

DOI: 10.1134/S0869813918110055

**МЕХАНИЗМЫ ДИСТАНТНОГО СТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОЖНОГО ЛОСКУТА
ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА**

© А. Н. Иванов, Д. Д. Лагутина, Е. В. Гладкова, О. В. Матвеева,
И. А. Мамонова, И. Е. Шутров, Т. А. Андропова,
В. Ю. Ульянов, И. А. Норкин

Научно-исследовательский институт травматологии, ортопедии и
нейрохирургии Саратовского государственного медицинского
университета им. В. И. Разумовского, Саратов, Россия
E-mail: lex558452@gmail.com, darya.lagutina@yandex.ru

В эксперименте на крысах изучены дистантное стимулирующее действие аутоотрансплантации кожного лоскута на микроциркуляцию и механизмы его реализации при повреждении седалищного нерва. Установлено, что аутоотрансплантация кожного лоскута, выполненная на фоне нейрорафии седалищного нерва, обеспечивает поддержание адекватной перфузии в тканях оперированной конечности. При этом изменения состава клеточных популяций дермы аутоотрансплантата проявляются увеличением числа эозинофилов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов. Аутоотрансплантация вызывает увеличение концентрации гистамина, фактора роста эндотелия сосудов и снижает уровень катехоламинов в крови у животных после нейрорафии. Представленные результаты позволяют заключить, что механизм стимулирующего действия аутоотрансплантации кожного лоскута на микроциркуляцию при повреждении нерва сложен, ассоциирован с изменением состава клеточных популяций аутоотрансплантата и реализуется путем влияния на баланс вазоактивных веществ в крови.

Ключевые слова: аутоотрансплантация кожного лоскута, микроциркуляция, нейрорафия, регенерация, факторы роста.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 11. С. 1313—1324. 2018

A. N. Ivanov, D. D. Lagutina, E. V. Gladkova, O. V. Matveeva, I. A. Mamonova, I. E. Shutrov, T. A. Andronova, V. Yu. Ulyanov, I. A. Norkin. MECHANISMS OF DISTANT STIMULATORY ACTION OF SKIN AUTOTRANSPLANTATION IN CASES OF PERIPHERAL NERVE INJURY. Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery Saratov State Medical University n. a. V. I. Razumovsky, Saratov, Russia, e-mail: lex558452@gmail.com.

The distant stimulatory action of skin autotransplantation on microcirculation and its mechanisms in cases of sciatic nerve injury were studied in rats. It was ascertained that skin autotransplantation carried out in the course of the sciatic nerve neurography provides maintenance of ade-

quate perfusion in the operated limb tissues. Changes in autograft cell population size are characterized by the increased number of eosinophils, lymphocytes, macrophages, and fibroblasts. Autotransplantation increase the histamine and vascular endothelium growth factor concentrations and reduces the catecholamine level in blood of animals after neurography. The represented data suggests that the mechanism of stimulatory action of skin autotransplantation on the microcirculation in cases of nerve injury is complicated and associated with the change in autograft cell population size and also realized by the effect on the balance of vasoactive substances in blood.

Key words: skin autotransplantation, microcirculation, neurography, regeneration, growth factors.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 11. P. 1313—1324. 2018

Метаболизм тканей и органов во многом зависит от полноценного функционирования микроциркуляторного сосудистого русла. В связи с этим микроциркуляторные нарушения являются неотъемлемым компонентом при развитии различных заболеваний и патологических процессов. Особое значение микроциркуляторные реакции имеют при регенерации различных тканей. В частности, при повреждении периферических нервов возникает денервационная гиперчувствительность [20], которая сопровождается спазмом сосудов микроциркуляторного русла и ухудшением состояния микрокровотока. В свою очередь данные нарушения приводят к замедлению регенерации нервного ствола [8, 10, 17]. Следовательно, характер микроциркуляторных реакций является определяющим фактором для протекания регенерации тканей, что обуславливает роль микроциркуляции как потенциальной точки приложения различных регулирующих воздействий для стимуляции репаративных процессов. С другой стороны, собственные ткани организма сами по себе могут являться физиологическими источниками регуляторов состояния микроциркуляторного русла, изменяя его функционирование в соответствии со своими потребностями при повреждении, гипоксии или воспалении [24].

