# ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616-07:061.62

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015

*І. А.Косаківська, Д. В.Ватліцов, В. В.Андріяш*

## ВПЛИВ ЕЛЕКТРОТЕРМОАДГЕЗІЇ НА ЖИВІ КЛІТИНИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**Національна медична академія післядипломної освіти**

**імені П.Л. Шупика**

**Вступ.** При удосконаленні традиційних хірургічних методик перспективним напрямком є використання високочастотної біполярної електротермоадгезії біологічних тканин.
**Мета.** Вивчити вплив різних режимів високочастотного струму на показники клітинної загибелі суспензії живих клітин при електротермоадгезії в експерименті.
**Матеріали та методи.** Проведенні дослідження з застосуванням електротермоадгезії (ЕТА) на лінійній перещеплюваній культурі Namalwa в 24 лункових планшетах концентрація $1*10^6$ клітин/мл. В якості високочастотного джерела струму використовували біполярний електрокоагулятор ЕК-300М1.
**Результати.** Проведені дослідження виявили залежність кількості клітин, що мають ознаки загибелі за різними типами від режиму ЕТА. Було показано, що найбільшого впливу суспензія клітин зазнала під дією високочастотного струму (66 кГц) в режимі «різання», а найменшого, в режимі «зварювання». Отримані результати вказують на те, що ЕТА впливає не тільки на молекули колагену чи еластину, а й на структурні елементи цитоплазматичної мембрани клітин. Цікавим є той факт, що проведені дослідження не виявили впливу ЕТА на внутрішньоклітинні структури.
**Ключевые слова:** апоптоз, експеримент, електротермоадгезія, біполярний електрокоагулятор, високочастотний струм, суспензія живих клітин.

**Вступ.** При удосконаленні традиційних хірургічних методик перспективним напрямком є використання високочастотної біполярної електротермоадгезії біологічних тканин [1]. Обладнання для зварювання живих тканин в загальному вигляді складається із двох частин, які разом складають єдиний електрозварювальний хірургічний комплекс. Це високочастотне джерело живлення (високочастотні генератори струму) та спеціалізований електрохірургічний інструментарій. Робоча частота струму джерела ЕК-300М1 становить 66 кГц і має 4 режими роботи: різання, коагуляція, перекриття (ручне зварювання) та зварювання (автоматичне зварювання). Даний апарат може працювати з будь-яким інструментами, створеними для зварювання живих тканин. Високочастотний струм подається на біполярний інструмент і підводиться до тканин оперованого пацієнта. Електрохірургічний ефект різання, коагуляції і зварювання базується на забезпеченні достатньо високого ступеня впливу на біологічну тканину вузького потоку високочастотного струму між кінцями біполярного зварювального електроінструменту. Струм і напруга в процесі зварювання задаються та контролюються системою автоматичного керування.

В основі високочастотного біполярного електрозварювання біологічних тканин лежить принцип використання термічної енергії для роз'єднання та

з'єднання тканин [2]. В результаті дії температурного фактора (в межах 40-70°С) відбувається випаровування позаклітинної та внутрішньоклітинної рідини, розрив клітинних мембран і утворення гомогенного субстрату, який складається з денатурованих білкових молекул еластину і колагену. При застиганні вони утворюють «білкові місточки», що утримують з'єднані поверхні тканин [5, 6]. Під впливом електричного струму відбувається дозована денатурація молекул білків. Вільні закінчення молекул білка в подальшому вступають в з'єднання одне з одним. Варіантами з'єднання є як реполяризація, так і запуск різноманітних реакцій. Реполяризація волокон колагену, утворення з'єднань між різними колагеновими волокнами, колагеновими та м'язовими волокнами, волокнами та мембранами клітин призводить до з'єднання двох ділянок тканини. Наявність повноцінних волокон колагену на лінії шва створює морфологічну основу міцності електрозварного з'єднання. Доведеним є той факт, що зміна полярності або електрохімічного потенціалу мембран клітин призводить до активації програмованої клітинної загибелі. Одним з тригерних механізмів запуску програми загибелі є деполяризація плазматичної мембрани клітин, що активує FAS рецептори клітин [3], також пермобілізація мембран призводить до запуску каспазонезалежних шляхів розвитку апоптозу [4].

