2002]. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе результатов хирургического лечения ГПТ у пациентов, находящихся на ЗПТ, были изучены морфологические изменения ОЩЖ в операционном материале.

Всего на патогистологическое исследование было направлено 134 макропрепарата, маркированных как ОЩЖ. Из всех макропрепаратов в 128 (95,5 %) случаях была верифицирована ткань ОЩЖ (рисунок 2А). 4 макропрепарата были представлены тканью лимфатических узлов, 2 – фрагментами ткани щитовидной железы. В 3 случаях была выявлена неизменная ткань ОЩЖ, в 56 случаях изменения в ОЩЖ были представлены диффузно-очаговой гиперплазией (ДОГ), в 46 случаях – диффузной гиперплазией (ДГ), в 23 случаях – аденомой на фоне гиперплазии ОЩЖ.

При изучении результатов патогистологического исследования ОЩЖ у каждого пациента установлено, что в 9 случаях в одной или более ОЩЖ выявляли аденому ОЩЖ на фоне гиперплазии, в 20 случаях – ДОГ, у 7 пациентов во всех ОЩЖ выявляли только ДГ ОЩЖ (рисунок 2Б).



**Рисунок 2** – Структура операционного материала по результатам патогистологического исследования макропрепаратов (А) и распределение пациентов по максимальной тяжести морфологических изменений в ОЩЖ по результатам патогистологического исследования операционного материала (Б).

При исследовании макропрепаратов после операции, маркированных как ОЩЖ, в 3 (2,2 %) препаратах в ОЩЖ отсутствовала гистологическая картина, характерная для ГПТ, структура ОЩЖ соответствовала нормальному строению. В 6 (4,5 %) препаратах, маркированных как ОЩЖ, выявлена структура лимфатических узлов или ткани ЩЖ. Распределение пациентов в зависимости от результата патогистологического исследования макропрепаратов, маркированных как ОЩЖ, представлено на рисунке 3.



**Рисунок 3** – Распределение пациентов по результативности интраоперационной эксплорации ОЩЖ по результатам патогистологического исследования операционного материала.

Анализ частоты выявления различных морфологических изменений при наличии и отсутствии гиперкальциемии как признака функциональной автономии свидетельствует о преобладании частоты выявления аденом при гиперкальциемии ( $p = 0,025$ ) и тенденции к снижению частоты выявления изолированной ДГ ( $p = 0,067$ ). Не выявлено статистически значимых различий в частоте выявления аденомы и ее отсутствия при гиперкальциемии, в то время как при отсутствии функциональной автономии, оцененной по уровню кальция, частота выявления аденом оказалась статистически значимо низкой ( $p < 0,0001$ ), а частота изолированной гиперплазии – высокой ( $p = 0,023$ ). ДОГ выявлялась при обоих вариантах клинического проявления ГПТ с подобной частотой ( $p = 0,922$ ).

Выявленные зависимости подтверждают роль аденомы ОЩЖ в развитии функциональной автономии. В то же время статистически незначимое различие в частоте формирования функциональной автономии при ДОГ оставляет место для дискуссии в отношении терминологии «третичного ГПТ». Кроме того, установлено, что гиперплазия при вторичном ГПТ не всегда происходит во всех железах одновременно: часть желез сохраняет нормальное морфологическое строение. В нашем исследовании нормальные ОЩЖ выявлены у 8 % больных.

Оценка исхода хирургического вмешательства методом Каплана – Мейера не выявила различий в проявляемости персистенции, рецидива заболевания и достижения целевых значений ПГТ в зависимости от наличия или отсутствия ДГ, аденомы ОЩЖ ( $p > 0,1$  и  $p > 0,5$  соответственно). В то же время установлено увеличение свободной от развития ПОГПТ выживаемости при выявлении ДОГ ОЩЖ (Cox's F-Test  $p = 0,02$ ). Зависимость сохранилась при проведении многофакторного анализа с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса, при добавлении в модель вида операции ( $p = 0,053$ ). Свободная от рецидива выживаемость оказалась значимо выше при отсутствии гиперкальциемии до операции ( $p = 0,04$ ), зависимость сохранялась при включении в модель вида операции ( $p = 0,02$ , модель пропорциональных интенсивностей Кокса).

Полученные данные позволяют считать, что клинико-морфологические особенности заболевания влияют на исход хирургического вмешательства вне зависимости от его вида. В этой связи попытки дифференцировать объем операции в зависимости от морфологического субстрата или наличия функциональной автономии можно считать бесперспективными, а термин «третичный ГПТ» нецелесообразно выделять при обсуждении хирургической тактики. Несинхронность морфологических изменений в ОЩЖ определяет объективные трудности при интраоперационной эксплорации.

#### *Непосредственные результаты хирургического лечения вторичного ГПТ*

Послеоперационной летальности не было. Послеоперационные осложнения развились в 16,7 % случаев. В 1 наблюдении осложнением была медиастинальная гематома после стернотомии и удаления эктопированной аденомы. Осложнение было устранено с использованием торакоскопии. Стойкий односторонний компенсированный парез гортани, развившийся в 1 наблюдении, был связан с вынужденной резекцией лапки возвратного гортанного нерва (ВГН) при повторной операции на шее. Фактором, значимо повышающим риск развития послеоперационного пареза гортани, было выполнение симультанной гемитиреоидэктомии или тиреоидэктомии ( $p = 0,028$ , критерий Хи-квадрат).

В первые сутки послеоперационного периода у 32 пациентов отмечали развитие гипокальциемии, у 2 – развитие нормокальциемии (пациенты с аллотрансплантацией трупной почки (АТП) после СПТЭ). Медиана ионизированного кальция крови на первые сутки после операции составила 0,81 (0,80; 0,97) ммоль/л. Уровень общего

кальция крови при выписке пациента составил 1,93 (1,50; 2,08) и был значимо ниже по сравнению с уровнем дооперационного кальция ( $p_w < 0,0001$ ). Уровень ПТГ значимо снизился до 62,0 (31,0–170,0) ( $p_w = 0,046$ ).

