

© Н. А. Шудло, М. М. Шудло, Л. И. Сбродова, 2015
УДК 616.15:616.5-089-037:599.323.4

Н. А. Шудло, М. М. Шудло, Л. И. Сбродова

ВЗАИМОСВЯЗЬ ДООПЕРАЦИОННЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КАЧЕСТВА ПРИЖИВЛЕНИЯ ВАСКУЛЯРИЗОВАННЫХ КОЖНО-ФАСЦИАЛЬНЫХ ЛОСКУТОВ У КРЫС

Клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти (зав. — д-р мед. наук Н. А. Шудло), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, г. Курган

Целью работы было выявление взаимосвязи дооперационных морфологических показателей периферической крови и качества приживления васкуляризованных кожно-фасциальных лоскутов. У 10 крыс на основе поверхностной нижней эпигастральной артерии был сформирован лоскут площадью 18 см² и после 90-минутного периода ишемии реплантирован. С применением метода компьютерной планиметрии через 12 сут после операции было оценено качество его приживления. Сочетание близких к максимальным референтным значениям дооперационных показателей содержания лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов и эозинофилов, а также реактивных лимфоцитов увеличивает вероятность эпидермолизиса.

Ключевые слова: *васкуляризованный лоскут, приживление, периферическая кровь, крысы*

В лечении дефектов покровных тканей при повреждениях мирного и военного времени, а также последствиях онкологических резекций существенная роль принадлежит пластике васкуляризованными полнослойными кожно-фасциальными лоскутами с осевым кровоснабжением. Развитие микрохирургической техники обеспечивает их успешное приживление в 93–98% случаев [8]. Характерными осложнениями являются частичные некрозы, поверхностный эпидермолизис, венозная недостаточность [10], которые наносят психологическую травму пациентам и увеличивают затраты на лечение. Основная причина таких состояний — реперфузионное повреждение предварительно ишемизированных тканей, которое включает оксидативный стресс, нарушение эндотелиального барьера, накопление медиаторов воспаления и протеолитических ферментов, что в итоге приводит к некротической гибели клеток. В реализации молекулярных механизмов процесса изучена роль циркулирующих лейкоцитов, тромбоцитов и Т-лимфоцитов [15]. Сведений о влиянии их количества в периферической крови в дооперационный период на выраженность синдрома ишемии — реперфузии после реваскуляризации в литературе не найдено, хотя известно, что снижение гематокрита повышает вероятность приживления ишемизированных кожно-фасциальных лоскутов [7].

Цель данного исследования — выявление взаимосвязи дооперационных морфологических показателей периферической крови и качества приживления васкуляризованных лоскутов на стандартизированной биологической модели.

Материал и методы. Исследование выполнено согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными. Работа включала 2 этапа. На 1-м этапе для получения референтных значений показателей периферической крови у интактных половорелых крыс-самцов (n=30) линии Вистар (масса 460–560 г, возраст 1 год) брали кровь из хвостовой вены в условиях операционной под общей анестезией, которая достигалась внутримышечным введением гидрохлорида ксилазина (0,8 мг/100 г) и тилетамина/золазепам (0,4 мг/100 г). Необходимость этого этапа обусловлена вариабельностью лейкоцитарной формулы крови в зависимости не только от линии и возраста животных, но и от условий содержания [5] и пищевого рациона [6].

На 2-м этапе у 10 крыс сразу после взятия крови была проведена операция формирования и репозиции васкуляризованного кожно-фасциально-жирового лоскута на основе поверхностной нижней эпигастральной артерии (ПНЭА). Для его выкраивания использовали анатомические ориентиры: верхняя граница — вдоль нижнего края рёберной дуги, нижняя — равная ей параллельная линия на уровне гребня подвздошной кости, медиальная — параллельно средней линии живота, отступив от неё 0,5 см, латеральная — параллельно медиальной. Размеры лоскута составляли 6×3 см. Разрез кожи проводили до апоневроза, лоскут включал кожу, под-

Сведения об авторах:

Шудло Наталья Анатольевна (e-mail: nshchudlo@mail.ru), *Шудло Михаил Моисеевич* (e-mail: m.m.sch@mail.ru), *Сбродова Людмила Ивановна*, клинико-экспериментальная лаборатория реконструктивно-восстановительной микрохирургии и хирургии кисти, Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова, 640014, г. Курган, ул. М. Ульяновой, 6

кожную основу и поверхностную фасцию, а в паховой области — предбрюшинную жировую ткань и поверхностный нижний эпигастральный сосудистый пучок. Все перфораторы и латеральные ветви ПНЭА пересекали и коагулировали, что давало возможность поднять лоскут. После выделения места отхождения ПНЭА от бедренной артерии на артерию накладывали клипсу, что прекращало кровоток в лоскуте. Через 90 мин клипсу снимали, осуществляя восстановление кровотока, а лоскут реплантировали *in situ*, подшивая его нитями 5/0. Через 12 сут после операции животных выводили из опыта путем передозировки тиопентал-натрия.

Для анализа состояния лоскута получали его полноцветные цифровые изображения с помощью камеры Sony Cyber-shot DSC-HX100V (Sony, Япония) в режиме макросъемки, переносили в память компьютера и сохраняли с расширением .jpg без сжатия. Наружную поверхность лоскута фотографировали дважды — после операции и эвтаназии, а внутреннюю — после эвтаназии. Рядом с объектом съемки помещали эталон длины для линейной калибровки изображения по общепринятым принципам. Используя электронную версию оригинальной тестовой решетки [4], в графическом редакторе PhotoFiltre методом планиметрии с точечным счетом в изображении наружной поверхности лоскута определяли долю дефектов эпидермиса на площади лоскута. Аналогичным методом на изображении внутренней поверхности лоскута высчитывали доли сосудистых структур и экстравазаций.