В литературе имеется ряд сведений о положительных эффектах применения трансплантации алло- и аутоклеток для биостимуляции метаболических процессов, в частности при физиологической и репаративной регенерации. Наибольшей эффективностью, по мнению некоторых авторов, обладает послеродовая плацента, в которой содержится большое количество биорегуляторов [3]. Однако для трансплантации используются и другие ткани организма, такие как бесклеточная амниотическая мембрана, печень, кровь, стекловидное тело [2]. Одним из механизмов системного стимулирующего действия при трансплантации аллотканей в ряде случаев является изменение концентрации различных биологически активных веществ в крови. Например, мезенхимальные стромальные клетки амниотической мембраны при имплантации в организм синтезируют иммуномодулирующие факторы, такие как интерлейкин-10 и ряд регуляторов ангиогенеза, в частности фактор роста эндотелия сосудов, инсулиноподобный фактор роста и другие, которые обеспечивают структурно-функциональное ремоделирование микроциркуляторного русла, улучшая трофику тканей и стимулируя регенерацию [27].

Следует отметить, что использование аллотканей сопряжено с необходимостью проведения соответствующей обработки, консервации, а также риском развития инфекционных и иммунных осложнений. В этой связи более перспективным методом биостимуляции является стимуляция собственными тканями, так как позволяет избежать указанных недостатков. Широкое применение находит аутологичная трансплантация костного мозга, которая способствует ангиогенезу и поддержанию адекватной перфузии в зоне ишемии [26].

Также в литературе имеются сведения, что аутооттрансплантация жировой ткани обладает выраженным стимулирующим действием. В экспериментах на белых крысах было показано, что внутрибрюшная аутооттрансплантация невисцерального жира защищает от снижения толерантности глюкозы и резистентности к инсулину, а также предотвращает накопление триацилглицерина в печени. При этом гистологические изменения трансплантированной ткани, проявляющиеся снижением размеров адипоцитов, инфильтрацией клетками макрофагального ряда и ее васкуляризацией, сопровождаются изменением концентрации в крови ряда биологически активных веществ, в частности наблюдается заметное снижение концентрации в плазме некоторых провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-6, IL-17, макрофагального воспалительного белка-1 β [19, 22].

Ткани всех слоев кожи, включая жировую ткань подкожной клетчатки, обладают высоким регенераторным потенциалом, богаты различными биологически активными веществами, способными оказывать биостимулирующее действие, в частности гликозоаминогликанами, которые могут выступать в качестве регуляторов и модуляторов ангиогенеза [13, 25]. Кроме того, клеточные популяции различных слоев кожи, к примеру различные виды лейкоцитов, являются продуцентами широкого спектра различных биологически активных веществ, регуляторов регенерации [16]. Важно отметить, что забор и аутооттрансплантация кожного лоскута ввиду его поверхностного расположения имеет меньший риск развития побочных эффектов по сравнению с приведенными выше методами биостимуляции.

В связи с этим целью данного исследования являлась проверка гипотезы, заключающейся в том, что локальные тканевые реакции в зоне аутооттрансплантации полнослойного кожного лоскута сопровождаются изменением баланса вазоактивных веществ в системном кровотоке, которые обеспечивают реализацию дистантного стимулирующего действия на микроциркуляцию в зоне нарушенной иннервации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 57 белых беспородных крысах-самцах массой 200—250 г. При проведении экспериментов на животных соблюдались этические принципы в соответствии с Женевской конвенцией (Geneva, 1990). Всем животным за 5 мин до проведения манипуляций вводилась внутримышечно комбинация золетила («VirbacSanteAnimale», Франция) в дозе 0.1 мл/кг и ксилазина («Interchemie», Нидерланды) в дозе 1 мг/кг массы тела для достижения наркоза. Животные были разделены на 3 группы: 1-я группа — контрольная — включала 8 интактных крыс; 2-я группа — сравнительная — содержала 29 животных, которым выполнялась нейрорафия седалищного нерва после его перерезки; 3-я группа — опытная, — включала 20 крыс, которым выполнялась аутооттрансплантация полнослойного кожного лоскута в межлопаточную область одновременно с нейрорафией седалищного нерва.

Полная перерезка седалищного нерва выполнялась на уровне средней трети бедра. Нейрорафия осуществлялась путем наложения эпинеуральных швов с применением атравматических игл и шовного материала 7/0 USP и проводилась непосредственно после перерезки седалищного нерва.

