

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИНЦИПА ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ ПРИ СВОБОДНОЙ КОЖНОЙ ПЛАСТИКЕ

Орлинская Н.Ю.¹, Давыденко Д.В.¹, Багрянцев М.В.², Рябков М.Г.², Бесчастнов В.В.²

¹ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения России, Нижний Новгород, e-mail: nniito@list.ru

²ГБУЗ НО «ГКБ № 30 Московского района», Нижний Новгород, e-mail: post@hospital30.ru

Перед авторским коллективом стояла цель изучить влияние локальной циркуляторной гипоксии на активность процессов репаративной регенерации и ангиогенез. Авторы предположили, что при формировании раны кожи путем нанесения двух параллельных разрезов до фасции создаются условия локальной циркуляторной гипоксии (критерием моделирования гипоксии послужили данные лазерной доплеровской флоуметрии), в результате чего в дерме выделяется фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), а также повышается уровень Ki-67 ядерного белка. Чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу, был проведен эксперимент на 9 экспериментальных животных (крысах). В эксперименте моделировалась рана кожи путем нанесения двух параллельных разрезов кожи до мышц с тем условием, что длина разрезов вдвое больше расстояния между ними. Под контролем лазерного анализатора капиллярного кровотока (аппарата ЛАКК-02) проводили мобилизацию кожного лоскута, добиваясь снижения показателя микроциркуляции на 50% от исходного. Выполняли иммуногистохимическое исследование образцов кожи, находящейся между разрезами, через 2 суток после оперативного вмешательства, контролем служили образцы симметричного участка с противоположного бедра без оперативного вмешательства. Установлено, что при гипоксической тренировке в кожном лоскуте статистически значимо повышается уровень Ki-67 с 25% [19; 31] до 37% [30; 44] ($p=0,018$), также отмечается появление клеток, экспрессирующих рецепторы к васкулярному эндотелиальному фактору роста (VEGF). Полученные результаты свидетельствуют об ускорении процессов репаративной регенерации и стимуляции ангиогенеза в условиях локальной циркуляторной гипоксии.

Ключевые слова: тренировка лоскута, тканевая гипоксия, Ki-67, VEGF, репаративная регенерация, ангиогенез.

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF APPLYING THE PRINCIPLE OF HYPOXIC PRECONDITIONING WITH A FREE SKIN PLASTICS

Orlinskaya N.Yu.¹, Davidenko D.V.¹, Bagryantsev M.V.², Ryabkov M.G.², Beschastnov V.V.²

¹Privolzhsky Federal research medical centre" of the Ministry of health of Russia, Nizhny Novgorod, e-mail: nniito@list.ru;

²City clinical hospital № 30 Moscow district, Nizhny Novgorod, e-mail: post@hospital30.ru

Before the authors aim was to study the effect of local circulatory hypoxia on the activity of the processes of reparative regeneration and angiogenesis. The authors suggested that forming the wound of the skin by drawing two parallel sections to the fascia is to create the conditions for local circulatory hypoxia (the criterion hypoxia, based on data from laser Doppler flowmetry), resulting in the dermis secretes the vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as increased levels of Ki-67 nuclear protein. An experiment was conducted on 9 experimental animals (rats). In the experiment, a simulated skin wound by applying two parallel incisions to muscles with the proviso that the length of the incision is twice the distance between them. Under the control of the laser analyzer capillary blood flow (LAKK-02) mobilize skin graft, achieving a decrease in the index of microcirculation by 50% from baseline. Performed immunohistochemical examination of samples of skin between the incision 2 days after surgery, were used as control samples symmetrical plot on the opposite thigh without surgery. Set, that when hypoxic training in skin flap significantly increases the level of Ki-67 with 25% [19; 31] to 37% [30; 44] ($p=0.018$) also noted the appearance of cells expressing receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF). The results suggest about the acceleration of processes of reparative regeneration and stimulation of angiogenesis in terms of local circulatory hypoxia.

Keywords: training flap, tissue hypoxia, Ki-67, VEGF, reparative regeneration, angiogenesis.

Актуальность

Лечение длительно незаживающих ран покровных тканей является одной из актуальных проблем медицины. Широко распространенным методом лечения дефектов мягких тканей является свободная кожная пластика. Однако, по данным литературы, известно, что в условиях циркуляторной гипоксии площадь полного или частичного лизиса трансплантатов при свободной кожной пластике составляет от 19,5 до 37,5% [1]. В настоящее время предложено большое количество методов подготовки аутодермотрансплантата к условиям скомпрометированной микроциркуляции, например введение в донорскую область озонированного физиологического раствора [2], кислорода [3], оксигенированного перфторана [4]. Однако предложенные способы не всегда безопасны и могут сопровождаться нагноением, возникновением инфильтрата и т.д.