**Мета.** Вивчення впливу різних режимів високочастотного струму на показники клітинної загибелі суспензії живих клітин при електротермоадгезії в експерименті.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводились на лінійній перещеплюваній суспензіонній культурі В-клітинної лімфоми Беркіта Namalwa (що люб'язно надана Клітинним банком ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України) в 24 лункових планшетах концентрація $1*10^6$ клітин/мл. Культуральне середовище RPMI-1640 з L-глутаміном (Sigma) та додаванням 10% FBS (Sigma) та антибіотиків у бактеріостатичній концентрації. Обробку суспензії клітин проводили в асептичних умовах з використанням апарату біполярного високочастотного (66 кГц) коагулятора ЕК-300М1 в режимах «зварювання»; «коагуляція»; «перекриття»; «різання» та гальванокаутера («каутер») з експозицією 1 с в культуральному середовищі з максимальним зануренням без торкання стінок планшету. Стан клітин після застосування різних режимів електротермоадгезії (ЕТА) оцінювали за показниками індексу апоптозу та змін мітохондріального мембранного потенціалу. Для визначення впливу різних режимів ЕТА вивчали рівень апоптозу за анексиновим методом та зміни мембранного потенціалу мітохондрій після 3 годин інкубації на поживному середовищі при 37°С.

Дослідження рівня апоптозу анексиновим методом з використанням набору для визначення апоптозу Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США) та змін мембранного потенціалу мітохондрій (ММП), за загальноприйнятою методикою з родаміном 123 («Fluka»), провадили на проточному цитометрі PAS (Partec, Німеччина). Результати отримані з використанням проточного цитометра диференціювали наступним чином: Annexin V+ (AnV+) – клітини на різних стадіях апоптозу; AnV+/PI- – клітини на ранній стадії апоптозу; AnV+/Propidium Iodide+ (PI+) – клітини на пізній стадії апоптозу; Rhodamine 123- (R123-)/PI- – клітини, що загинули

внаслідок апоптозу; R123-/PI+ – клітини, що загинули внаслідок некрозу; R123+/PI+ – клітини з порушенням проникності цитоплазматичної мембрани.

Статистичну обробку проводили з використанням програми Statistica, застосовували t-критерій Стьюдента та описову статистику. Довірчі інтервали середніх значень визначали шляхом підрахунку стандартної помилки. Відмінності вважали статистично значущими при pt<0,05.

**Результати та їх обговорення.** Проведені дослідження прямого впливу ЕТА на злоякіснотрансформовані клітини імунної системи (Namalwa) виявили статистично значимі відмінності впливу різних режимів ЕТА рівень Annexin V+ (апоптотичні) (рис. 1). Так, 1 с експозиція в режимі «зварювання» призвела до статистично значимого (p<0,05) збільшення кількості Annexin V+ клітин до 8,65±1,63% (тут і далі M±SD) відносно контрольного значення 6,81±0,60%, в режимі «коагуляція» до значення 10,24±0,67%, в режимі «перекриття» до 10,06±2,71%, в режимі «різка» до 10,27±2,27%, а використання каутера збільшило кількість Annexin V+ клітин до 11,66±2,55% після 3 годинної інкубації на поживному середовищі (рис.1).