*Отдаленные результаты хирургического лечения вторичного ГПТ*

К моменту окончания набора данных под наблюдением оставался 31 пациент. 3 пациента погибли в отдаленные сроки наблюдения. Отдаленные результаты оценены на 35 наблюдениях. В 15 случаях развился ПОГПТ (43 %), в 8 наблюдениях достигнут целевой уровень ПТГ (23 %), в 3 случаях диагностирован рецидив заболевания (8 %) и в 9 случаях выявлена персистенция ГПТ (26 %).

*Рецидив ГПТ* выявлен в 3 наблюдениях. Источники рецидива представлены в таблице 2. Частота выявления рецидива заболевания после выполнения СПТЭ составила 12,5 %, после ТПТЭ – 5,5 %. Снижение абсолютного риска рецидива заболевания при ТПТЭ составило 6,9, число больных с неблагоприятным исходом лечения (ЧБНЛ) – 14,4.

*Персистенция ГПТ* выявлена в 9 наблюдениях. В 5 случаях персистенция установлена при СПТЭ, в 2 – при ТПТЭ I, в 2 – при ТПТЭ II. Источником персистенции ГПТ после ТПТЭ II в 1 случае оказался трансплантат на предплечье, после ТПТЭ I в 1 случае – добавочная нижняя левая ОЩЖ, в 1 случае – эктопированная в аортолегочное окно аденома ОЩЖ (таблица 2).

**Таблица 2** – Структура источников персистенций и рецидивов гиперпаратиреоза

Локализация	<i>n</i>	Вид исхода	Операция
Уточняется	1	Причина персистенции	ТПТЭ II
Трансплантат	1	Причина персистенции	ТПТЭ II
Добавочная на шее	1	Причина персистенции	ТПТЭ I
Эктопия в грудную клетку	1	Причина персистенции	ТПТЭ I
Тимус	1	Причина персистенции	СПТЭ
Типичное расположение	4	Причина персистенции	СПТЭ
Щитовидная железа + типичное расположение	1	Причина рецидива	СПТЭ
Уточняется	2	Причина рецидива	ТПТЭ I

При анализе частоты персистенции ГПТ в зависимости от выполненного объема хирургического вмешательства исключены по одному случаю в каждой группе. В группе с СПТЭ и ТПТЭ I исключены случаи персистенции при атипичной вне шейной локализации, в группе ТПТЭ II – доказанный случай гиперфункции ауто трансплантата ОЩЖ.

Частота персистенции заболевания не имела статистически значимых различий в зависимости от вида операции: СПТЭ, ТПТЭ I и ТПТЭ II. В то же время частота выявления персистенции ГПТ при СПТЭ составила 26 %, при ТПТЭ I – 9 %, при ТПТЭ II – 0 %. Снижение абсолютного риска (САР) персистенции заболевания при ТПТЭ I, в сравнении с СПТЭ, составило 17 %, при ТПТЭ II – 26 %. ЧБНЛ при ТПТЭ I, в сравнении с СПТЭ, составило 5,8, при ТПТЭ II – 3,84. При сравнении ТПТЭ II и ТПТЭ I ЧБНЛ составило 11.

Безрецидивная выживаемость при СПТЭ составила через 40 месяцев после операции 60 %, при ТПТЭ – 75 %, через 100 месяцев – 0 % и 40 % соответственно ( $p = 0,268$ ). При этом тестирование вида операции в многофакторном анализе с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса с включением в модель длительности наблюдения за пациентом после оперативного лечения показало значимое ее влияние на безрецидивную выживаемость ( $p = 0,030$ ). Чем длительнее период наблюдения пациента после операции, тем меньше безрецидивная выживаемость.

АТ фрагментов ОЩЖ при тотальном варианте ПТЭ остается наиболее опасным, с точки зрения персистенции ГПТ, хирургическим этапом операции.

Эктопированные ОЩЖ выявлены нами в 14 % наблюдений. При этом в 3 случаях они стали источником персистенции заболевания, и две из них были доступны из шейного разреза. 2 эктопированные ОЩЖ удалены при первичной ТПТЭ II.

ПОгПТ выявлен у 15 пациентов. Медиана длительности наблюдения больных с ПОгПТ составила 27 (13; 44) месяцев. Гипопаратиреоз развился в 5 наблюдениях после СПТЭ и в 9 – после ТПТЭ с АТ ( $p = 0,267$ ). При СПТЭ частота развития ПОгПТ не имела статистически значимых различий от технологии сохранения ОЩЖ. При АТ ОЩЖ ПОгПТ выявлен у 8 из 18 больных.

Частота развития ПОгПТ после СПТЭ составила 31,25 %, после ТПТЭ – 50 %. Снижение абсолютного риска ПОгПТ при СПТЭ составило 18,8. ЧБНЛ при СПТЭ равно 5,3. ЧБНЛ для профилактики развития ПОгПТ при выполнении СПТЭ составило 5.

Целевые значения уровня ПТГ достигнуты у 8 пациентов: у 4 больных после СПТЭ и у 4 больных после ТПТЭ ( $p > 0,95$ ). Медиана времени достижения целевых значений составила 2,5 (1; 8,5) месяца после операции. Медиана длительности наблюдения больных в целевых значениях ПТГ составила 25 (9–52) месяца. В 3 наблюдениях на фоне целевых значений ПТГ развился рецидив ГПТ. Целевые значения уровня ПТГ достигнуты у 22,9 % больных вне зависимости от вида хирургического вмешательства. Рецидивы ГПТ после достижения целевых значений были связаны с наличием эктопированных ОЩЖ и прогрессированием патологических изменений в «оставленных» макроскопически не измененных при эксплорации во время первичной операции ОЩЖ.

Свободная от достижения целевых значений ПТГ выживаемость незначимо ниже при ДГ (57 %) по сравнению с аденомой (67 %) и ДОГ (68 %) ОЩЖ ( $p > 0,1$ ). При анализе с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса установлено отсутствие зависимости свободной от достижения целевых значений ПТГ выживаемости от длительности наблюдения пациента после операции и тяжести морфологических изменений ОЩЖ ( $p > 0,95$ ).

Оценка функции трансплантата ОЩЖ выполнена 11 из 18 пациентов, которым была проведена АТ фрагментов ткани ОЩЖ после ТПТЭ при помощи упрощенного теста Казановы. Наличие функционально активного трансплантата установлено у 4 (36 %) пациентов, перенесших АТ фрагментов ткани ОЩЖ, при этом целевые значения ПТГ установлены у 1 больного.

