

Профилактика раневой инфекции и морфологические аспекты заживления асептической раны

А.Б.ЛАРИЧЕВ, В.К.ШИШЛО, А.В.ЛИСОВСКИЙ, А.Л.ЧИСТЯКОВ, А.А.ВАСИЛЬЕВ

Wound infection prevention and morphological aspects of aseptic wound healing

A.B.LARICHEV, V.K.SHISHLO, A.V.LISOWSKI, A.L.CHISTYAKOV, A.A.VASILIEV

Ярославская государственная медицинская академия

Российская медицинская академия последипломного образования

Выполненными в эксперименте морфологическими исследованиями установлено, что после NO-обработки раны иммуногистохимически наблюдается значительное увеличение монослоя эндотелия, выстилающего раневую поверхность. В свою очередь криофрактографическая идентификация кавеол на сколах эндотелиоцитов свидетельствует о повышении плотности плазмалеммальных пузырьков эндотелия капилляров дермы и мышечной ткани раневой зоны. Активизация указанных реакций способствует интенсификации неангиогенеза, которую убедительно подтверждает верифицируемое при сканирующей электронной микроскопии значительное возрастание протяженности микрососудистого русла в 1 мм³ формирующихся грануляций. Наряду с этим результаты иммуногистохимического исследования указывают на значительное усиление пролиферативной активности базальных клеток эпидермиса вульнарной зоны. Совокупность перечисленных изменений ярко отражает патогенетическую позитивность влияния экзогенного монооксида азота на течение раневого процесса, главным образом, на репаративную её составляющую.

Ключевые слова: раневая инфекция, заживление, лечение, профилактика

By means of morphological researches executed within an experimental framework it is identified that a considerable increase in endothelial monolayer covering the wound surface is immunohistochemically observed after NO-management of the wound. In turn, cryofractographic identification of small pits on splits of endotheliocytes indicates an increase in density of plasmalemmal vesicles in capillary endothelium of dermal and muscle tissue of the wound surface. Activation of the specified reactions promotes an intensification of neoangiogenesis as convincingly confirmed by a considerable increase in length of microvasculature in 1 mm³ of forming granulations, verified at scanning electronic microscopy. At the same time, the immunohistochemical research results indicate a considerable increase in proliferative activity of stab cells of epidermis of vulnar surfaces. The set of the listed changes reflects brightly pathogenetic positivity of the influence of exogenous nitrogen monoxide on the course of wound process, mainly, on its reparative component.

Key words: wound infection, healing, treatment, prevention

В настоящее время продолжается поиск новых средств, предупреждающих развитие послеоперационных раневых осложнений [4, 5,11]. Среди них выгодно отличается своей эффективностью экзогенный монооксид азота. Его клиническая апробация подтвердила предположение о позитивных сдвигах в развитии раневого процесса при заживлении ран различного происхождения [6, 7, 12-16, 18, 24]. В основе этого лежит патогенетичность NO-терапии, для понимания которой исключительное значение отводится морфологическим исследованиям. Они существенно расширяют спектр представлений о раневом процессе и позволяют определить оптимальное место экзогенного монооксида азота в комплексном лечении послеоперационной раны [10].

Материалы и методы

Исследование выполнено на 24 белых крысах породы Вистар в возрасте от 10 до 12 месяцев с исходным весом животного в 200-250 г. Эксперимент проведён в соответствии с правилами лабораторной практики

(Приказ МЗ РФ N267 от 19.06.2003 г.). При этом оценивалась сравнительная морфологическая характеристика репаративной регенерации при заживлении раны после традиционной подготовки операционного поля и после обработки зоны предстоящего оперативного вмешательства NO-содержащим газовым потоком 300 ppm (экспозиция – 10-15 сек на 1 см²), создаваемым с помощью аппарата «Плазон».