С нашей точки зрения, в условиях скомпрометированной микроциркуляции целесообразна тренировка будущего трансплантата кожи к кислородному голоданию. Это возможно при создании условий, при которых на фоне снижения трофики тканей включается каскад компенсаторных механизмов, направленных на защиту тканей от гипоксии.

В публикациях мы не обнаружили данных о зависимости между тренировкой трансплантата кожи и индексом пролиферации (Ki-67), а также выделением фактора роста эндотелия сосуда (VEGF). Представленное экспериментальное исследование посвящено поиску ответа на этот вопрос.

Материалы и методы

Объектом исследования в эксперименте явилась кожа донорской области, находящаяся в условиях локальной циркуляторной компенсированной гипоксии. Предмет исследования составила активность процессов репаративной регенерации и наличие сигнального белка VEGF в дерме при тренировке трансплантата к условиям гипоксии. Задачей экспериментального исследования явилось: изучение влияния локальной циркуляторной гипоксии на активность процессов репаративной регенерации и ангиогенеза. В эксперименте моделировался этап кожной пластики, связанный с тренировкой участка кожи к условиям гипоксии путем нанесения двух параллельных разрезов кожи до фасции.

Научная гипотеза заключалась в том, что в условиях контролируемой гипоксии, созданной путем нанесения двух параллельных разрезов кожи, активизируются процессы репаративной регенерации в области между разрезами.

При проведении экспериментальных исследований использовали 9 экспериментальных животных (крыс) массой 250-300 г. Экспериментальные исследования включали в себя выполнение следующих этапов:

1. Моделирование условий гипоксического preconditionирования кожи донорской области нанесением двух параллельных разрезов кожи и создания области локальной циркуляторной гипоксии.

2. Гистологическое, морфологическое и иммуногистохимическое исследование образцов кожи, находящихся между разрезами, и образцов симметричных участков кожи вне гипоксии через 2 суток после оперативного вмешательства.

3. Статистическая обработка результатов исследования.

Всем животным на коже правого бедра после обработки операционного поля раствором антисептика наносили 2 параллельных разреза кожи до мышц, длиной 2 см, на расстоянии 1 см друг от друга (рис. 1).



Рис. 1. Формирование двух параллельных разрезов кожи правого бедра до мышц

При этом дальнейшую мобилизацию кожного лоскута проводили под контролем микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (аппарат ЛАКК-02) (рис. 2).



Рис. 2. ЛАКК-02 (лазерный анализатор капиллярного кровотока)

При снижении показателя микроциркуляции (ПМ) на 40-50% от исходного мобилизацию кожного лоскута прекращали (рис. 3).



Рис. 3. Мобилизация кожного лоскута под контролем лазерной доплеровской флоуметрии

После гемостаза накладывали внутрикожный шов атравматичной нитью Пролен 4.0 (рис. 4).



Рис. 4. Вид послеоперационной раны после ушивания внутрикожным швом

Через 2 суток проводили забор образцов кожи, находящейся в условиях гипоксии между разрезами и на симметричном участке вне гипоксии.

Операционный материал фиксировали в растворе нейтрального 10%-ного формалина. Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате Excelsior ES (Thermo Scientific). После проводки изготавливали парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific). Срезы толщиной 4-6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific), окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое окрашивание проводили в автоматизированном модуле – BOND-MAX (протокол F) с использованием системы детекции Bond polymer refine detection (Leica Biosystems, UK) с предварительным депарафинированием срезов и демаскировкой антигенов. Были использованы моноклональные антитела к Ki-67, clon SP6 (Lab Vision Corporation, USA), антитела к VEGF, polyclonal (Diagnostic BioSystems, USA). Для оценки пролиферативной активности (ПА) подсчитывали количество Ki-67-положительных клеток в 10 полях зрения при x400. Индекс Ki-67 определяли по формуле: $ИП = (n/N) \times 100\%$, где n – количество меченых ядер, N – общее число ядер в поле зрения микроскопа.

Для статистической обработки полученных данных использовали компьютерную программу Statistica 6.0. Для оценки статистической значимости различий при сравнении групп по количественному признаку в связанных группах использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Выборочные параметры, приводимые далее, имеют следующие обозначения: Me – медиана, Q₁ – верхний квартиль, Q₃ – нижний квартиль, n – объем анализируемой подгруппы, p – величина статистической значимости различий. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5% ($p \leq 0,05$).

Результаты

Представлены результаты изучения влияния локальной циркуляторной гипоксии, возникающей при выполнении первого этапа кожной пластики, а именно нанесении двух параллельных разрезов кожи до мышц на пролиферативную активность лоскута.