Таким образом, проведенный анализ результатов хирургического лечения вторичного ГПТ позволяет заключить, что:

1. Неблагоприятным признаком, с точки зрения развития рецидива заболевания, можно считать наличие гиперкальциемии на момент операции, а с точки зрения развития ПОгПТ – отсутствие ДОГ ОЩЖ. Клинико-морфологические особенности заболевания влияют на исход хирургического вмешательства вне зависимости от его вида.

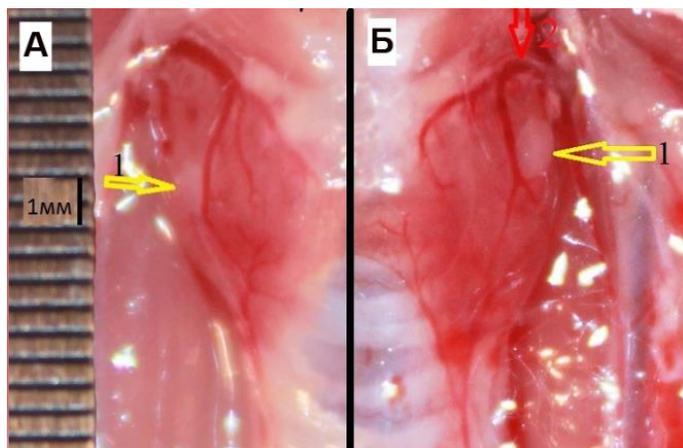
2. Частота послеоперационных осложнений не имеет статистически значимых различий при субтотальной и различных вариантах ТПТЭ.

3. ТПТЭ имеет преимущества в сравнении с СПТЭ, с точки зрения предотвращения персистенции ГПТ с источником на шее. Наиболее эффективным вариантом ТПТЭ с этой точки зрения рассматриваем ТПТЭ II. CAP = 26 %, ЧБНЛ = 4.

4. ТПТЭ с АТ и СПТЭ не имеют различий по частоте достижения целевых значений ( $p > 0,95$ ).

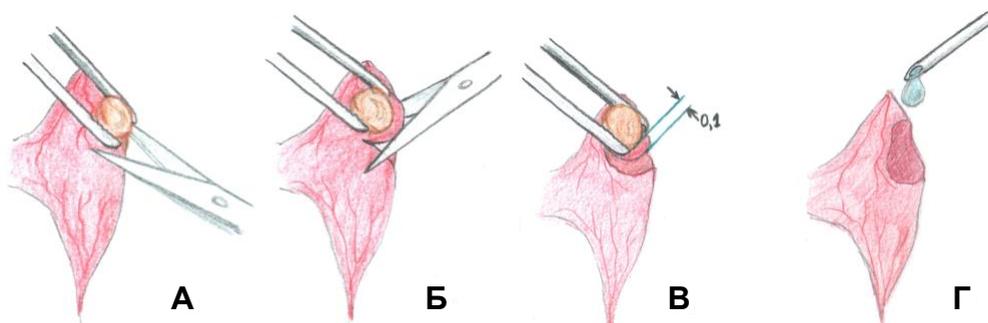
5. Целевые значения ПТГ, связанные с функционирующим трансплантатом, получены лишь у 9 % пациентов, что подтверждает необходимость разработки более эффективных технологий заместительной терапии ПОгПТ.

При разработке способа моделирования гипокальциемии в условиях ПТЭ проведены анатомические исследования ОЩЖ крыс-самок разного возраста. Нами выявлены варианты особенности строения ОЩЖ, доказано, что для работы необходимо использовать крыс-самок в возрасте 10 месяцев, ОЩЖ которых имеют выраженную капсулу и возвышаются над поверхностью щитовидной железы (рисунок 4).



**Рисунок 4** – Крыса-самка линии Wistar: А – возраст 6 месяцев (1 – ОЩЖ погружена в ткань щитовидной железы); Б – возраст 10 месяцев (1 – ОЩЖ с четкими границами, возвышается над поверхностью щитовидной железы; 2 – краниальная щитовидная артерия).

Отличительными приемами разработанного нами способа ПТЭ явились: угловой разрез кожи с формированием «косынкообразного» лоскута мобилизация структур шеи с использованием микрохирургической техники и операционного микроскопа, ПТЭ путем резекции в пределах ткани щитовидной железы на 0,1 мм от капсулы ОЩЖ, нанесение на раневую поверхность щитовидной железы медицинского клея «Сульфакрилат» (рисунок 5). Установлено что при угловом разрезе кожи с формированием косынкообразного лоскута при доступе к ОЩЖ удастся сместить кожный шов от области щитовидной железы, что позволило улучшить течение репаративных процессов и предотвратило вовлечение щитовидной железы в формирование рубца.

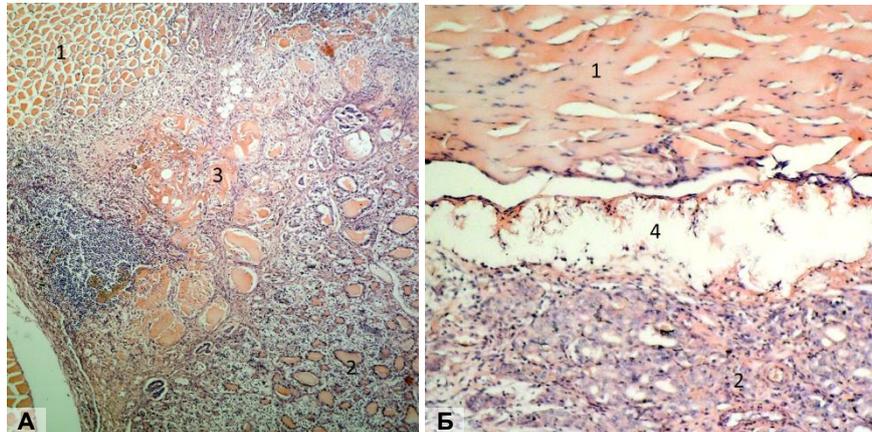


**Рисунок 5** – Этапы ПТЭ по предложенному способу: А – иммобилизация ОЩЖ; Б – ОЩЖ приподнята за капсулу пинцетом, рассечение тканей щитовидной железы с дорсо-латерального края; В – иссечение ОЩЖ из тканей щитовидной железы в пределах 0,1 мм; Г – нанесение клея «Сульфакрилат» на поверхность дефекта щитовидной железы.