Гистологическому исследованию подвергали биологический материал в виде кусочка ткани, взятого из раны в начале операции и по её окончании. Более детальную оценку морфологической картины осуществляли криофрактографически путем быстрого замораживания образца, его скальвания с последующей репликацией и изготовлением «слепок» с поверхности скола. Для детальной электронно-микроскопической визуализации препарата использовали методику оттенения тяжелым металлом, напыляемым на реплицируемую поверхность в условиях глубокого вакуума [12]. Пролиферативную активность базальных клеток эпидермиса оценивали иммуногистохимически с по-

мощью иммуноклональных антител типа PCNA, позволяющих идентифицировать потенцированный к митозу клеток ядерный антиген [17]. Выявление связанных антител проводили иммуноферментным методом с использованием стрептавидинбиотиновых конъюгатов и пероксидазы хрена. Полученные препараты изучали светооптически с помощью микроскопа «Биолам-И» (Россия).

Результаты и их обсуждение

Изучая морфологические аспекты раневого процесса, следует исходить из того, что ведущую роль в развитии неоангиогенеза как базисного механизма заживления раны играют эндотелиоциты, которые в норме имеют низкую степень пролиферации, что является результатом контактного торможения популяции клеток [9]. В условиях репаративной регенерации их митотическая активность резко возрастает, и данные изменения служат четким индикатором адекватного новообразования капиллярной сети [2].

Анализ полученных нами иммуногистохимических данных показал, что у животных, которым осуществляли традиционную профилактику раневой инфекции, к 3-5 суткам от начала опыта количество эндотелиоцитов в ране увеличивалось до $7,81 \pm 1,4$ клеток, окрашенных моноклональными антителами к ядерному антигенпотенцированному митозу. В дальнейшем их число стремительно возрастало и к 7 суткам достигало $19,71 \pm 2,17$ клеток ($p < 0,05$). Это свидетельствует об активном процессе образования эндотелиальных клеток, которые в перспективе формируют сеть кровеносных капилляров – грануляций. Тем самым можно констатировать, что к концу недельного срока заживления раны ангиогенез становится не только желаемым, но и заметным явлением (рис. 1).

После обработки раны экзогенным монооксидом азота уже на 1 сутки эксперимента отмечалась активная пролиферация эндотелиоцитов, количество которых достигало $10,97 \pm 1,53$ окрашенных клеток ($p < 0,05$). На протяжении следующих 3-5 суток число способ-

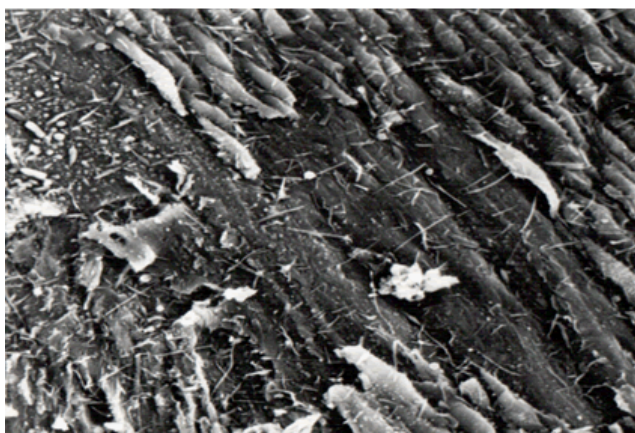


Рис. 1. Электронномикроскопическая картина раны на 3-5 сутки традиционного её лечения («наполнение» эндотелиоцитов на раневую поверхность) СЭМНП $\times 420$.

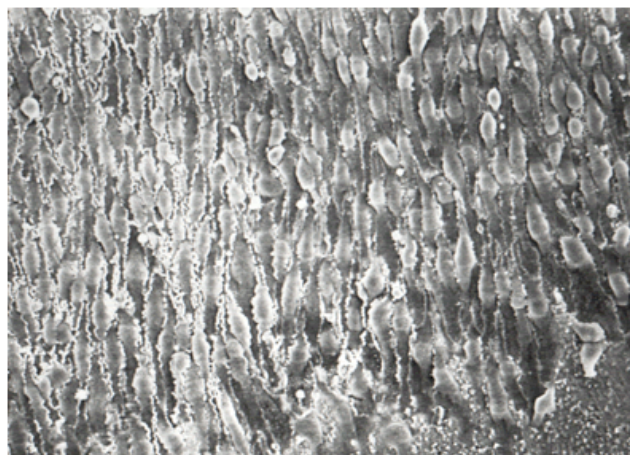


Рис. 2. Электронномикроскопическая картина раны на 3-5 сутки лечения при использовании монооксида азота (выраженная пролиферативная активность эндотелиоцитов, практически полностью закрывающих раневую поверхность) СЭМНП $\times 420$.

