

СРАВНЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ КОЖИ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ НА МОДЕЛИ ФАЦИАЛЬНОЙ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОЖНО-МЫШЕЧНОГО ЛОСКУТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

S.A. Aksenova, G.R. Abzaleva, M.A. Volokh, A.M. Lila

COMPARISON OF IMMUNOGENICITY OF THE SKIN AND MUSCLE TISSUE ON MODEL FACIAL ALLOGRAFT MUSCULOCUTANEUS FLAP IN THE EXPERIMENT

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
г. Санкт-Петербург

Восстановление целостности кожных покровов лица путем различных методик кожной пластики не всегда удовлетворяет требованиям врача и пациента. В связи с этим аллотрансплантация фациальной области иногда является единственным выбором, который может дать более благоприятный результат. В статье описано экспериментальное исследование, в ходе которого проанализирован клинико-иммунологический статус крыс-реципиентов с фациальными аллотрансплантатами, содержащими различный объем кожи и мышечной ткани.

Ключевые слова: *фациальная аллотрансплантация, иммуносупрессивная терапия, кожно-мышечный лоскут.*

Restoring the integrity of the facial skin by a variety of skin plastic techniques do not always satisfy the requirements of a physician and a patient. In this regard, allograft facial area is sometimes the only option that can give a more complete result. This article describes an experimental research. Which analyses clinical and immunological status rats recipients with facial allografts containing different volume of the skin and muscle tissue.

Key words: *facial allotransplantation, immunosuppressive therapy, musculocutaneous flap.*

УДК 616.5:616.74]-089.43-74-092.9
doi 10.17223/1814147/58/04

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине трансплантация лица стала реальностью в конце XX в. Успех в этой области сопряжен с развитием пластической хирургии, трансплантологии, иммунологии. Однако для достижения большего успеха необходимо решать проблемы диагностики острого и хронического отторжения, а также определить максимальный объем кожи с минимальной иммуногенностью.

Как известно, в формировании иммунного ответа после внедрения в организм реципиента аллоантигенов эффекторную функцию выполняют иммунокомпетентные клетки. В случае аллотрансплантации сложного комплекса тканей, который используется для восстановления дефектов челюстно-лицевой области, трансплантат содержит различные типы клеток, составляющих кожу, подкожно-жировую клетчатку, мышцы, сухожилия, хрящи, кости, сосуды, нервы. Все вышеперечисленные ткани обладают

разной иммуногенностью, т.е. распознаются иммунной системой хозяина и в различной степени подвергаются отторжению.

В ходе данного эксперимента произведена попытка определить площадь иммунологически безопасного кожного лоскута в аллотрансплантате и предложить наиболее иммунологически выгодную модель аллотрансплантации кожи при восстановлении фациальной области в эксперименте.

Эксперимент выполнен в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Минздрава России № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики»). Исследование проведено в соответствии с протоколом, утвержденным этическим комитетом СЗГМУ им. И.И. Мечникова (г. Санкт-Петербург). Работа с экспериментальными животными выполнена сотрудниками, имеющими соответствующую подготовку и квалификацию. Хирургический этап проведен

в операционной кафедры топографической анатомии СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на крысах-самцах инбредной линии Wistar массой тела более 300 г, возраст животных составлял 4 мес. Животные получены из питомника Рапполово (г. Санкт-Петербург). Исследование проводилось с использованием крыс в качестве модельных животных ввиду доступности противокрысиных антител для распознавания поверхностных эпитопов иммунокомпетентных клеток реципиента.

Все исследуемые крысы были разделены на две группы. Первая группа ($n = 14$) была образована из особей с фациальным трансплантатом, составляющим 1/2 площади кожи головы и шеи животного с подлежащей мышечной тканью на сосудистой ножке (диаметр наружной сонной артерии равнялся 0,3 мм). Вторая группа ($n = 14$) была сформирована из крыс-реципиентов с фациальным трансплантатом, включающим кожу площадью, равной 1/4 головы и шеи с мышечной тканью, превышающей половину соответствующего объема у крыс 1-й группы. Сосудистая ножка у них также была представлена наружной сонной артерией диаметром 0,3 мм. Вес аллотрансплантатов в обеих группах составлял в среднем ($13,0 \pm 2,7$) г. Результаты динамики иммунологических изменений у крыс-реципиентов оценивались при сравнении показателей 1-й и 2-й групп исследования.