При иммуногистохимическом анализе образцов ткани выявлены статистически значимые различия между активностью процессов регенерационной гипертрофии в основной и контрольной группах. В основной группе отмечалось появление клеток, экспрессирующих рецепторы к васкулярному эндотелиальному фактору роста (VEGF) (рис. 5).

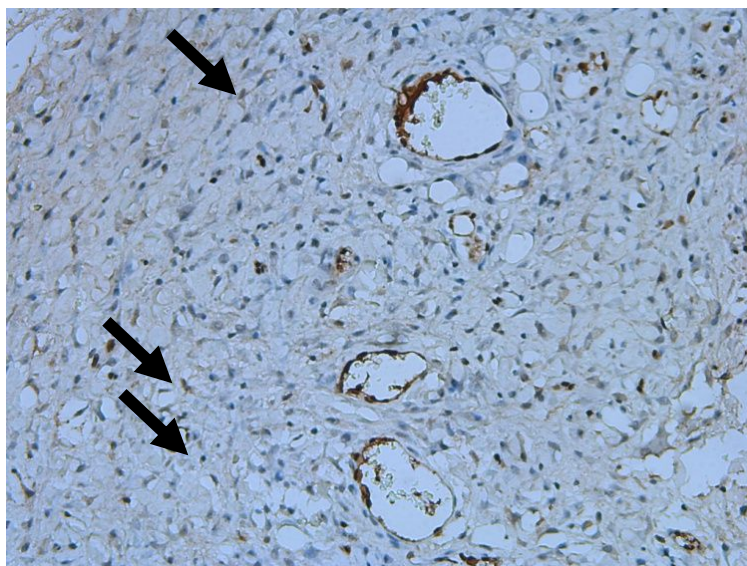
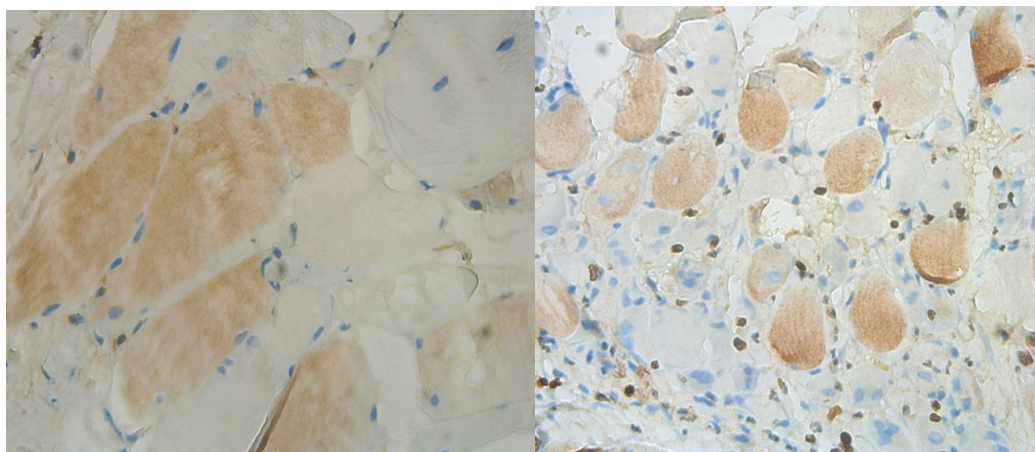


Рис. 5. Поперечный срез дермы, основная группа. Клетки, экспрессирующие рецепторы к васкулярному эндотелиальному фактору роста (показаны стрелкой).

Иммуногистохимическое окрашивание с применением антитела к VEGF.

Увеличение в 200 раз

По данным морфометрического анализа иммуногистохимических препаратов кожи, индекс пролиферации в контрольной группе составил 25% [19; 31], в основной – 37% [30; 44], ($p=0,018$) (рис. 6).



А)

Б)

Рис. 6. Поперечный срез дермы, контрольная группа (А) и основная группа (Б).

Пролиферация клеток соединительной ткани, Ki-67 позитивные клетки.

Иммуногистохимическое окрашивание с применением антитела к Ki-67.

Увеличение в 400 раз

Обсуждение

Кожа играет важнейшую роль в организме человека – целостность кожного покрова напрямую связана с поддержанием гомеостаза организма. Сосудистая система кожи состоит из артериальных (поверхностное и глубокое) и венозных (два поверхностных и глубокое) сплетений [5]. Между эпидермисом и сосочковым слоем дермы находятся узкие петли (ячейки) поверхностной артериальной сети [6]. При повреждении кожных покровов происходят значительные структурные изменения, связанные с потерей белка и жидкости, организм становится восприимчив к инфекциям и т.д. Невозможность самостоятельного закрытия ран требует от врача активных действий. Свободная кожная пластика остается на сегодняшний день методом выбора в лечении больных с длительно незаживающими ранами [7]. Одним из самых частых осложнений свободной кожной пластики является некроз трансплантата, причем «критическим сроком» являются 3-5 сутки после оперативного вмешательства.