ных к митозу клеточных образований возрастало в 3 раза и составляло $31,63 \pm 2,78$ окрашенных клеток, что в 1,6 раза выше аналогичного показателя, который имеет место у животных предыдущей группы. К 7 суткам наблюдалась стабилизация процесса накопления клеточной массы, которая устанавливалась на уровне $29,91 \pm 2,14$ окрашенных клеток. При этом особое впечатление производит электронномикроскопическая картина раневой поверхности, почти полностью закрывающейся в эти сроки слоем эндотелиальных клеток (рис. 2).

Совокупный анализ представленной информации позволяет констатировать факт того, что обработка раны экзогенным монооксидом азота способствует значительному увеличению монослоя эндотелия за счет пролиферации клеток. Подобная клеточная реакция сопряжена с установленной на сегодняшний день способностью NO-молекул обеспечивать передачу сигналов в биологических системах [3]. В связи с этим можно предположить, что экзогенный монооксид азота, поступающий в ткани операционной зоны при её обработке с помощью аппарата «Плазон», потенцирует действие эндогенного монооксида азота, вырабатываемого в эндотелиальных клетках.

Среди признаков, которые объективно характеризуют морфо-функциональное состояние эндотелия капилляров, особое место отводится оценке развития так называемых кавеол. Их функции весьма разнообразны, в том числе наиболее изученным является участие в процессах эндоцитоза [21, 22]. В соответствии с теорией сигнасомы за счет непосредственного связывания сигнальных молекул с основным структурным белком кавеолином-1 кавеолы, могут регулировать не только отдельные сигнальные каскады, но и способствовать их взаимодействию [1, 20]. Полагают, что удельная плотность кавеол в различных органах и тканях неодинакова [23]. В связи с этим, исключительное значение приобретает криофрактографическая

идентификация данных образований, которая позволяет дать количественную оценку их распределения в клетках эндотелия.

По нашим данным, при традиционной профилактике раневой инфекции спустя 1 сутки от начала опыта плотность кавеол на сколах эндотелиоцитов составляла 3,1%. В течение следующих двух суток она сокращалась в 2 раза и оставалась на этом низком уровне в течение дальнейшего периода наблюдения. Такая динамика исследуемого показателя может быть объяснена двумя версиями происходящих в тканях событий: это означает либо полное купирование воспалительного процесса (что в нашем случае не подтверждается клинически), либо свидетельствует об определённой степени истощения указанных адаптационных механизмов детоксикации и дегидратации тканей раневой зоны.

На фоне превентивной обработки раны экзогенным монооксидом азота уже на 1 сутки исследования плотность кавеол эндотелия кровеносных микрососудов собственно кожи и мышечной ткани составила 4,1%. В последующем этот показатель возрастал и к 5 суткам эксперимента достигал «потолка» – 6,7%. К исходу недельного срока наблюдалась стабилизация удельной плотности плазмалеммальных пузырьков на сколах клеток практически на том же уровне – 6,1%.

Анализируя изложенное, можно отметить о том, что посредством криофрактографической идентификации кавеол на сколах эндотелиальных клеток подтверждается активное положительное влияние экзогенного монооксида азота на развитие реакций дегидратации в раны в виде существенного повышения плотности плазмалеммальных пузырьков эндотелия капилляров собственно кожи и мышечной ткани паравульнарной зоны. При этом экзогенный монооксид азота выполняет функцию мощного стимулятора образования новых трансэндотелиальных каналов (эквивалента больших пор) за счёт интенсификации микровезикулообразования. Данное обстоятельство позволяет быстрее купировать воспалительную реакцию в тканях раны. Вкупе с активной пролиферацией эндотелиоцитов этот процесс позитивно влияет на скорость неполной репаративной клеточной регенерации, что находит соответствующее морфологическое подтверждение (образование капилляров грануляционной ткани). Отсюда вполне логична увязка полученных данных об увеличении плотности кавеол эндотелия кровеносных микрососудов (адекватная выраженность дегидратационного эффекта) со стабилизацией процесса трансэндотелиального массапереноса, что, в свою очередь, обеспечивает ускорение процессов регенерации хирургической раны в условиях превентивного воздействия на ткани экзогенным монооксидом азота.