Выявлено, что удаление ОЩЖ с резекцией 0,1 мм прилежащей ткани щитовидной железы с использованием микрохирургической техники обеспечивает устойчивое снижение уровня ПТГ в 15 раз по сравнению с нормальным показателем ( $p_U = 0,003$ ), ионизированного кальция крови – в 2 раза по сравнению с нормальным показателем. Различие между максимальным и минимальным значениями уровня ионизированного кальция после ПТЭ по оригинальному способу составило 0,13 ммоль/л через 3-е суток и существенно не менялось: через 14 суток оно составило 0,12 ммоль/л. Одинаковая степень тяжести гипокальциемии у всех животных позволяет с большей точностью оценить эффекты заместительной терапии.

Нанесение клея «Сульфакрилат» обеспечило надежный гемостаз раневой поверхности щитовидной железы, явилось дополнительной профилактикой раневых осложне-

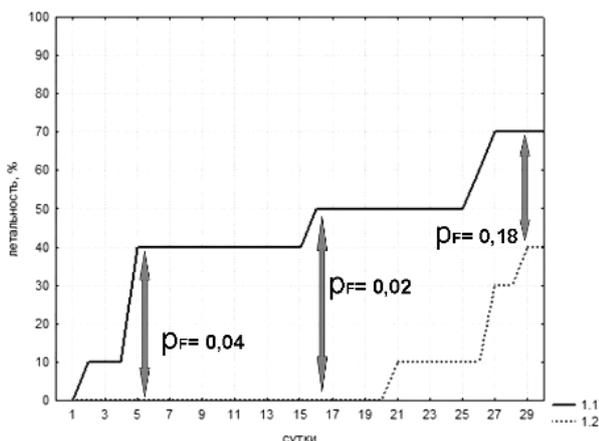
ний за счет антисептических свойств клея. При гистологическом исследовании тканей в области оперативного вмешательства у животных с ПТЭ по оригинальному способу (рисунок 6Б) выявляли щитовидную железу с сохраненными фолликулами и формирующейся «тонкой» соединительнотканной капсулой, волокна скелетной мышцы с сосудами, полость с небольшим количеством клея «Сульфакрилат» без признаков перифокального воспаления и уменьшением рубцового процесса в зоне вмешательства при массивных деструктивных, воспалительных изменениях с очагами некроза щитовидной железы в группе контроля с электрокоагуляцией ОЦЖ (рисунок 6А).



**Рисунок 6** – Крыса-самка, 3-и сутки после паратиреоидэктомии: **А** – организация и инкапсуляция очагов ткани с коагуляционным некрозом в области оперативного вмешательства у животных в группе 1.1 (окраска гематоксилином и эозином, об. 4×, ок. 10×); **Б** – организация и инкапсуляция области оперативного вмешательства с использованием клея «Сульфакрилат» у животных в группе 1.2 с моделированием гипокальциемии по оригинальному способу (окраска гематоксилином и эозином, об. 10×, ок. 10×); **1** – скелетная мышца; **2** – щитовидная железа; **3** – очаги коагуляционного некроза тканей; **4** – полость с клеем «Сульфакрилат».

После ПТЭ по оригинальному способу через 3 и 14 суток после оперативного вмешательства уровни свободного трийодтиронина (Т3св.), свободного тироксина (Т4св.) и тиреотропного гормона (ТТГ) находились в пределах нормальных значений, что говорит о сохранении нормальной функции щитовидной железы в раннем послеоперационном периоде и исключает влияние гипотиреоза на изучаемые явления. При этом мы показали, что при разрушении ОЦЖ при помощи электрокоагуляции в течение 14 суток животное находится в гипотиреоидном состоянии.

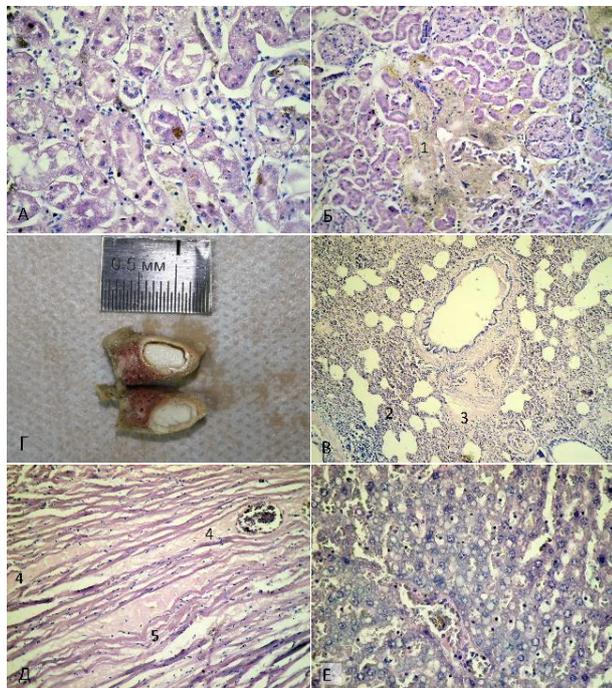
Установлено, что ПТЭ по оригинальному способу приводит к меньшей летальности (рисунок 7) в раннем послеоперационном периоде на 5-е сутки по сравнению с разрушением ткани ОЦЖ при помощи электрокоагуляции ( $p_F = 0,04$ ), выявленная закономерность сохраняется до 20-х суток исследования, что можно связать с отсутствием ранних осложнений операции, которые приводят к летальному исходу у животных. В отдаленном периоде, с 21-х суток, летальность связана с моделируемым состоянием, 30-суточная летальность составила 40 %.