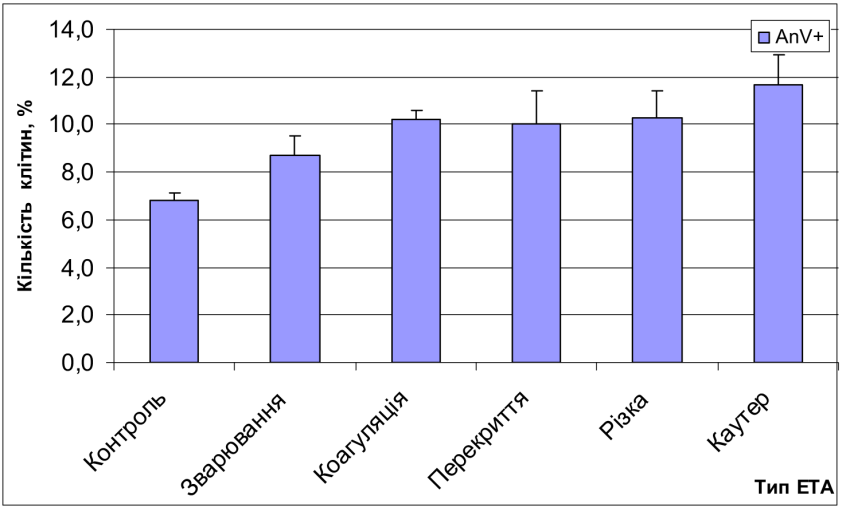


**Рис. 1. Зміна кількості Annexin V+ (апоптотичних) клітин в залезності від типу ЕТА після 1 с експозиції**

Наступним етапом експериментальних досліджень було вивчення впливу різних типів ЕТА на різні стадії та типи клітинної загибелі. Використання запропонованих методик, під час досліджень, дозволило диференціювати як тип загибелі, апоптоз чи некроз, так і стадію розвитку апоптозу. Диференціювали ранню стадію (Annexin V+/PI-) та пізню (Annexin V+/PI+) звідки віднімали значення кількості некротичних клітин (PI+/ Rhodamine 123-). Отже результати отримані під час проведених досліджень виявили, що найбільший вплив на мембранні структури клітин (Namalwa) мали маніпуляції ЕТА в режимі «коагуляція» та каутер 8,98±0,58% й 10,02±2,65%, відповідно проти 5,45±0,44% контрольного значення кількості

Annexin V+/PI- клітин. Щодо інших режимів, то ЕТА в режимах «зварювання» та «перекриття» призводили до майже ідентичних змін кількості Annexin V+/PI- клітин 7,24±1,74% й 7,34±2,38% відповідно. Найменша кількість Annexin V+/PI- клітин, менша за контрольне значення, було виявлено в зразках, що піддавались 1 с експозиції ЕТА в режимі «різка» (рис. 2). Дослідження впливу різних режимів ЕТА на кількість Annexin V+/PI+ (пізня стадія апоптозу) виявило, що використання ЕТА в режимах «зварювання» та «коагуляція», а також 1 с експозиція каутера майже не впливало на кількість Annexin V+/PI+ клітин Namalwa (1,44±0,20%; 1,26±0,17% та 1,63±0,24% відповідно) в значення в контрольних зразках 1,27±0,19%. Проте використання ЕТА в режимі «перекриття» призводило до статистично значимого ($p<0,05$) більш ніж у два рази збільшення Annexin V+/PI+ клітин (2,72±0,78%), а використання ЕТА в режимі «різка» більш ніж в чотири рази (5,33±0,81%) (рис. 2).