В развитии представленной информации полезно заметить, что заживление раны связано с формированием грануляционной ткани и образованием в ней ка-

пилляров, степень развития которых, как известно, в разные фазы раневого процесса неодинакова. В связи с этим, посредством количественного подсчета длины капилляров на единицу объема грануляционной ткани нами предпринята попытка оценить скорость и интенсивность развития сосудистого русла в зависимости от условий микроокружения.

По нашим данным, при любом превентивном воздействии на рану в течение 3 суток эксперимента, что соответствует фазе воспаления, встречаются отдельные капилляры только в области жировой клетчатки дна раны. Они расширены, базальная мембрана разрыхлена. Окружающие микрососуды ткани содержат форменные элементы крови, в них наблюдается смешанное полнокровие. В дальнейшем отмечается прогрессивное нарастание суммарной длины капилляров. Посредством сканирующей электронной микроскопии нативных препаратов выявлено, что с 3-5 суток (начало фазы регенерации) после традиционной обработки раны отмечается умеренное развитие капилляров. Они образуют выросты и эндотелиальные тяжи, сосудистые петли располагаются перпендикулярно поверхности раны (рис. 3). Примечательно, что в эти сроки течения раневого процесса длина капиллярной сети неуклонно возрастала и составляла $105,56 \pm 5,7$ мм.

В отличие от этого у животных, которым проводили локальную обработку раны монооксидом азота, уже на 3-5 сутки была заметна хорошо развитая грануляционная ткань. В ране наблюдалось выраженное митотическое деление эндотелиальных клеток с интенсивным образованием выростов, напоминающих развитие почек, что сопровождалось ростом капилляров (рис. 4). На этом фоне протяженность сосудистого русла в 1 мм формирующейся грануляционной ткани в обозначенные сроки достигала $221,41 \pm 12,7$ мм и была статистически достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с длиной капилляров у животных в серии опыта с традиционным превентивным воздействием на рану.

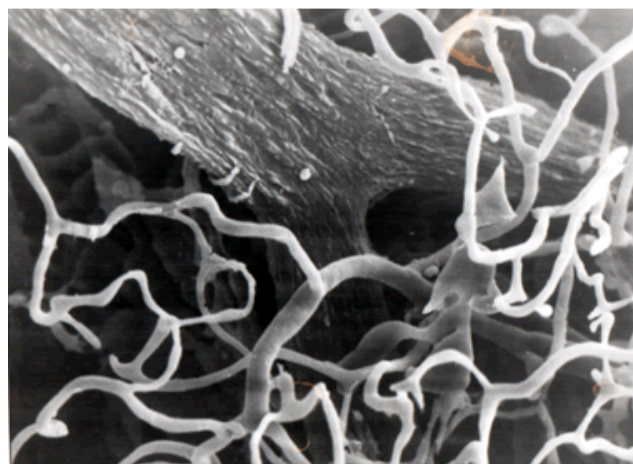


Рис. 3. Электронномикроскопическая картина раны на 3-5 сутки традиционного её лечения (разрастание сосудистых петель на поверхности раны) СЭМНП х240

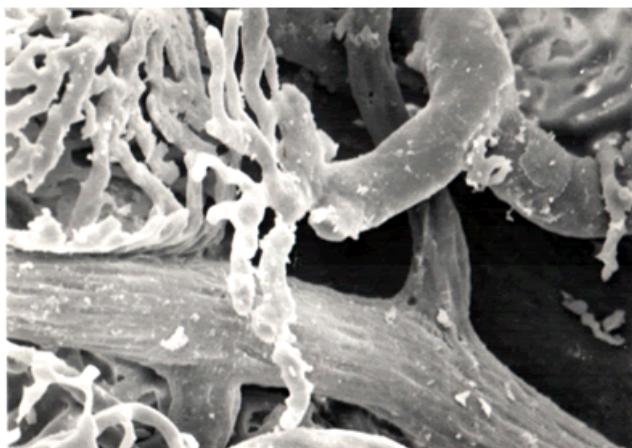


Рис. 4. Электронномикроскопическая картина раны на 3-5 сутки лечения при использовании монооксида азота (разрастание эндотелиальных тяжей в виде почек и образование сосудистых петель на поверхности раны) СЭМНП x240.