Аутооттрансплантация кожного лоскута выполнялась в межлопаточной области. Для этого на депилированном участке иссекался полнослойный кожный лоскут, в ране формировался подкожный карман, куда помещался обра-

ботанный кожный лоскут, после чего рана ушивалась. Размер полнослойного кожного лоскута составлял 0.1 % от площади поверхности тела, рассчитывался для каждого животного. Обработка кожного лоскута проводилась поочередно 3%-ным раствором перекиси водорода, 70%-ным этиловым спиртом и 0.9%-ным раствором NaCl с целью удаления разрушенных клеток и дезинфекции.

Микроциркуляцию исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью анализатора «ЛАКК-ОП» (производство НПП «Лазма», Россия) и программы LDF 3.0.2.395. Регистрацию ЛДФ-грамм выполняли у сравнительной и опытной групп на 7-е и 21-е сутки, располагая световодный зонд на коже тыльной поверхности стопы. В качестве контроля использовали ЛДФ-граммы интактных животных. При исследовании микроциркуляции определяли показатель перфузии в перфузионных единицах.

Забор крови у животных для изготовления мазков, а также получения плазмы и сыворотки осуществляли пункцией правых отделов сердца. Для получения плазмы кровь забирали в пробирки BD Vacutainer с цитратом натрия, а для получения сыворотки — с разделительным гелем и активатором свертывания (BD, США).

Определение концентрации гистамина в плазме крови проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов Histamine-ELISA (IBL International, Германия). Определение концентрации метаболитов оксида азота (NO) проводилось биохимическим методом в микропланшетном формате, основанном на превращении нитрата в нитрит нитрат-редуктазой и качественной реакции Грисса. Для определения стабильных метаболитов использовался набор реактивов Total NO/Nitrite/Nitrate Assay (R&D Systems, Inc., США). Концентрацию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов VEGF Rat (RnD Systems, США). Проведение иммуноферментного анализа осуществлялось с помощью автоматического микропланшетного спектрофотометра Epoch (BioTek Instruments, США).

Уровень катехоламинов в крови определяли цитохимическим методом по адсорбции их на эритроцитах по Мардарь А. И., Кладиенко Д. П. (1986). Для этого готовили тонкий мазок крови, свежие мазки фиксировали и помещали в 2%-ный водный раствор калия бихромата при температуре 37 °С на 2 ч. Затем мазки промывали в нескольких порциях дистиллированной воды и окрашивали 5%-ным водным раствором нитрата серебра в течение 5 мин. Избыток красителя смывали дистиллированной водой, затем эритроциты окрашивали 1%-ным спиртовым раствором эозина и промывали дистиллированной водой. Морфометрический анализ мазков осуществляли с помощью микровизора. Концентрацию катехоламинов в крови оценивали по количеству включений на эритроцитах, выраженную в условных единицах (количество включений на 100 клеток).

Выведение животных из эксперимента осуществляли после забора крови путем передозировки препаратов для наркоза. Для проведения морфологического исследования проводили забор мягких тканей области аутотрансплантации кожного лоскута на 7-е и 21-е сутки эксперимента. В качестве контроля использовали образцы кожи интактных животных. Материал для морфологического исследования фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина (ООО «Биовитрум», Россия), обезжизивали в спиртах восходящей плотности, заливали в парафин. Срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовит-

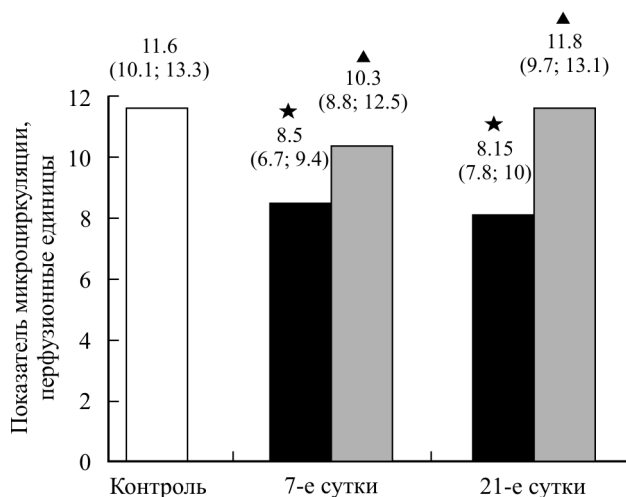
рум», Россия). Для покрытия срезов применяли монтирующую среду Bio-Mount (BioOptica, Италия).

Исследование препаратов проводили при помощи микроскопа AxioImager Z2 (CarlZeiss, Германия), оценивая структуру, состояние микроциркуляторного русла, лейкоцитарную инфильтрацию окружающих аутотрансплантат мягких тканей (дермы и гиподермы), состояние эпидермиса и дермы аутотрансплантата. Для оценки динамики состава клеточных популяций дермы аутотрансплантата проводили подсчет количества фибробластов, фиброцитов, нейтрофильных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов, а также лимфоцитов в поле зрения при увеличении $\times 400$.