Важливим показником «стабільності» клітинної системи є активність мітохондрій клітин, зниження мітохондріального мембранного потенціалу відображає розвиток мітохондрійзалежного апоптозу, проте, виходячи з того, що апоптоз є енергозалежним процесом і залежить від активного синтеза АТФ, функціонування мітохондрій є вкрай важливим фактором розвитку клітинної загибелі. Отже визначення змін мітохондріального мембранного потенціалу при дослідженні клітинної загибелі є вкрай важливим, оскільки відображає не тільки кількість клітин, що загинули шляхом апоптозу (PI-/Rhodamine 123-), а й порушення цілісності цитоплазматичної мембрани (PI+/Rhodamine 123+) та кількість клітин, що загинули шляхом некрозу PI+/Rhodamine 123-). Було показано, що ЕТА та каутер, окрім режима «коагуляція» (4,03±0,28%), не впливають на мембранний потенціал мітохондрій, що відображалось у відсутності статистично значимих відмінностей від значень контрольних зразків (4,87±0,35%). Проте вивчення порушення проникності цитоплазматичной мембрани клітини після дії різних режимів ЕТА та каутера, виявило статистично значиме ($p<0,05$) збільшення кількості клітин з підвищеною проникністю цитоплазматичної мембрани в зразках після 1 с експозиції ЕТА в режимах «коагуляція» (2,99±2,34%), «перекриття» (3,68±0,59%), «різка» (5,40±0,72%) та каутер (2,65±0,78%) відносно контрольного значення 1,76±0,11%.

Щодо кількості клітин, що загинули внаслідок некрозу, виявлено деяке зниження кількості PI+/Rhodamine 123- (некроз) клітин в зразках після 1 с експозиції ЕТА в режимі «коагуляція» (0,11±0,01%) експозиція ЕТА в інших режимах призводила до статистично значимого ($p<0,05$) збільшення кількості PI+/Rhodamine 123- клітин до 0,24±0,05% в режимі «перекриття», 0,36±0,05% в режимі «різка» та 0,20±0,09% каутер (рис. 2).

Таким чином дослідження впливу різних режимів ЕТА та гальванокаутера на показники клітинної загибелі виявило, що навіть нетривала експозиція ЕТА та гальванокаутера призводить до значних змін в показниках клітинної загибелі клітин. Так спостерігалось зростання кількості Annexin V+/PI- клітин в зразках, що піддавались ЕТА в режимах «зварювання», «перекриття» та «коагуляція», а також після використання гальванокаутера, можна зробити висновок про мембранно - орієнтований вплив зазначених маніпуляцій. Зміни кількості Annexin V+/PI+ вказують на відсутність деструктивного впливу режимів ЕТА «зварювання», «коагуляція» та гальванокаутера на цитоплазматичну

мембрану клітин культури Namalwa, оскільки не спостерігалось збільшення кількості клітин з інкорпорованим PI, що є суправітальним барвником. Важливим є той факт, що впливу на мітохондрії клітин не спостерігалось, що відображалось у відсутності змін кількості клітин зі зниженим мітохондріальним мембранним потенціалом (PI-/R123-). Найбільш деструктивним виявився режим ЕТА «різка», що підтверджується статистично значимо ($p<0,05$) більшими значеннями кількості Annexin V+/PI+ (пізня стадія апотпозу) та PI+/R123- (некроз) клітин при зниженні концентрації Annexin V+/PI-.