К 7 суткам эксперимента на фоне смешанного полнокровия наблюдалось выраженное митотическое деление эндотелиальных клеток в растущих капиллярах. В эти сроки (соответственно времени завершения фазы регенерации) у животных, которым проводили традиционную профилактику раневой инфекции, на полутонких срезах видно застаивание плазмы крови в верхних петлях капилляров. Непосредственно под полинуклеарным валом эритроциты образуют монетные столбики. В другой серии эксперимента с привлечением экзогенного монооксида азота с целью профилактики раневой инфекции имело место интенсивное разрастание грануляционной ткани, которая на микроскопическом уровне представляла собой обширную сеть капилляров. Их суммарная протяжённость в единице объёма грануляций двукратно увеличивалась и достигала $467,22 \pm 14,3$ мм против $288,74 \pm 13,8$ мм при традиционном лечении раны ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что под действием экзогенного монооксида азота активируются процессы ангиогенеза в ране. Это подтверждается стремительным увеличением суммарной длины микроциркуляторного русла, которая значительно превышает величину аналогичного показателя у животных с традиционной обработкой раны. Выявленная морфологическая информация коррелирует с клинической картиной течения раневого процесса и подтверждает отличительные особенности его развития в зависимости от практикуемого способа предупреждения местных инфекционно-воспалительных осложнений.

Как известно, одним из базисных проявлений третьей фазы заживления раны является эпителизация, которая обеспечивает максимально приближенное к физиологическому восстановление кожного покрова в зоне его предшествующего повреждения [8]. Основу данного процесса определяет активность базальных клеток эпидермиса, пролиферация которых



Рис. 5. Электронномикроскопическая картина раны на 3-5 сутки лечения при использовании монооксида азота (пролиферация базальных клеток эпидермиса на фоне формирования капиллярной сети, заполняющей поверхность послеоперационной раны) СЭМНП x240.

обуславливает создание многослойного тканевого покрова. В свою очередь, реализация его полигамного предназначения обеспечивает «реанимацию» многочисленных функций кожи. Статус многослойности эпидермы поддерживается за счет феномена межклеточного контакта. В условиях нормального функционирования эпителия плотные контакты клеточных пластов замедляют регенеративные процессы из-за контактного торможения клеток [19].

При повреждении слоёв эпидермиса возникает потребность в репаративной регенерации, которая обеспечивается стартовыми клетками в зоне роста, а именно, в базальных клетках эпидермиса. Их оценка является весьма кстати при изучении особенностей течения раневого процесса в различных условиях «среды обитания».

Как свидетельствуют наши данные, у животных, которым проводили лечение раны традиционным методом, к 3-м суткам эксперимента двукратно увеличивалась пролиферативная активность базальных клеток эпидермиса кожи и достигала $13,8 \pm 1,38$ окрашенных клеток. В дальнейшем отмечалось такое же стремительное снижение этого показателя вплоть до полного исчезновения маркированных клеток в поле зрения микроскопии. В условиях NO-терапии наблюдалось иное поведение изучаемого критерия. Пролиферативная активность базальных клеток эпидермиса кожи уже в первые сутки эксперимента превышала цифры, регистрируемые у животных предыдущей группы. Величина этого показателя достигала максимума также к 5 суткам послеоперационного периода и сохранялась на высоком уровне митотической активности до конца экспериментального исследования ($p < 0,05$; рис. 5). Интерпретация изложенного позволяет сделать заключение о том, что обработка паравульнарной зоны

экзогенным монооксидом азота способствует ускорению репаративных процессов в хирургической ране.