Установлено, что ПТЭ по оригинальному способу приводит к меньшей летальности (рисунок 7) в раннем послеоперационном периоде на 5-е сутки по сравнению с разрушением ткани ОЦЖ при помощи электрокоагуляции ( $p_F = 0,04$ ), выявленная закономерность сохраняется до 20-х суток исследования, что можно связать с отсутствием ранних осложнений операции, которые приводят к летальному исходу у животных. В отдаленном периоде, с 21-х суток, летальность связана с моделируемым состоянием, 30-суточная летальность составила 40 %.

**Рисунок 7** – График летальности животных в первой серии исследований.

Возникшие метаболические нарушения после ПТЭ разработанным способом характеризуются стойким снижением уровня ПТГ в 15 раз по сравнению с нормальным показателем, гипокальциемией тяжелой степени, сохранением тиреоидного статуса, снижением поглотительной способности нейтрофилов к 14-м суткам. В патогенезе гипопаратиреоза с тяжелой некорригированной гипокальциемией в отдаленном послеоперационном периоде выявлено развитие полиорганной недостаточности (рисунок 8).

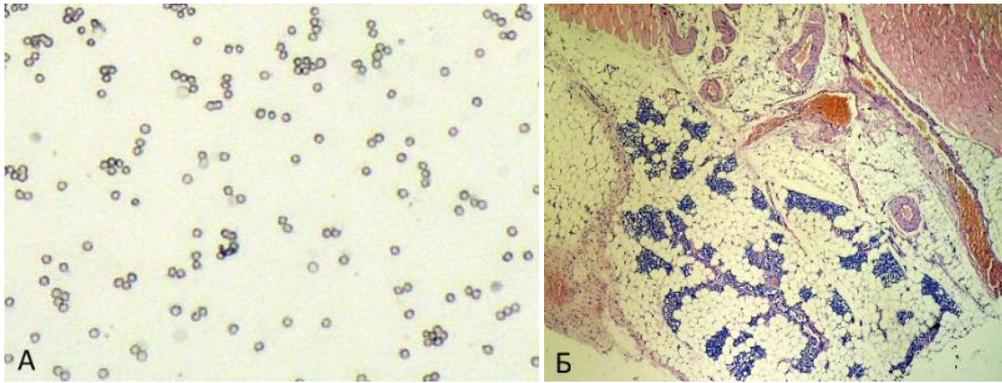


**Рисунок 8** – Морфологические изменения в органах животных после моделирования гипокальциемии по оригинальному способу. Окраска гематоксилином и эозином: **А** – смерть на 21-е сутки, гидропическая дистрофия клеток эпителия нефронов (об. 20×, ок. 10×); **Б** – смерть на 29-е сутки (**1** – кровоизлияние в паренхиму коры почки; об. 10×, ок. 10×); **В** – смерть на 21-е сутки, межлужочковая пневмония (**2** – расширение межальвеолярных перегородок, дистелектазы; **3** – отек); **Г** – макроскопическая картина абсцесса легкого, смерть на 29-е сутки; **Д** – смерть на 29-е сутки, дистрофические изменения кардиомиоцитов (**4** – отёк стромы; **5** – извитой ход мышечных волокон; окраска гематоксилином и эозином, об. 10×, ок. 10×); **Е** – смерть на 29-е сутки, жировая дистрофия гепатоцитов (окраска гематоксилином и эозином, об. 20×, ок. 10×).

После моделирования гипопаратиреоза по разработанному нами способу морфологические признаки бронхоспазма выявляли у животных через 3 суток после ПТЭ, что в отсутствие заместительной терапии приводило в дальнейшем к развитию воспалительных изменений в легких – от межлужочковой пневмонии до формирования абсцессов. Изменения в почках в условиях тяжелой некорригированной гипокальциемии в отдаленном послеоперационном периоде характеризовались отёком, расширением мезангия клубочков, вакуолизацией и отеком клеток эпителия канальцев нефронов, уменьшением размера клубочков, дистрофическими изменениями клеток эпителия нефронов, наличием кровоизлияний в паренхиме почки. В миокарде выявляли дистрофические изменения кардиомиоцитов, извитой ход мышечных волокон. В тканях печени выявляли дистрофические изменения.

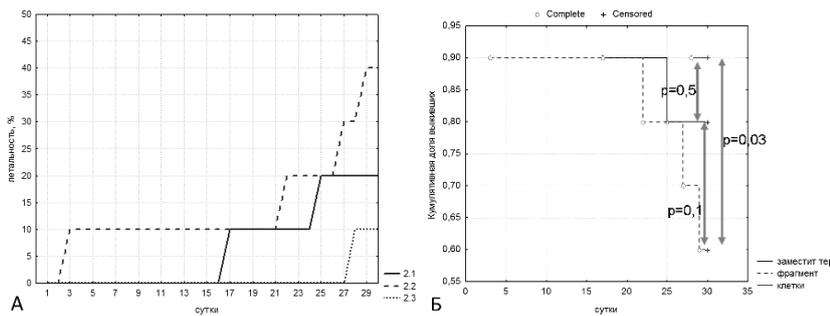
Усовершенствованная технология получения культуры клеток ОЦЖ (рисунок 9А) позволяет получать клеточный материал из 0,06 г в количестве  $2 \times 10^4$  в 0,5 мл с жизнеспособностью 99 % (98; 100), продуцирующие ПТГ, что доказано определением ПТГ в культуральной среде в значении 753,0 (690,0; 764,4) пг/мл на 3- и сутки культивирования. В культуре преобладают клеточные ассоциации, преимущественно из светлых клеток.

Установлено, что трансплантированные культивированные аутологичные клетки ОЦЖ через 14 суток формируют органоидные структуры (рисунок 9Б) с новообразованными сосудами без перифокальной воспалительной реакции, с сохранением структуры через 30 суток, что свидетельствует о высокой жизнеспособности и функциональной активности пересаженных клеток. При этом приживляемость трансплантированных фрагментов составила 33 %.



**Рисунок 9** – Клетки ОЦЖ (А) после выделения из органа. Нативный мазок, без окраски. Об. 100×, ок. 10×. Крыса, группа 2.3 (Б), 14-е сутки исследования, световая микроскопия тканей в области трансплантации аутологичных клеток ОЦЖ. Окраска гематоксилином и эозином, ок. 10×, об. 10×.