Анестезиологическое пособие. Выполнялась комбинированная анестезия с использованием препаратов «Домитор» (Orion pharma) в дозе 2 мг/100 г и «Кетамин» (ФГУП «Московский эндокринный завод») 3 мг/100 г подкожно. При заборе крови из бедренной вены использовался «Золетил 100» («Вирбак Санте Анималь») по 3 мг/100 г подкожно. Через 1 мин после введения анестезирующей смеси у животного наступала потеря координации, затем пропадал рефлекс переворачивания. К операции приступали через 5–10 мин после введения анестетика.

Протокол операции. После введения анестезирующей смеси и фиксации крысы произведена обработка кожи 0,5%-м раствором хлоргексидина с последующим забором фациальных кожно-мышечных лоскутов. При 24-кратном увеличении операционного поля под микроскопом Opton OM-2 (Zeiss Opton Microscope) с использованием пролена 9/0 выполнен артерио-артериальный анастомоз «конец в бок» между общей сонной артерией реципиента и наружной сонной артерией донора. Венозный

анастомоз выполнен «конец в конец». Послеоперационная рана обработана раствором антисептика (рис. 1). При необходимости проводилась неотложная терапия по восстановлению жизненных функций реципиента 0,9%-м NaCl подкожно в дозе 3 мл.



Рис. 1. Внешний вид крысы-реципиента сразу после аллотрансплантации

Иммуносупрессивная терапия. После фациальной кожно-мышечной аллотрансплантации крысам-реципиентам проводилась монотерапия циклоспорином (препарат «Сандимун Неорал», Novartis) перорально, по следующей схеме: 0–7-е сут послеоперационного периода в дозе 16 мг/кг массы животного, затем по 2 мг/кг массы животного в сутки. Выбор циклоспорина был обусловлен тем, что он представляет собой селективный иммуносупрессант, ингибирующий активацию Т-лимфоцитов и, на клеточном уровне, антиген-зависимое высвобождение лимфокинов, включая интерлейкин-2, подавляя развитие клеточных реакций в отношении аллотрансплантата. При этом действие циклоспорина на Т-лимфоциты специфичное и обратимое: в отличие от цитостатических препаратов он не подавляет гемопоэз и не влияет на функцию фагоцитов.

Общая продолжительность эксперимента составила 45 сут (рис. 2).



Рис. 2. Вид крысы-реципиента на 45-е сут после аллотрансплантации

Лабораторный этап исследования выполнен в медицинском центре ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (г. Санкт-Петербург). Исследование периферической крови выполнялось до операции, на 3, 15 и 45-е сут после хирургического вмешательства.

Анализ иммунного ответа проводился по результатам количественного определения субпопуляций Т-лимфоцитов, цитотоксических лимфоцитов, NK-, TNK-, N-активированных клеток, В-лимфоцитов, Т-активированных клеток в периферической крови на вышеуказанных временных отрезках. Субпопуляционный состав лимфоцитов определялся методом проточной цитометрии с помощью следующих реактивов: FITC anti-rat CD3 Antibody, PE anti-rat CD8a Antibody, PE/Cy7 anti-rat CD4 Antibody, AlexaFluor, anti-rat CD161 Antibody, FITC anti-rat CD3 Antibody, APC anti-rat CD45RA Antibody, FITC anti-rat CD3 Antibody, PE anti-rat CD25 Antibody, PE/Cy7 anti-rat CD4 Antibody, AlexaFluor 647 antimouse/rat/human FOXP3 Antibody, PE Mouse IgG1, κ Isotype CtrlAntibody, AlexaFluor 647 Mouse IgG1, κ IsotypeCtrl (ICFC) Antibody, реактив для премобилизации лейкоцитов IntraPrep, фиксирующий раствор IOTest 3, лизирующий раствор VERSALYSE, Anti-Pan-Cytokeratin (AE1/AE3) AlexaFluor 488 (производство: Biologend, Beckman Coulter, eBioscience, США).

Методы статистической обработки результатов исследования. Статистическая обработка данных проводилась с помощью

программы Excel для Windows XP. Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием параметрических и непараметрических критериев статистики. Для оценки количественных показателей в случае нормального распределения выборки (распределения Гаусса) использовался параметрический *t*-критерий Стьюдента. Для выявления взаимосвязей между рядами показателей был использован корреляционный анализ с линейным коэффициентом корреляции Пирсона. Все данные были приведены как среднее арифметическое, стандартное отклонение и ошибка среднего значения с 95% доверительным интервалом (статистически значимые различия принимали при уровне $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Время операции в эксперименте составило в среднем (305 ± 75) мин, из них время ишемии – (60 ± 19) мин, летальность – 0%.