Заключение

Выполненное нами исследование свидетельствует о том, что вне зависимости от используемых средств профилактики локальных инфекционно-воспалительных осложнений течение раневого процесса в смоделированной хирургической ране укладывается в рамки биологически запрограммированных реакций, которые предполагают развитие последовательно сменяющих друг друга фаз воспаления, регенерации и реорганизации рубца с эпителизацией. Однако благодаря использованным современным морфологическим методам можно констатировать факт того, что в условиях воздействия на ткани паравульнарной зоны экзогенным монооксидом азота имеют место особенности заживления раны.

Иммуногистохимически доказано, что после NO-обработки раны наблюдается значительное увеличение монослоя эндотелия, которое становится возможным вследствие стимуляции пролиферативной реакции в тканях при потенцирующем эффекте экзогенного монооксида азота и аналогичного биостимулятора, имеющего естественное эндогенное происхождение. В свою очередь, криофрактографическая идентификация кавеол на сколах эндотелиоцитов подтверждает повышение плотности плазмалеммальных пузырьков эндотелия капилляров дермы и мышечной ткани раневой зоны. Это можно связать с расширением сети трансэндотелиальных каналов, которые стабилизируют процесс масспереноса через стенку вновь образованных кровеносных микрососудов.

В конечном счете, указанные механизмы лежат в основе неоангиогенеза и их активизация способствует развитию регенераторных реакций в ране. Об этом красноречиво свидетельствуют результаты сканирующей электронной микроскопии, посредством которой

обнаруживается убедительное подтверждение того, что под влиянием NO-обработки интенсифицируется митотическое деление эндотелиальных клеток и последующее развитие капиллярной сети. При этом значительно возрастает протяженность микрососудистого русла в 1 мм³ формирующихся грануляций.

Позитивные потенции второй фазы раневого процесса, которые формируются под воздействием экзогенного монооксида азота, оказывают благотворительное влияние на развитие других тканевых реакций, традиционно относящихся к следующей фазе заживления раны. Об этом свидетельствуют результаты иммуногистохимического исследования, которые подтверждают значительное усиление пролиферативной активности базальных клеток эпидермиса кожи паравульнарной зоны. Патостимулирующей основой этого процесса, скорее всего, может быть массивная «антигенная атака» из очага воспаления.

Совокупность перечисленных изменений имеет объективную морфологическую идентификацию тех закономерно развивающихся реакций, которые наиболее ярко обнаруживают себя в условиях NO-обработки тканей, что в очередной раз свидетельствует о благоприятном влиянии экзогенного монооксида азота на течение раневого процесса. Вероятнее всего именно их «правильность» и лежит в основе того самого превентивного, по отношению к раневой инфекции, эффекта используемой с этой целью NO-обработки раны посредством аппарата «Плазон». В результате NO-терапия оказывается по настоящему действенным средством, позволяющим регулировать сложные взаимоотношения между хирургом и раневой инфекцией – теми самыми Атосом и коварной Миледи, мстящей всем и вся за клеймо «государственного преступника». При этом экзогенный монооксид азота становится одухотворением любви и ласки, за которые женское начало готово многое простить и уступить пальму первенства.

Список литературы

1. Архипова К.А., Рыбко В.А., Землякова В.В. и др. Экспрессия кавеолина в опухолях мягких тканей. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН 2009; 20: 1: 4-9.
2. Банин В.В. Механизмы обмена внутренней среды. М.: Изд-во РГМУ. 2000; 278.
3. Выренков Ю.Е., Москаленко В.И., Шишло В.К. Экспериментальное обоснование возможности применения комплексного лечения огнестрельных ран с использованием монооксида азота и лимфогенной терапии. Хирург 2009; 9: 5-12.
4. Гостищев В.К. Инфекции в хирургии: Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа 2007; 761.
5. Давыдов Ю.А., Ларичев А.Б. Вакуум-терапия ран и раневой процесс. М.: Медицина 1999; 160.
6. Ефименко Н.А., Хруткин В.И., Марахонич Л.А. и др. Воздушно-плазменные потоки и NO-терапия – новая технология в клинической практике военных лечебно-профилактических учреждений. Военно-медицинский журнал 2005; 5: 51-54.
7. Кабисов Р.К., Соколов В.В., Шехтер А.Б. и др. Первый опыт применения экзогенной NO-терапии для лечения послеоперационных ран и лучевых реакций у онкологических больных. Российский онкологический журнал 2000; 1: 24-29.
8. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина 1990; 592.
9. Куприянов В.В., Бородин Ю.И., Караганов Я.Л. и др. Микролимфология. М.: Медицина 1983; 288.
10. Ларичев А.Б., Лисовский А.В., Шишло В.К. NO-терапия и лимфотропная антибиотикопрофилактика в предупреждении раневой инфекции. Ярославль 2010; 35.
11. Larichev A.B. Vacuum therapy in wounds and wound infection: negative pressure wound therapy. Carlsbad, CA, USA: BlueSky Pub. 2005; 248.
12. Липатов К.В., Сопроматзе М.А., Емельянов А.Ю. и др. Использование физических методов в лечении гнойных ран. Хирургия 2001; 10: 56-61.