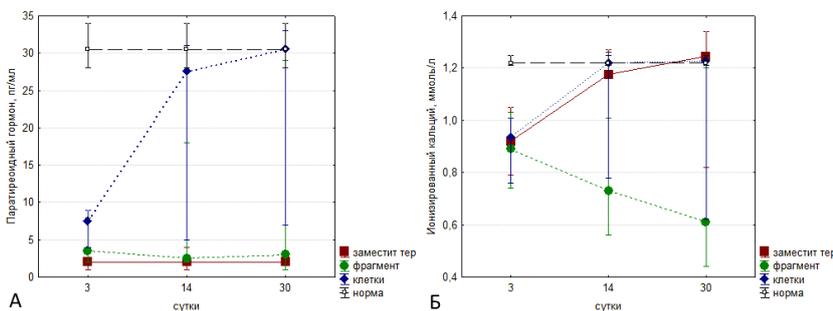
При оценке эффективности коррекции гипопаратиреоза ауотрансплантацией культуры клеток ОЦЖ, по данным летальности/выживаемости, установлено (рисунок 10), что при оценке летальности значимых различий не выявлено по сравнению с группами контроля, однако выживаемость при ауотрансплантации культуры клеток ОЦЖ составила 90 %, что было существенно выше к 30-м суткам, по сравнению с группой 2.2, где выполняли ауотрансплантацию фрагмента 60 %, и не отличалась от



аналогичного значения в группе с заместительной терапией альфакальциолом и глюконатом кальция.

**Рисунок 10** – Графики летальности (А) и выживаемости (Б) животных во второй серии исследований.

Выявлено, что при ауотрансплантации культуры клеток ОЦЖ нормализация уровней ПТГ и ионизированного кальция происходит через 11 суток после трансплантации и сохраняется в пределах нормальных значений через 30 суток после моделирования (рисунок 11).



**Рисунок 11** – Графики уровней ПТГ (А) и ионизированного кальция (Б) в сыворотке венозной крови животных во второй серии в динамике эксперимента.

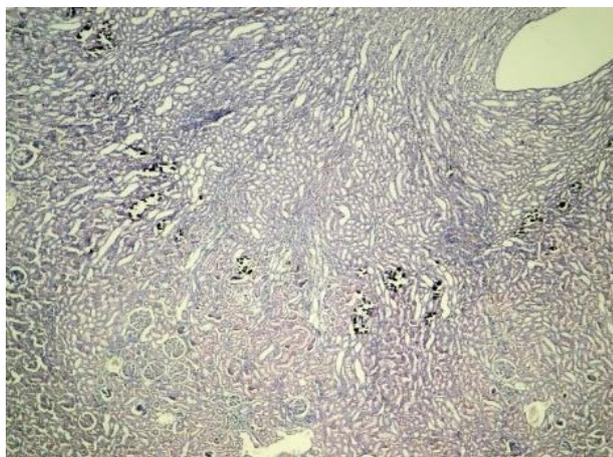
При ауотрансплантации фрагмента ОЦЖ нормализация уровней ПТГ и ионизированного кальция отмечена у 33 % животных через 30 суток. В группе 2.1 с проведением заместительной терапией препаратами альфакальцидол и кальция глюконата уровень ПТГ оставался значительно сниженным на протяжении всего срока наблюдения, уровень ионизированного кальция нормализовался через 14 суток после моделирования гипокальциемии и сохранялся в пределах нормальных значений через 30 суток.

Нами при анализе показателей воспаления установлено, что аутотрансплантация культуры клеток ОЩЖ в мышцу при моделировании гипопаратиреоза способствует существенному снижению общего числа лейкоцитов, по сравнению с аутотрансплантацией фрагмента и заместительной терапией, и нормализации лейкоцитарной формулы через 14 и 30 суток после ПТЭ.

При оценке фагоцитоза у животных после АТ культуры клеток ОЩЖ в мышцу выявлено отсутствие изменений показателей активности и интенсивности фагоцитоза на 3-и, 14-е и 30-е сутки, сохранение в пределах нормальных значений на протяжении 30 суток показателя кислородзависимого механизма бактерицидности нейтрофилов, снижение показателя функционального резерва нейтрофилов через 14 суток и его восстановление через 30 суток. В то же время через 30 суток после аутотрансплантации фрагмента ОЩЖ у животных сохранялся сниженный показатель интенсивности фагоцитоза, кислородзависимой бактерицидности и функционального резерва нейтрофилов. У животных с медикаментозной коррекцией гипокальциемии через 30 суток выявлено снижение показателей кислородзависимой бактерицидности и функционального резерва нейтрофилов. Используя фиксированные нелинейные модели было установлено, что ключевым механизмом восстановления неспецифической резистентности при коррекции ПОгПТ явилось восстановление активности фагоцитоза посредством восстановления уровня ПТГ.

Выявлено, что трансплантация культуры аутологичных клеток ОЩЖ приводит к сохранению нормального строения ткани почек и легких через 30 суток.

Заместительная терапия послеоперационной гипокальциемии приводит к уменьшению тяжести морфологических изменений. Нами выявлен кальциноз (рисунок 12) субкортикального слоя паренхимы почек при терапии в течение 30 дней у крыс с нормокальциемией, что указывает на возможность раннего развития побочных эффектов при консервативном лечении ПОгПТ и сложности быстрой и адекватной коррекции дозы препаратов заместительной терапии.



У животных с коррекцией альфа-кальцидолом и кальция глюконатом, 30-е сутки. Известковые отложения в субкортикальном слое паренхимы почек. Окраска гематоксилином и эозином, об. 4×, ок. 10×.

**Рисунок 12** – Морфологические изменения в почке животных с коррекцией альфа-кальцидолом и кальция глюконатом, 30-е сутки. Известковые отложения в субкортикальном слое паренхимы почек. Окраска гематоксилином и эозином, об. 4×, ок. 10×.