Статистическую обработку осуществляли по программе Statistica 10.0. Большинство наших данных не соответствовало закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовался U-критерий Манна—Уитни, на основании которого рассчитывали Z-критерий и показатель достоверности различия p . Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы оперированной конечности у животных, которым выполнялась нейрорафия седалищного нерва, выявлено значимое снижение перфузионного показателя относительно контрольных значений на 7-е сутки эксперимента. У животных данной группы на 21-е сутки сохраняется низкий относительно контроля уровень перфузионного показателя и отмечается отсутствие статистически значимых изменений при сравнении со значениями 7-х суток. Обнаружено, что у



Изменения микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы у животных, которым выполнялась нейрорафия седалищного нерва изолированно (*черный цвет*) и в комбинации с аутотрансплантацией полнослойного кожного лоскута в межлопаточной области (*серый цвет*) в сравнении с интактными крысами контрольной группы (*белый цвет*). Приведены медиана, верхний и нижний квартили.

Звездочкой обозначены значимые ($p < 0.05$) различия с группой контроля, треугольником — значимые ($p < 0.05$) различия с группой крыс, которым при нейрорафии седалищного нерва аутотрансплантация кожного лоскута не проводилась.

Таблица 1

Динамика клеточных популяций дермы аутотрансплантата
(количество клеток в одном поле зрения при увеличении $\times 400$)

Популяции клеток	Контроль ($n = 12$)	Дерма аутотрансплантата	
		7 сутки ($n = 7$)	21 сутки ($n = 8$)
Фибробласты	.42 (27; 52)	121 (108; 143) $p_1 = 0.000248$	104 (60; 182) $p_1 = 0.000077$ $p_2 = 0.317059$
Фиброциты	18 (13; 23)	25 (17; 32) $p_1 = 0.417888$	21 (14; 32) $p_1 = 0.558185$ $p_2 = 0.796252$
Нейтрофилы	0 (0; 0)	2 (1; 5) $p_1 = 0.018617$	1 (0; 4) $p_1 = 0.005414$ $p_2 = 0.628299$
Эозинофилы	0 (0; 0)	6 (4; 8) $p_1 = 0.000248$	3 (2; 8) $p_1 = 0.000016$ $p_2 = 0.332922$
Лимфоциты	0 (0; 2)	8 (5; 12) $p_1 = 0.00908$	13 (5; 19) $p_1 = 0.000034$ $p_2 = 0.220032$
Макрофаги	0 (0; 0)	3 (1; 7) $p_1 = 0.012162$	1 (1; 3) $p_1 = 0.001393$ $p_2 = 0.401388$

Примечание. Приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 — по сравнению с контролем; p_2 — по сравнению с 7-ми сутками эксперимента.

животных опытной группы под влиянием аутотрансплантации кожного лоскута происходит нормализация перфузии кожи тыльной поверхности стопы оперированной конечности в противоположность крысам группы сравнения. Перфузионный показатель у животных данной группы не имеет различий по сравнению с контролем и статистически значимо превышает уровень перфузии кожи стопы крыс группы сравнения как на 7-е, так и на 21-е сутки эксперимента (см. рисунок).

При микроскопии препаратов тканей области аутотрансплантации обнаружено, что в период с 7-х по 21-е сутки происходит истончение кожного лоскута, сопровождающееся деградацией эпидермиса. Вместе с тем уже на 7-е сутки отмечается изменение состава клеточных популяций дермы аутотрансплантата, проявляющееся увеличением числа фибробластов, лимфоцитов и макрофагов (табл. 1). Отличительной особенностью является увеличение количества эозинофилов в среднем до 6 клеток в поле зрения, в отдельных полях зрения — до 10. Результаты морфологического исследования области аутотрансплантации на 21-е сутки эксперимента отражают сохранение умеренной инфильтрации лейкоцитами дермы аутотрансплантата. В составе лейкоцитарной инфильтрации встречаются единичные нейтрофилы, сохраняется повышенное содержание эозинофилов — в среднем 3, а в отдельных препаратах — до 5—8 в поле зрения (табл. 1). Также в составе дермы обнаруживаются лимфоциты, плазмоциты, отдельные клетки моноцитарно-макрофагального ряда и скопления гигантских многоядерных клеток. Морфометрический