13. *Марахонич Л.А., Ефименко Н.А., Хрупкин В.И.* Воздушно-плазменные потоки и NO-терапия – новая технология в клинической практике военных лечебно-профилактических учреждений. Военно-медицинский журнал. 2005; 326: 5: 51-54.
14. *Москаленко В.И.* Комплексное лечение огнестрельных ранений с использованием оксида азота и лимфогенных методов. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва. 2006; 32.
15. *Решетов И.В., Кабисов Р.К., Шехтер А.Б. и др.* Применение воздушно-плазменного аппарата «Плазон» в режиме коагуляции и NO-терапии при реконструктивно-пластических операциях у онкологических больных. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. 2000; 4: 24-39.
16. *Чмуневич А.А.* Лечение огнестрельных ран мягких тканей с использованием микрокапсулированной формы серотонин адипината и NO-терапии (экспериментальное исследование). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва. 2009; 106.
17. *Чумасов Е.И., Рязкин Г.А., Каишков Г.А.* Электронно-микроскопическое изучение раневого процесса огнестрельной раны в эксперименте. Огнестрельная рана человека: Тез. докл. Л. 1981; 48-49.
18. *Шальнев А.Н.* Лечение огнестрельных и гнойно-осложненных ран с помощью антиоксидантов и углеродных тканевых сорбентов. Дис. ... докт. мед. наук. М. 1996; 239.
19. *Шехтер А.Б., Грачев С.В., Милованова З.П. и др.* Применение экзогенного монооксида азота в медицине: медико-биологические основы, клинко-морфологические аспекты, механизмы, проблемы и перспективы. NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. М. 2001; 3-16.
20. *Lisanti M.P., Scherer P.E., Tang Z., Sargiacomo M.* Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. Trends Cell. Biol. 1994; 4: 7: 231-235.
21. *Quest A.F., Leyton L., Parraga M.* Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. Biochem. Cell. Biol. 2004; 82: 1: 129-144.
22. *Razani B., Woodman S.E., Lisanti M.P.* Caveolae: from cell biology to animal physiology. Pharmacol. Rev. 2002; 54: 3: 431-467.
23. *Simionescu N., Simionescu M.* Endothelial Cell Disfunctions. New York: Plenum Press. 1992; 570.
24. *Shekhter A.B., Serezhenkov V.A., Rudenko T.G. et al.* Beneficial effect of desecous nitric oxide on the healing of skin wounds. Nitric oxide: biology and chemistry. 2005; 12: 210-219.

Поступила 15.05.2011 г.

Информация об авторах

1. Ларичев Андрей Борисович – д.м.н., проф., зав. кафедрой общей хирургии Ярославской государственной медицинской академии; e-mail: larich-ab@mail.ru
2. Шишло Владимир Константинович – к.м.н., доцент, ст. науч. сотр. научного отдела оперативной хирургии и клинической лимфологии Российской медицинской академии последипломного образования; e-mail: larich-ab@mail.ru
3. Лисовский Александр Валерьевич – аспирант кафедры общей хирургии Ярославской государственной медицинской академии; e-mail: larich-ab@mail.ru
4. Чистяков Андрей Леонидович – кандидат медицинских наук, врач-хирург Ярославского областного клинического онкологического диспансера; e-mail: larich-ab@mail.ru
5. Васильев Андрей Андреевич – аспирант кафедры общей хирургии Ярославской государственной медицинской академии; e-mail: larich-ab@mail.ru