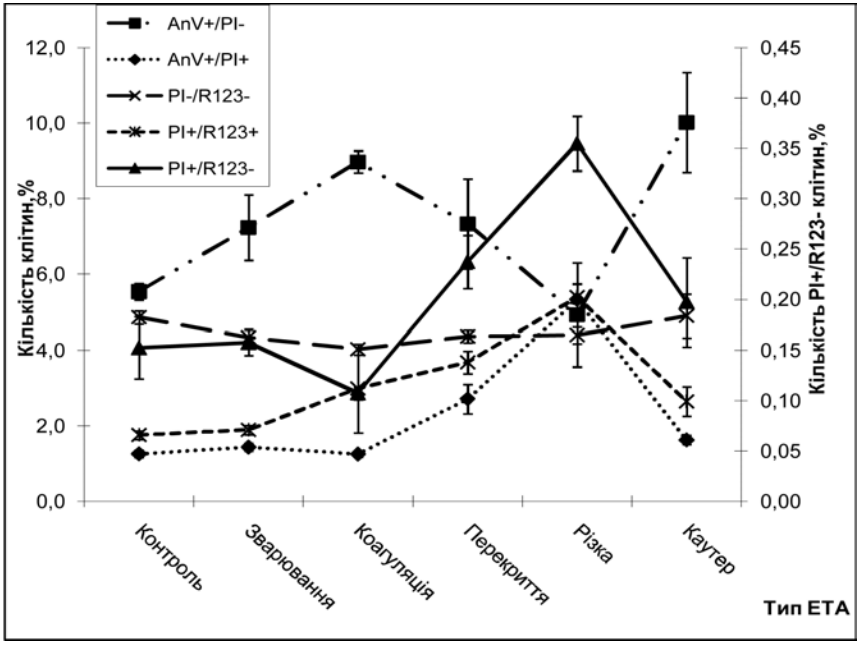


**Рис. 2. Вплив різних типів ЕТА на кількість клітин на різних стадіях та типах клітинної загибелі**

Проведені дослідження виявили залежність кількості клітин, що мають ознаки загибелі за різними типами від типу ЕТА. Було показано, що найбільшого впливу суспензія клітин зазнала під час використання ЕТА в режимі «різання», а найменшого, в режимі «зварювання». Отримані результати вказують на те, що ЕТА впливає не тільки на молекули колагену чи еластину, а й на структурні елементи цитоплазматичної мембрани клітин. Цікавим є той факт, що проведені дослідження не виявили впливу ЕТА на внутрішньоклітинні структури клітин.

**Висновки.** Кількість клітин, що мають ознаки загибелі за різними типами залежить від режиму електротермоадгезії. Найбільшого впливу суспензія клітин зазнає під час використання електротермоадгезії в режимі «різання», а найменшого, в режимі «зварювання». Під впливом високочастотного струму (66 кГц) з експозицією 1 с в культуральному середовищі спостерігаються

зміни цитоплазматичної мембрани клітин, а внутрішньоклітинні структури зберігаються неушкодженими.

**Література**

1. Тканесохраняющая высокочастотная электросварочная хирургия. Атлас / Под ред. Б.Е. Патона и О.И. Ивановой. - К.: НВП «Видавництво «Наукова думка» НАН України», 2009. – 200 с.

2. Патон Б.Е. Электрическая сварка мягких тканей в хирургии // Автомат. Сварка.- 2004. - № 9. - С. 7-11.

3. Bortner C.D., Gomez-Angelats M., Cidlowski J.A. Plasma Membrane Depolarization without Repolarization Is an Early Molecular Event in Anti-Fas-induced Apoptosis. // J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276. -P. 4304–4314. doi:10.1074/jbc.M005171200.

4. Düßmann H., Rehm M., Kögel D., Prehn J.H.M. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. // J. Cell Sci. - 2003.- Vol. 116. - P. 525–536. doi:10.1242/jcs.00236.

5. Novitsky Y. W., Rosen M. J., Harrell A. G. et al. Evaluation of the efficacy of the electrosurgical bipolar vessel sealer (LigaSure) devices in sealing lymphatic vessels // Surg Innov. - 2005.- N2. - P. 155-160.

6. Shen WT, Baumbusch MA, Kebebew E, Duh QY. Use of the electrothermal vessel sealing system versus standard vessel ligation in thyroidectomy. // Asian J. Surg. - 2005. - Vol. 28(2). - P.86-89.

***И. А.Косаковская, Д. В.Ватлицов, В. В.Андрияш***

## Влияние электротермоадгезии на живые клетки в эксперименте

**Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика**

**Введение.** При совершенствовании традиционных хирургических методик перспективным направлением является использование высокочастотной биполярной электротермоадгезии биологических тканей.

**Цель.** Изучить влияние различных режимов высокочастотного тока на показатели клеточной гибели суспензии живых клеток при электротермоадгезии в эксперименте.