В настоящее время предложено большое количество способов подготовки трансплантата к кожной пластике, связанных с введением биологически активных веществ в донорскую зону, но, к сожалению, каждый из них имеет недостатки. Авторским коллективом предложен способ подготовки трансплантата к свободной кожной пластике путем стимуляции процессов репаративной регенерации без введения веществ извне (заявка на патент на изобретение РФ № 2016104520). Способ основан на предложенном в 1984 году Я. Золтаном [8] методе тренировки лоскута кожи для аутодермопластики местными тканями и связан со стимуляцией роста сосудов на фоне снижения кровоснабжения закроенного лоскута кожи, то есть феноменом гипоксического прекондиционирования. При недостаточной циркуляции крови в тканях (в условиях циркуляторной гипоксии) сигнальный белок VEGF отвечает за восстановление подачи кислорода к тканям и стимулирует ангиогенез (рост сосудов из уже существующих) и васкулогенез (образование новой сосудистой сети). В условиях гипоксии повышается уровень Ki-67 ядерного белка, являющегося маркером, необходимым для определения прироста клеточной популяции (индекс пролиферации). Однако описания использования метода гипоксического прекондиционирования для свободной кожной пластики в литературных источниках мы не нашли. Основываясь на исследованиях М.В. Морозова (2008) [9], в которых доказано, что

глубина залегания капилляров сосочкового слоя и сосудов субпапиллярного сплетения оставляет $66\pm 0,7$ и $85\pm 0,45$ мкм соответственно, и учитывая тот факт, что толщина свободного трансплантата составляет 300-400 мкм, считаем возможным применить данный способ при выполнении свободной кожной пластики. Гипотеза, заключающаяся в том, что в условиях контролируемой гипоксии путем нанесения двух параллельных разрезов кожи перед выполнением свободной кожной пластики активизируются процессы репаративной регенерации и ангиогенеза в области между разрезами, подтвердилась, что дает основания для возможности дальнейшего применения метода в клинике.

Выводы

По данным иммуногистохимического анализа, в условиях локальной циркуляторной компенсированной гипоксии через 2 суток после нанесения двух параллельных разрезов кожи до мышц и при снижении показателя микроциркуляции в лоскуте на 50% от исходного появляются клетки, экспрессирующие рецепторы к васкулярному эндотелиальному фактору роста (VEGF), а также происходит увеличение индекса пролиферации (Ki-67) с 25 до 37%, что свидетельствует о возможности тренировки трансплантата при кожной пластике.

Список литературы

1. Полуоткрытый способ лечения гнойных ран мягких тканей / С.Г. Измайлов [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 1. – С. 56-59.
2. Аминев В.А., Докукина Л.Н., Перетягин С.П. Способ подготовки донорских участков при выполнении кожной пластики: патент России № 2392885. 2009. Бюл. № 18.
3. Лечение обширных ран и трофических язв не ожоговой этиологии в клинике термических поражений и пластической хирургии / Фисталь Э.Я. [и др.] // Комбустиология. – 2007. – № 32-33. – С. 4-10.
4. Смирнов М.В., Дроботов В.Н., Кричевский А.Л. и др. Способ кожной пластики: патент России № 2446833. 2010. Бюл. № 10.
5. Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке состояния и расстройств микроциркуляции крови: методическое пособие / В.И. Козлов, Г.А. Азизов, О.А. Гурова, Ф.Б. Литвин. – М.: РУДН ГНЦ лазерной медицины, 2012. – 32 с.
6. Кожа (строение, функция, общ. патология и терапия) / А.М. Чернух, И.Н. Михайлов, Е.В. Виноградова [и др.]; под ред. А.М. Чернуха, Е.П. Фролова. – М.: Медицина, 1982. – 336 с.

7. Ramanujam C.L. Impact of diabetes and comorbidities on split-thickness skin grafts for foot wounds / C.L. Ramanujam [et al.] // J Am Podiatr Med Assoc. – 2013. – Vol. 103, № 3. – P. 223-232.
8. Золтан Я. Пересадка кожи: атлас. – Будапешт: Издательство академии наук Венгрии, 1984. – 304 с.
9. Морозов М.В. Морфофункциональное состояние микроциркуляции в коже различных топографо-анатомических областей тела человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. - 24 с.