Таблица 2

Изменение концентрации vasoактивных веществ в крови после нейрорафии и аутоотрансплантации полнослойного кожного лоскута

Показатель	Группа					
	Контроль	Нейрорафия		Нейрорафия и аутоотрансплантация кожного лоскута		
		7-е сутки (n = 7)	21-е сутки (n = 8)	7-е сутки (n = 7)	21-е сутки (n = 8)	
Катехоламины (усл. ед. на 100 клеток)	22 (16; 25.7)	165 (140; 205) $p_1 = 0.000183$	105 (95; 110) $p_1 = 0.000166$ $p_2 = 0.012186$	50 (35; 65) $p_1 = 0.001706$ $p_{np} = 0.012186$	65 (60; 70) $p_1 = 0.000176$ $p_2 = 0.210076$ $p_{np} = 0.021572$	
Гистамин, нг/мл	1.64 (1.49; 1.93)	1.84 (1.44; 2.37) $p_1 = 0.470487$	1.34 (1.19; 2.1) $p_1 = 0.885234$ $p_2 = 0.377225$	3.14 (2.45; 4) $p_1 = 0.001460$ $p_{np} = 0.026225$	3.16 (2.59; 3.69) $p_1 = 0.000939$ $p_2 = 0.959922$ $p_{np} = 0.001764$	
VEGF, pg/ml	5.97 (3.32; 7.3)	21.9 (16.6; 31.2) $p_1 = 0.003405$	13.27 (9.96; 15; 27) $p_1 = 0.006642$ $p_2 = 0.039171$	23.23 (20.58; 50.58) $p_1 = 0.002165$ $p_{np} = 0.520317$	25.22 (17.92; 28.51) $p_1 = 0.001460$ $p_2 = 0.959922$ $p_{np} = 0.016925$	
Стабильные метаболиты оксида азота, ммоль/л	677 (537; 934)	720 (442; 1083) $p_1 = 0.064550$	458 (349; 667) $p_1 = 0.148012$ $p_2 = 0.283978$	685 (442; 924) $p_1 = 0.846451$ $p_{np} = 0.748774$	643 (309; 1042) $p_1 = 0.651379$ $p_2 = 0.959922$ $p_{np} = 0.830324$	

Примечание. Приведены медиана, верхний и нижний квартили; p_1 — по сравнению с контролем; p_2 — по сравнению с 7-ми сутками эксперимента; p_{np} — по сравнению с группой животных, которым выполнялась только нейрорафия в тот же срок эксперимента.

анализ свидетельствует, что состав клеточных популяций дермы аутотрансплантата не претерпевает значимой динамики по сравнению с 7-ми сутками эксперимента (табл. 1).

В результате проведенных исследований обнаружено, что перерезка и нейрорафия седалищного нерва вызывают статистически значимое увеличение относительно контроля количества сорбированных на эритроцитах гранул катехоламинов на 7-е сутки эксперимента. К 21-м суткам уровень катехоламинов в крови у животных группы сравнения снижается относительно 7-х суток в 1.5 раза, однако не достигает контрольных значений. Аутотрансплантация кожного лоскута, выполненная одновременно с нейрорафией, значимо снижает уровень катехоламинов в крови как на 7-е, так и на 21-е сутки эксперимента (табл. 2).

В результате определения концентрации гистамина в плазме крови животных с помощью иммуноферментного анализа не выявлено значимой динамики концентрации гистамина в плазме относительно уровня контроля как на 7-е, так и на 21-е сутки эксперимента. В противоположность этому у животных опытной группы концентрация гистамина в плазме на 7-е сутки эксперимента в 1.9 раза превышает контрольные значения и не имеет тенденции к снижению на 21-е сутки после оперативного вмешательства (табл. 2).

При оценке изменений концентрации VEGF в крови было установлено, что нейрорафия седалищного нерва у животных группы сравнения вызывает статистически значимое увеличение концентрации VEGF в сыворотке на 7-е сутки эксперимента. На 21-е сутки концентрация данного фактора у животных группы сравнения значительно снижается, но не достигает уровня значений контрольной группы. У животных опытной группы уровень VEGF на 7-е сутки эксперимента также повышен и не имеет значимых различий относительно группы сравнения. Вместе с тем уровень данного фактора в крови животных опытной группы на 21-е сутки почти вдвое выше, чем в группе сравнения (табл. 2).