**Материалы и методы.** Проведены исследования с применением електротермоадгезии (ЭТА) на линейной перевиваемой культуре Namalwa в 24 луночных планшетах концентрация $1*10^6$ клеток/мл. В качестве высокочастотного источника тока использовали биполярный электрокоагулятор ЕК-300М1.

**Результаты.** Проведены исследования с применением электротермоадгезии (ЭТА) на линейной перевиваемой культуре Namalwa в 24 луночных планшетах концентрация $1*10^6$ клеток/мл. В качестве высокочастотному источника тока использовался биполярный электрокоагулятор ЕК-300М1. Проведенные исследования выявили зависимость количества клеток, имеющих признаки гибели по различным типам от режима ЭТА. Было показано, что наибольшее влияние суспензия клеток претерпела под воздействием высокочастотного тока (66 кГц) в режиме «резки», а самого маленького, в режиме «сварки». Полученные результаты указывают на то, что ЭТА влияет не только на молекулы коллагена или эластина, но и на структурные элементы цитоплазматической мембраны клеток. Интересен тот факт, что проведенные исследования не выявили влияния ЭТА на внутриклеточные структуры.

**Ключевые слова:** апоптоз, эксперимент, электротермоадгезия, биполярный электрокоагулятор, высокочастотный ток, суспензия живых клеток.

*I. Kosakivska, D. Vatlitsov, V. Andryjash*

## Effect of electric thermal adhesion on living cells in experiment

**Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education**

**Introduction.** The use of high-frequency bipolar electric thermal adhesion of biological tissues is a promising direction in the improvement of traditional surgical methods.
**Aim.** To study the effect of different modes of high-frequency current on the rates of cell death of living cells suspension in electric thermal adhesion in experiment.
**Materials and methods.** There were conducted the studies with the use of electric thermal adhesion (ETA) at the line of inoculation of Namalwa culture in 24-well plates with concentration of $1*10^6$ cells/ml. As the high-frequency current source there was used bipolar electric coagulator EK-300M1.
**Results.** The study found out the dependence of the number of cells with different signs of death on the mode of ETA. The greatest effect on the cells suspension had the high-frequency current (66 kHz) in "cutting" mode and the minimum effect – in "welding" mode. The obtained results indicate that ETA affects not only the molecules of collagen or elastin, but also the structural elements of the cytoplasmic membranes of the cell. An important point is that the studies found no effect of ETA on intracellular structures.
**Key words:** apoptosis, experiment, electric thermal adhesion, bipolar electric coagulator, high-frequency current, cells suspension.

***Відомості про авторів:***
***Косаківська Ілона Анатоліївна*** – к.мед.н., доцент кафедри дитячої оториноларингології, аудіології та фоніатрії НМАПО імені П.Л.Шупика.
***Ватліцов Денис Володимирович*** – к.мед.н., ст.н.с. кафедри медичної інформатики НМАПО імені П.Л.Шупика.

**УДК: 616.718.4 – 001.5 – 07 – 089.84 – 06 – 89.22**
**© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015**

*І.А.Лазарев, Г.І.Герцен, Д.В.Штонда*

# ІМІТАЦІЙНЕ КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ НАПРУЖЕНО-ДЕФОРМОВАНОГО СТАНУ БІОМЕХАНІЧНОЇ СИСТЕМИ «ФІКСАТОР-КІСТКА» В УМОВАХ ОСТЕОСИНТЕЗУ ПЕРИПРОТЕЗНОГО ПЕРЕЛОМУ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ РІЗНИМИ ТИПАМИ ФІКСАЦІЇ

**Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика**

**Вступ.** Після первинного ендопротезування кульшового суглоба (ЕКС) загальна кількість ускладнень сягає 17,4%, з яких перипротезні переломи стегнової кістки (ППСК) досягають 4%.
**Мета.** Вивчити напружено-деформований стан біомеханічної системи «фіксатор-кістка» та проаналізувати стабільність фіксації ППСК після ЕКС типу В1 різними