Результаты проведенных лабораторных исследований свидетельствуют о том, что у крыс 1-й группы отмечалось более значимое повышение общего содержания Т-лимфоцитов на 3-и посттрансплантационные сутки преимущественно за счет Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов (принимающих участие в уничтожении ауто-, алло- и ксеногенных клеток) и Т-активированных клеток (содержат HLA-DR – антиген МНС класса II, участвующий в презентации потенциально чужеродных антигенов) (таблица).

Динамика иммунологических показателей у крыс-реципиентов групп исследования

| Показатель | До операции | | 3-и сут | | 15-е сут | | 45-е сут | |
|---|---------------|---------------|-------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|
| | 1-я группа | 2-я группа | 1-я группа | 2-я группа | 1-я группа | 2-я группа | 1-я группа | 2-я группа |
| Т-лимфоциты (CD3+) | 376,2 ± ± 2,5 | 412,7 ± ± 4,2 | 1958,0 ± ± 71,1* | 756,0 ± ± 178,0 | 878,0 ± ± 23,4 | 798,3 ± ± 216,0* | 1154,0 ± ± 214,3 | 964,1 ± ± 23,4* |
| Т-хелперы (CD4+) | 212,9 ± ± 4,0 | 198,5 ± ± 4,9 | 1522,0 ± ± 245,2* | 957,0 ± ± 189,4 | 934,6 ± ± 83,9 | 672,1 ± ± 81,2 | 976,0 ± ± 47,8* | 325,0 ± ± 76,2 |
| Цитотоксические лимфоциты | 96,3 ± ± 26,6 | 89,2 ± ± 32,5 | 921,0 ± ± 234,6* | 687,9 ± ± 56,3* | 372,2 ± ± 3,9 | 124,3 ± ± 53,0 | 578,2 ± ± 116,0* | 155,3 ± ± 29,4 |
| NK-клетки (CD3-/CD16+/CD56+) | 12,4 ± ± 7,2 | 15,1 ± ± 9,8 | 89,0 ± ± 27,0* | 56,2 ± ± 15,0 | 48,5 ± ± 21,1* | 46,3 ± ± 12,8 | 72,1 ± ± 15,4* | 32,9 ± ± 10,6 |
| TNK-клетки (CD3+/CD16+/CD56+) | 59,4 ± ± 22,7 | 48,6 ± ± 32,9 | 102,2 ± ± 32,7* | 564,9 ± ± 176,6* | 189,4 ± ± 32,8 | 260,0 ± ± 91,2 | 215,4 ± ± 27,7* | 266 ± ± 145,3 |
| N-активированные клетки | 17,6 ± ± 2,1 | 16,5 ± ± 4,7 | 276,4 ± ± 56,1* | 340,0 ± ± 190,0 | 291,6 ± ± 79,0 | 74,9 ± ± 9,4* | 176,0 ± ± 65,5 | 121 ± ± 16,4 |
| В-лимфоциты | 4,9 ± ± 3,2 | 5,6 ± ± 3,9 | 18,3 ± ± 0,3* | 12,9 ± ± 7,3 | 27,4 ± ± 4,9 | 18,3 ± ± 5,1 | 21,4 ± ± 3,2 | 13,4 ± ± 7,1* |
| Активированные Т-клетки (CD3 + HLA-DR+) | 1,7 ± ± 0,8 | 2,7 ± ± 0,3 | 18,6 ± ± 3,6 | 4,2 ± ± 0,5* | 9,3 ± ± 2,9* | 5,9 ± ± 1,3 | 10,3 ± ± 2,3* | 4,6 ± ± 1,2 |

* $p < 0,05$ – уровень статистической значимости различий, единица измерения – events.

У крыс 1-й группы наблюдалось более тяжелое течение послеоперационного периода, что проявлялось в отказе животных от приема пищи и воды, снижении их общей физической активности. У 35% крыс-реципиентов данной группы эпизоды острого отторжения проявлялись клинически краевой некротизацией кожи трансплантата и его цианозом, тромбозом венозного русла.

Активная реакция клеточного звена иммунитета у крыс 1-й группы может быть обусловлена более высокой иммуногенностью кожи по сравнению с мышечной тканью.