При определении уровня стабильных метаболитов оксида азота (нитратов и нитритов) в сыворотке крови статистически значимых изменений концентрации на 7-е и 21-е сутки эксперимента относительно контрольных значений не обнаружено ни в группе сравнения, ни у животных опытной группы. У животных группы сравнения отмечается лишь тенденция, не достигающая статистической значимости, к снижению уровня нитратов и нитритов на 21-е сутки эксперимента по сравнению с контролем (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ключевым патогенетическим звеном, вызывающим нарушения кровотока, при перерезке и нейрорафии седалищного нерва, являются изменения в центральной и периферической нервной системе [1, 6, 10, 11]. Представленные данные, касающиеся динамики уровня катехоламинов в системном кровотоке, свидетельствуют о выраженной активации симпатoadреналовой системы у крыс при повреждении седалищного нерва, что неизбежно оказывает негативное влияние, которое проявляется снижением перфузии тканей оперированной конечности. Аутотрансплантация кожного лоскута в межлопаточной области на фоне нейрорафии седалищного нерва вызывает снижение выраженности активации симпатoadреналовой системы, что проявляется уменьшением уровня катехоламинов в крови животных. Ограничение активации

симпатической системы под влиянием аутотрансплантации может объяснять поддержание адекватной перфузии в тканях оперированной конечности у крыс опытной группы. Рассмотрение эффектов и механизмов влияния аутотрансплантации на состояние нервной ткани заслуживает отдельного внимания. В опубликованной ранее работе [7] было продемонстрировано, что посредством стимуляции и пролонгации продукции нейротрофина-3 аутотрансплантация кожного лоскута в межлопаточной области, с одной стороны, препятствует развитию дегенеративных изменений в седалищном нерве крысы после нейрорафии, а с другой — стимулирует структурное и функциональное восстановление нервных волокон и ускоряет реиннервацию мышц [7]. Уменьшение дегенеративных изменений в нервном стволе может объяснять снижение активности симпатoadреналовой системы, что препятствует развитию нарушений перфузии оперированной конечности. С другой стороны, ускорение реиннервации сосудов оперированной конечности обеспечивает восстановление нормальной регуляции микрокровотока.

Вместе с тем в рамках данной работы было проведено исследование возможности реализации дистантного стимулирующего действия аутотрансплантации кожного лоскута на кровоток в пораженной конечности за счет влияния гуморальных факторов непосредственно на сосуды микроциркуляторного русла в условиях нарушенной иннервации. Представленные результаты свидетельствуют, что при аутотрансплантации кожного лоскута в крови животных нарастает концентрация гистамина и VEGF, которые обладают вазодилатирующим эффектом. Статистически значимое повышение концентрации гистамина в крови животных опытной группы под влиянием аутотрансплантации кожного лоскута отмечается уже на 7-е сутки эксперимента и его вазодилатирующее действие, вероятно, препятствует снижению перфузии тканей оперированной конечности. Повышение уровня гистамина может быть следствием дегрануляции тучных клеток аутотрансплантата. Это предположение подтверждает увеличение в составе клеточных популяций дермы аутотрансплантата числа эозинофилов [5], хемоаттрактантом которых является гистамин и ряд других соединений, выделяемых тучными клетками [16]. Согласно данным литературы, тучные клетки являются важными регуляторами регенерации в иммунологически непривилегированных тканях, и блокада их функциональной активности вызывает выраженное нарушение репаративных процессов. Регенеративные эффекты тучных клеток связаны с выделением модуляторов воспаления, пролиферации и миграции клеток, включая не только гистамин, но и химазу, триптазу, гидролазы и пептидазы, гепарин, а также спектр цитокинов [16].

Еще одним гуморальным механизмом, обеспечивающим поддержание нормального уровня перфузии в пораженной конечности, является пролонгация повышения уровня VEGF в кровотоке вплоть до 21-х суток. Недавние исследования свидетельствуют, что при ишемическом инсульте эозинофилы играют значительную роль в восстановительных процессах нервной ткани, оказывая эндотелий-протекторное действие, а также стимулируя ангиогенез за счет продукции VEGF [21]. Известно, что активированные макрофаги значительно увеличивают продукцию VEGF [9, 12]. Фибробласты также являются физиологически важными продуцентами данного ростового фактора [23]. Следовательно, пролонгированное повышение концентрации VEGF в системном кровотоке у крыс после аутотрансплантации кожного лоскута на фоне нейрорафии седалищного нерва может быть следствием его продукции макрофагами, эозинофилами и фибробластами, число которых значительно увеличивается в составе клеточных популяций дермы аутотрансплантата.