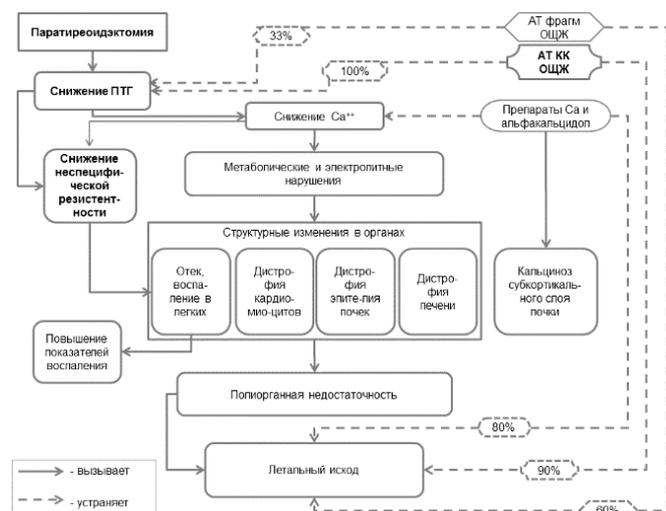
Морфологические изменения в легких животных с АТ фрагментов ОЩЖ проявлялись признаками бронхоспазма с межуточной пневмонией, дистрофическими явлениями эпителия нефронов, уменьшением размера клубочков.

Выявленные закономерности послужили основанием для создания концептуальной схемы саногенеза гипопаратиреоза под влиянием различных методов его коррекции (рисунок 13).

Патогенетическими механизмами развития метаболических нарушений определены снижение уровня ПТГ и ионизированного кальция, что приводит к развитию структурных изменений легких (в виде бронхоспазма с формированием абсцедирующей пневмонии), почках (отек и деструкция эпителия клубочков), миокарде (дистрофические изменения).

Саногенетические эффекты трансплантированной культуры аутологичных клеток ОЩЖ реализуются посредством восстановления к 11-м суткам после трансплантации

уровня ПТГ, ионизированного кальция, иммунологических показателей 1-го уровня, сохранением неспецифической резистентности, отсутствием изменений в паренхиме



почек, легких, миокарде. Медикаментозная коррекция послеоперационной гипокальциемии приводит к уменьшению тяжести морфологических изменений, характерных для ПОгПТ, при этом к 30-м суткам эксперимента выявляется кальциноз субкортикального слоя паренхимы почек.

**Рисунок 13** – Концептуальная схема коррекции ПОгПТ аутотрансплантацией ОЩЖ и медикаментозной терапии гипокальциемии.

Созданы теоретические предпосылки для трансляции результатов экспериментальных исследований трансплантационной коррекции гипопаратиреоза, вызванного удалением ОЩЖ, в клиническую практику. Клинико-экспериментальное обоснование использования ТПТЭ с иссечением центральной клетчатки шеи, верхнего средостения и верхних рогов вилочковой железы с АТ КК ОЩЖ может быть использовано при планировании трансляционных исследований, направленных на улучшение отдаленных результатов хирургического лечения вторичного ГПТ у пациентов, находящихся на ЗПТ.

## ВЫВОДЫ

**1.** Отсутствие сопряженности и синхронности клинико-морфологических признаков заболевания затрудняет интраоперационную эксплорацию ОЩЖ на шее, что определяет необходимость выполнения расширенного объема операции. Эффективность интраоперационной эксплорации ОЩЖ составляет 81 %. В 14 % наблюдений установлены эктопированные ОЩЖ, 80 % из них доступны для удаления из шейного доступа.

**2.** Сравнительный анализ хирургических вмешательств показал преимущества расширенной паратиреоидэктомии. Тотальная паратиреоидэктомия с аутотрансплантацией и субтотальная паратиреоидэктомия не имеют различий по частоте достижения целевых значений ПТГ ( $p > 0,95$ ). Частота персистенции заболевания с источником, доступным для удаления из шейного доступа, при СПТЭ составила 26 %; при ТПТЭ, основанной на эксплорации ОЩЖ – 11 % (ЧБНЛ = 6 в сравнении с СПТЭ); при ТПТЭ, основанной на удалении ОЩЖ всех возможных локализаций, доступных из шейного доступа (включая доли щитовидной железы с установленной эктопией, центральную клетчатку шеи и верхнего средостения, верхние рога вилочковой железы), – 0 % (ЧБНЛ = 4 в сравнении с СПТЭ). Частота рецидива заболевания при СПТЭ составила 12 %, при ТПТЭ – 5 % (ЧБНЛ = 14). Частота ПОгПТ при СПТЭ составила 31 %, при ТПТЭ – 50 % (ЧБНЛ = 5).

**3.** Разработанная модель послеоперационного гипопаратиреоза характеризуется сохранением тиреоидного статуса ( $p > 0,95$  при сравнении с показателями интактных животных), 100%-й воспроизводимостью, стойким снижением паратиреоидного гормона ( $p = 0,003$ ), тяжелой гипокальциемией ( $p = 0,003$ ), наличием воспалительной реакции и снижением неспецифической резистентности организма, 40%-й летальностью через 30 суток. После паратиреоидэктомии метаболические нарушения приводят к развитию изменений в легких (в виде бронхоспазма с формированием абсцедирующей пневмонии), почках (отек и деструкция эпителия клубочков) и миокарде (дистрофические изменения). Ключевым механизмом патогенеза исхода метаболических

нарушений установлено нарушение неспецифической резистентности со снижением активности и интенсивности фагоцитоза, выявляемого через 14 суток.

4. Усовершенствованная технология получения 3-суточной культуры аутологичных клеток ОЩЖ крысы позволяет получить функционально активный материал для трансплантации с жизнеспособностью 99,5 %, что превышает аналогичные показатели при использовании трипсинизации ( $p = 0,003$ ).

5. Эффективность ауотрансплантации культивированных клеток околотитовидной железы, подготовленных по разработанной технологии, превосходит ауотрансплантацию фрагментов ткани околотитовидной железы и является патогенетически обоснованным методом коррекции послеоперационного гипопаратиреоза. Коррекция послеоперационного экспериментального гипопаратиреоза с сохраненным тиреоидным статусом ауотрансплантацией культуры клеток околотитовидных желез сопровождается повышением выживаемости по сравнению с ауотрансплантацией фрагментов (0,9 и 0,6 соответственно,  $p = 0,03$ ). Ключевым механизмом саногенеза гипопаратиреоза установлена высокая частота приживления с сохранением неспецифической резистентности и показателей фагоцитоза (отсутствие снижения фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа, спонтанного НСТ-теста, индуцированного НСТ-теста по сравнению с интактными животными через 3 суток после трансплантации,  $p > 0,05$ ). Саногенные эффекты клеточной трансплантации реализуются посредством восстановления гормонального статуса, обмена кальция, сохранением неспецифической резистентности (на протяжении 30 суток), отсутствием изменений в паренхиме почек, легких, миокарде (к 30-м суткам).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При выполнении тотальной паратиреоидэктомии у больных вторичным гиперпаратиреозом, которые находятся на заместительной почечной терапии, целесообразно выполнение удаления центральной клетчатки шеи и верхнего средостения, верхних рогов вилочковой железы.