У животных 2-й группы была выявлена такая же закономерность изменений показателей иммунного ответа на аллоантигены, однако их выраженность была менее значимой. Содержание В-лимфоцитов у крыс обеих групп существенной динамики не претерпевало (см. таблицу). Посттрансплантационный период у крыс 2-й группы также протекал легче, периодов острого отторжения трансплантата не наблюдалось. Реципиенты были более активными, трансплантаты оставались жизнеспособными

(у 80% крыс при диагностическом надрезе на всю толщину трансплантата визуализировалась мышечная ткань с хорошим кровоснабжением).

Назначение адекватных доз циклоспорина А у крыс обеих групп способствовало снижению изучаемых иммунологических показателей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выполненная фациальная трансплантация на модели крыс может считаться технически удобной для сравнительного изучения иммуногенных свойств кожи и мышечной ткани в фациальном аллотрансплантате. Кожа, как известно, обладает более высокой иммуногенностью по сравнению с мышечной тканью, что требует проведения более агрессивной иммуносупрессивной терапии для предотвращения развития реакции «трансплантат против хозяина». Для более подробного изучения этих вопросов необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim Y.H., Wee Y.M., Choi M.Y., Lim D.G., Kim S.C. Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cell and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts // *Mol.* – 2011. – V. 17. – P. 697–708.
2. Kuo Y.R., Chen C.C., Goto S., Lee I.E. Modulation of immune response and T cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2011. – V. 128. – P. 661–672.
3. Li X.C., Turka L.A. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2010. – V. 6, № 10. – P. 577–583.
4. Murphy B.D., Zuker R.M., Borschel G.H. Vascularized composite allotransplantation: an update on medical and surgical progress and remaining challenge // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2013. – V. 66. – P. 1449–1455.
5. Pomahac B., Diaz-Siso J.R., Bueno E.M. Evolution of indications for facial transplantation // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* – 2011. – V. 64. – P. 1410–1416.
6. Siemionow M., Ozturk C., Craniofac J. Face transplantation: outcomes, concerns, controversies, and future directions // *Surg.* – 2012. – V. 23. – P. 254–259.
7. Siemionow M. Impact of reconstructive transplantation on the future of plastic and reconstructive surgery // *Clin. Plast. Surg.* – 2012. – V. 39. – P. 425–434.

REFERENCES

1. Kim Y.H., Wee Y.M., Choi M.Y., Lim D.G., Kim S.C. Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cell and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts. *Mol.*, 2011, vol. 17, pp. 697–708.
2. Kuo Y.R., Chen C.C., Goto S., Lee I.E. Modulation of immune response and T cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2011, vol. 128, pp. 661–672.
3. Li X.C., Turka L.A. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2010, vol. 6, no. 10, pp. 577–583.

4. Murphy B.D., Zuker R.M., Borschel G.H. Vascularized composite allotransplantation: an update on medical and surgical progress and remaining challenge. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2013, vol. 66, pp. 1449–1455.
5. Pomahac B., Diaz-Siso J.R., Bueno E.M. Evolution of indications for facial transplantation. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2011, vol. 64, pp. 1410–1416.
6. Siemionow M., Ozturk C., Craniofac J. Face transplantation: outcomes, concerns, controversies, and future idirections. *Surg.*, 2012, vol. 23, pp. 254–259.
7. Siemionow M. Impact of reconstructive transplantation on the future of plastic and reconstructive surgery. *Clin. Plast. Surg.*, 2012, vol. 39, pp. 425–434.

Поступила в редакцию 03.08.2016

Утверждена к печати 22.08.2016

Авторы:

Аксёнова Светлана Алексеевна – соискатель ученой степени канд. мед. наук кафедры пластической и реконструктивной хирургии СЗГМУ им. И.И. Мечникова (г. Санкт-Петербург).

Абзалева Гузель Ренатовна – ассистент кафедры пластической и реконструктивной хирургии СЗГМУ им. И.И. Мечникова (г. Санкт-Петербург).

Волох Мария Александровна – д-р мед. наук, зав. кафедрой пластической и реконструктивной хирургии СЗГМУ им. И.И. Мечникова (г. Санкт-Петербург).

Лилля Александр Михайлович – д-р мед. наук, профессор, проректор по учебной работе СЗГМУ им. И.И. Мечникова (г. Санкт-Петербург).

Контакты:

Аксёнова Светлана Алексеевна

тел.: +7-931-248-30-26

e-mail: svetlanaaksenova1987@yandex.ru