В литературе описано, что биостимулирующее действие дермального аллотрансплантата при посттравматической субатрофии глазного яблока сопровождается увеличением концентрации в слезной жидкости и в сыворотке крови стабильных метаболитов оксида азота — ключевого вазодилатора [2, 14]. Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют, что ауто-трансплантация полнослойного кожного лоскута не оказывает выраженного влияния на концентрацию нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс при нейрорафии седалищного нерва. Вместе с тем эти данные не позволяют полностью исключить вовлечение системы оксида азота в реализацию дистантного стимулирующего действия ауто-трансплантации на микроциркуляцию, так как концентрация его стабильных метаболитов в крови зависит от многих факторов и не всегда коррелирует с функциональной биодоступностью NO в системе эндотелий—гладкомышечные клетки [4].

Следует отметить, что воспалительный характер изменений дермы ауто-трансплантата может являться не единственным триггерным механизмом, обеспечивающим продукцию гуморальных факторов, которые, попадая в системный кровоток, оказывают дистантное стимулирующее действие на микроциркуляцию в зоне нарушенной иннервации. Согласно гистологическим данным, к 21-м суткам происходит деградация эпидермиса и истончение дермы ауто-трансплантированного полнослойного кожного лоскута, что может сопровождаться поступлением продуктов расщепления в кровоток. Среди подобных продуктов регуляторные эффекты способны оказывать полипептиды типа цитомединов, ферментов, ростовые факторы и другие. Цитомедины обладают дистантным неспецифическим действием на различные органы и системы, в частности обладают стимулирующим влиянием на регенерацию нерва, что позволяет рассматривать данную группу регуляторных пептидов как один из механизмов реализации тканевой биостимуляции [15]. Стимулирующим действием обладают также и компоненты межклеточного матрикса, в частности олигосахариды гиалуроновой кислоты, в большом количестве содержащейся в коже [18]. Например, развитие регенерационных процессов в кожной ране у крыс стимулировали введением тканевого экстракта гетерогенной кожи, что отражалось в ускоренной эпителизации ран и активации дермальных элементов с формированием относительно меньшего рубца [13].

Таким образом, ауто-трансплантация кожного лоскута, выполненная на фоне нейрорафии седалищного нерва, обеспечивает поддержание адекватной перфузии в тканях оперированной конечности и уменьшение выраженности признаков денервационной гиперчувствительности сосудов. Представленные данные подтверждают гипотезу о том, что локальные тканевые реакции в зоне ауто-трансплантации полнослойного кожного лоскута сопровождаются изменением баланса вазоактивных веществ в системном кровотоке, которые обеспечивают реализацию дистантного стимулирующего действия на микроциркуляцию в зоне нарушенной иннервации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Древаль О. Н., Кузнецов А. В., Джинджихадзе Р. С., Пучков В. Л., Берснев В. П. Клинические рекомендации по диагностике и хирургическому лечению повреждений и заболеваний периферической нервной системы. М. 2015.

[2] Галимова В. У., Камиллов Ф. Х., Газдалиева Л. М., Нураева А. Б. Влияние хирургического лечения посттравматической субатрофии глаза на уровень оксида азота в плазме крови и слезной жидкости. Вестн. Оренбургского гос. ун-та. 78: 58—60. 2007.

[3] Громова О. А., Торшин И. Ю., Волков А. Ю., Смартыгин С. Н., Назаренко О. А. Элементный состав препарата Лаеннек и его ключевая роль в фармакологическом воздействии препарата. Пластическая хирургия и косметология. 4: 1—7. 2010.

[4] Иванов А. Н., Гречихин А. А., Норкин И. А., Пучиньян Д. М. Методы диагностики эндотелиальной дисфункции. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 13(4): 4—11. 2014.

[5] Иванов А. Н., Матвеева О. В., Шутров И. Е., Лагутина Д. Д., Федонников А. С., Пучиньян Д. М., Козадаев М. Н., Норкин И. А. Клеточные механизмы дистантного стимулирующего влияния аутотрансплантированного кожного лоскута на микроциркуляцию. Вестн. новых мед. технологий. 23(2): 72—78. 2016.

[6] Иванов А. Н., Норкин И. А., Нинель В. Г., Щаницын И. Н., Шутров И. Е., Пучиньян Д. М. Особенности изменений микроциркуляции при регенерации седалищного нерва в условиях эксперимента. Фундаментальные исследования. 4—2: 281—285. 2014.