2. Тотальная паратиреоидэктомия при вторичном гиперпаратиреозе у больных, находящихся на заместительной почечной терапии, должна сопровождаться ауотрансплантацией околотитовидной железы.

3. Для моделирования послеоперационного гипопаратиреоза рекомендуется:

а) использовать крыс-самок линии Wistar в возрасте 10 месяцев;

б) с целью предотвращения формирования рубца с вовлечением щитовидной железы для органосохранения начинать доступ к ОЩЖ с углового разреза кожи с формированием косынообразного лоскута;

в) выполнять резекцию ткани щитовидной железы при экстирпации ОЩЖ с использованием микрохирургической техники в пределах 0,1 мм вглубь паренхимы щитовидной железы;

г) использовать медицинский клей «Сульфакрилат», нанесение которого эффективно для гемостаза раневой поверхности щитовидной железы.

4. При ПОгПТ у крыс для трансплантации необходимо использовать высоко жизнеспособную 3-суточную культуру клеток ОЩЖ, продуцирующую паратиреоидный гормон.

5. Проведение медикаментозной коррекции ПОгПТ при наличии функции почек несет риск осложнений, так как в эксперименте через 30 суток терапии препаратами кальция и витамина Д (в дозе 0,05 мг и 0,006 мкг на 100 г массы тела животного соответственно) выявляется кальциноз субкортикального слоя паренхимы почек.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Аюшеева, А. В. Послеоперационный гипопаратиреоз, способы профилактики и коррекции / А. В. Аюшеева, Е. А. Ильичева, С. А. Лепехова // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 1 (89). – С. 160–164.

2. Влияние различных способов удаления околощитовидных желез на показатели неспецифической резистентности / А. В. Аюшеева, Л. В. Зарицкая, С. А. Лепехова, Е. В. Батунова и др. // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2014. – Т. 129, № 6. – С. 78–81.

3. Клинико-морфологические параллели почечного гиперпаратиреоза / Е. А. Ильичева, А. В. Аюшеева, Е. В. Рожанская, С. А. Папешина и др. // Матер. 22-го (24-го) Российского симп. с междунар. участием «Эндокринная хирургия 2003–2014 гг.». – СПб., 2014. – С. 166.

4. Оценка влияния медицинского клея на основе цианокрилата на течение раневого процесса в зоне оперативного вмешательства после выполнения паратиреоидэктомии у мелких лабораторных животных / А. В. Аюшеева, С. А. Лепехова, Е. А. Ильичева, О. А. Гольдберг и др. // Матер. II Всерос. конгр. с участием стран СНГ «Инновационные технологии в эндокринологии». – М., 2014. – С. 457.

5. Результаты исследования топографической анатомии щитовидной и околощитовидной желез крысы / А. В. Аюшеева, О. А. Гольдберг, Е. А. Ильичева, С. А. Лепехова и др. // *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. – 2014. – № 1 (95). – С. 64–69.

6. Результаты моделирования послеоперационного гипопаратиреоза / А. В. Аюшеева, С. А. Лепехова, О. А. Гольдберг, Е. А. Ильичева и др. // Матер. 81-й Всерос. Байкальской науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины»: сборник статей. – Иркутск, 2014. – С. 7–14.

7. Хирургическое лечение персистирующего третичного гиперпаратиреоза, вызванного эктопированной в аорто-легочное окно паратиромой / Е. А. Ильичева, А. В. Аюшеева, В. Н. Махутов, А. В. Гринчук и др. // *Эндокринная хирургия*. – 2014. – № 3. – С. 27–34.

8. Хирургическое лечение рецидивного третичного гиперпаратиреоза, вызванного распространенным паратиреоматозом (обзор литературы и клиническое наблюдение) (статья) / Е. А. Ильичева, А. В. Аюшеева, В. А. Синицын, Е. В. Рожанская и др. // *Нефрология и диализ*. – 2015. – № 1. – С. 89–99.

9. Паратиреоидэктомия у крыс с использованием микрохирургической техники и медицинского клея сульфакрилат (статья) / А. В. Аюшеева, С. А. Лепехова, О. А. Гольдберг, Е. А. Ильичёва и др. // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2015. – № 3. – С. 320–327.

10. Способ моделирования пострезекционной гипокальциемии. Пат. 2573381 Рос. Федерация ; МПК G09B 23/28 (2006.01) / Лепехова С. А., Курганский И. С., Андаева Т. М., Ильичёва Е. А., Гольдберг О. А., Аюшеева А. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук. – № 2014114131/15 ; заявл. 09.04.2014 ; опубл. 20.01.2016, Бюл. № 2.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	– аутотрансплантация
АТТП	– аллотрансплантация трупной почки
ВГН	– возвратный гортанный нерв
ГПТ	– гиперпаратиреоз
ДГ	– диффузная гиперплазия
ДОГ	– диффузно-очаговая гиперплазия
ЗПТ	– заместительная почечная терапия
КК	– культура клеток
ОЩЖ	– околощитовидная железа
ПОгПТ	– послеоперационный гипопаратиреоз
ПТГ	– паратиреоидный гормон
ПТЭ	– паратиреоидэктомия
САР	– снижение абсолютного риска
СПТЭ	– субтотальная паратиреоидэктомия
Т3св.	– свободный трийодтиронин
Т4св.	– свободный тироксин
ТПТЭ	– тотальная паратиреоидэктомия
ТТГ	– тиреотропный гормон
ХБП	– хроническая болезнь почек
ЧБНЛ	– число больных с неблагоприятным исходом лечения