[7] Иванов А. Н., Шутров И. Е., Нинель В. Г., Коршунова Г. А., Гладкова Е. В., Матвеева О. В., Мамонова И. А., Пучиньян Д. М., Федонников А. С., Норкин И. А. Влияние ауто-трансплантации кожного лоскута и прямой электростимуляции седалищного нерва на регенерацию нервных волокон. Цитология. 59(7): 489—497. 2017.

[8] Иванов А. Н., Шутров И. Е., Норкин И. А. Аутотрансплантация полнослойного кожного лоскута как способ биостимуляции микроциркуляции в условиях нормальной и нарушенной иннервации. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 14(3): 59—65. 2015.

[9] Киселева В. П., Крылов А. В., Старикова Э. А., Кузнецова С. А. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система. Успехи соврем. биологии. 129(4): 1—12. 2009.

[10] Крупаткин А. И. Информационные аспекты состояния микроциркуляции после десимпатизирующих операций при посттравматическом комплексном регионарном болевом синдроме. Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 1: 17—21. 2013.

[11] Миронов С. П., Крупаткин А. И., Голубев В. Г., Панов Д. Е. Диагностика и выбор тактики лечения при повреждениях периферических нервов. Вестн. травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2: 33—39. 2005.

[12] Монастырская Е. А., Лямина С. В., Мальшев И. Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. Патогенез. 6(4): 31—39. 2008.

[13] Ноздрин В. И., Белоусова Т. А., Альбанова В. И., Лаврик О. И. Гистофармакологические исследования кожи (наш опыт). М. 2006.

[14] Пасечникова Н. В., Мальцев Э. В., Сотникова Е. П., Мороз О. А. Препараты тканевой терапии. Ч. 2. Наиболее широко применяющиеся представители. Офтальмол. журн. 4 (441): 83—91. 2011.

[15] Хавинсон В. Х., Цветная Т. В. Регуляторные пептиды и гомеостаз. Рос. Хим. журн. (1): 115—116. 2005.

[16] Храпцова Ю. С., Артамян О. С., Юшков Б. Г., Волкова Ю. Л., Незговорова Н. Ю. Влияние тучных клеток на репаративную регенерацию тканей с разной степенью иммунологической привилегированности. Цитология. 58(5): 356—363. 2016.

[17] Щаницын И. Н., Иванов А. Н., Бажанов С. П., Нинель В. Г., Пучиньян Д. М., Норкин И. А. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы. Успехи физиол. наук. 48(3): 92—112. 2017.

[18] Bhatia M., Pereira M., Rana H., Stout B., Lewis C., Abramson S., Labazzo K., Ray C., Liu Q., Hofgartner W., Hariri R. The mechanism of cell interaction and response on decellularized human amniotic membrane: implications in wound healing. Wounds. 8: 207—217. 2007.

[19] Foster M., Shi H., Softic S., Kohli R., Seeley R. J., Woods S. C. Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity. Diabetologia. 54(11): 2890—2899. 2011.

[20] Gao Y., Weng C., Wang X. Changes in nerve microcirculation following peripheral nerve compression. Neural Regeneration Res. 11: 1041—1047. 2013.

[21] Guo L. B., Liu S., Zhang F., Mao G. S., Sun L. Z., Liu Y. The role of eosinophils in stroke: a pilot study. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 19(19): 3643—3648. 2015.

[22] Hocking S. L., Stewart R. L., Brandon A. E., Suryana E., Stuart E. Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice. Diabetologia. 58(7): 1587—1600. 2015.

[23] Ito T. K., Ishii G., Chiba H., Ochiai A. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene*. 26(51): 7194—7203. 2007.

[24] Kuo L., Hein T. W. Vasomotor regulation of coronary microcirculation by oxidative stress: role of arginase. *Front Immunol*. 19(4): 237. 2013.

[25] Park D., Kim Y., Kim H., Kim K., Lee Y. S. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . *Mol. Cells*. 33(6): 563—574. 2012.

[26] Schiavetta A., Maione C., Botti C. A Phase II Trial of autologous transplantation of bone marrow stem cells for critical limb ischemia: results of the Naples and Pietra Ligure Evaluation of Stem Cells study. *Stem Cells Transl. Med*. 1(7): 572—578. 2012.

[27] Silini A. R., Magatti M., Cargnoni A., Parolini O. Is Immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine? *Cell Transplant*. 26(4): 531—539. 2017.

Поступила 13.11.2017
После доработки 04.10.2018
Принята к публикации 19.11.2018