Применяли общепринятые унифицированные методики анализа жидкой периферической крови и микроскопии сухих фиксированных и окрашенных по Романовскому—Гимзе мазков с дифференцированием лейкоцитов. Кроме того, с помощью аппаратно-программного комплекса (световой исследовательский микроскоп МИКМЕД-5 — ЛОМО, Россия, соединенный с цифровой камерой Webbers с объективом MYScore 500 M и персональным компьютером) получали цифровые изображения 100 полей зрения (инструментальное увеличение 2025), содержащих лимфоциты. Подсчитывали их количество и представительство типичных и атипичных лимфоцитов, а также реактивных светлых больших лимфоцитов, идентифицируемых по принятым гематологическим критериям [1, 12]. Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием критериев Манна—Уитни и Барнарда, значения которых получали, используя программу Attestat [2].

Результаты исследования. В ближайшие полчаса после операции цианоз краниальной части лоскута наблюдался у двух животных, в период от 3 до 5 сут — у четырех. Начиная с 6–7-х суток, у всех животных происходила эпителизация линии швов, в некоторых её участках формировались экскориаии. К 7-м суткам в эпигастральной

части лоскута у 3 животных из 10 появлялись участки эпидермолизиса. На основании характера и суммарной величины дефектов эпидермиса животные были подразделены на 2 группы. В 1-й группе (n=7) были обнаружены только экскориаии, составившие от 0,3 до 6% площади лоскута, во 2-й группе (n=3) — экскориаии и эпидермолизис, занимавшие суммарно от 8 до 60% площади лоскута. Эта группа характеризовалась также и более выраженными экстравазациями (P<0,05), но незначимо лучшей васкуляризацией лоскута (P>0,05) (табл. 1).

Ретроспективный анализ морфологических показателей периферической крови, взятой до операции, показал, что параметры у животных обеих групп находились в диапазоне референтных значений (табл. 2, 3), однако средние показатели содержания лейкоцитов и тромбоцитов были больше во 2-й группе на 21,4 и 11,5% соответственно (P=0,05). Сочетание высоких значений содержания лейкоцитов и тромбоцитов не встретилось ни у одного из 7 животных 1-й группы, но наблюдалось у всех животных 2-й группы. Проверка гипотезы о различии частоты сцепления этих признаков по критерию Барнарда даёт P=0. Во 2-й группе отсутствовали базофилы, а среднее содержание нейтрофилов и эозинофилов (см. табл. 3) было больше, чем в 1-й группе на 79,4 (P=0,05) и 204,5% (P<0,05) соответственно,

Таблица 1

Характеристика кожно-фасциально-жирового лоскута у крыс через 12 сут после операции ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Исследованный параметр	Группа крыс	
	1-я	2-я
Доля дефекта эпидермиса от площади лоскута	1,5±0,9	39±13**
Доля сосудистых структур на площади внутренней поверхности лоскута	19±3	15±5
Доля экстравазаций	18±5	47,3±2,0*

Здесь и в табл. 2 и 3: * различия по сравнению с показателями в 1-й группе значимы при P=0,05; ** при P<0,05.

Таблица 2

Основные гематологические показатели у крыс до и после операции

Исследованный параметр	Референтные значения		Группа крыс			
			1-я		2-я	
	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	6,48–8,52	7,27±0,12	6,7–8,52	7,30±0,24	6,55–7,78	7,2±0,5
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,8–13,9	10,2±0,4	7,6–13,7	9,7±0,7	11,4–13,9	12,4±1,0*
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	515–660	581±13	530–650	564±16	640–660	648±8*

Таблица 3

Лейкоцитарная формула у крыс до и после операции (абсолютное количество, $\times 10^9/\text{л}$)

Клетки крови	Референтные значения		Группа крыс			
			1-я		2-я	
	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	Min-max	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
Нейтрофилы	1,14–5,98	2,7 \pm 0,4	1,14–5,34	2,3 \pm 0,5	2,96–5,98	4,2 \pm 1,2*
Моноциты	0,59–1,78	1,14 \pm 0,11	0,59–1,78	0,99 \pm 0,15	0,96–1,53	1,320 \pm 0,020
Лимфоциты	4,49–7,49	6,12 \pm 0,25	5,04–7,49	6,1 \pm 0,3	5,56–6,96	6,26 \pm 0,29
Эозинофилы	0–0,83	0,29 \pm 0,06	0–0,41	0,22 \pm 0,05	0,48–0,83	0,67 \pm 0,08**
Базофилы	0–0,23	0,020 \pm 0,020	0–0,23	0,03 \pm 0,03	0	0

различия в содержании моноцитов и лимфоцитов были незначимы.

При анализе агранулоцитов (*рисунок*) установлено, что доля светлых реактивных лимфоцитов в 1-й группе варьировала от 5,8 до 23,8%, а во 2-й группе — от 23,9 до 41% ($P < 0,05$). Большинство этих клеток имели отростчато-лопастную форму и охватывали эритроциты (см. *рисунок*, д–ж). Во 2-й группе чаще встречались аналогично взаимодействующие с эритроцитами реактивные моноциты (см. *рисунок*, з). Среди атипичных лимфоцитов (см. *рисунок*, и) 1-й группы преобладали многоядерные, а для 2-й группы животных были более характерны дегенеративно-измененные вытянутые формы.

Через 12 сут после операции у всех крыс встречались многоядерные реактивные лимфоциты. В 1-й группе гематологические показатели приближались к норме, а во 2-й группе отмечены умеренные нейтрофилия и лимфопения, содержание реактивных лимфоцитов было значимо больше, чем в 1-й группе ($P < 0,05$).

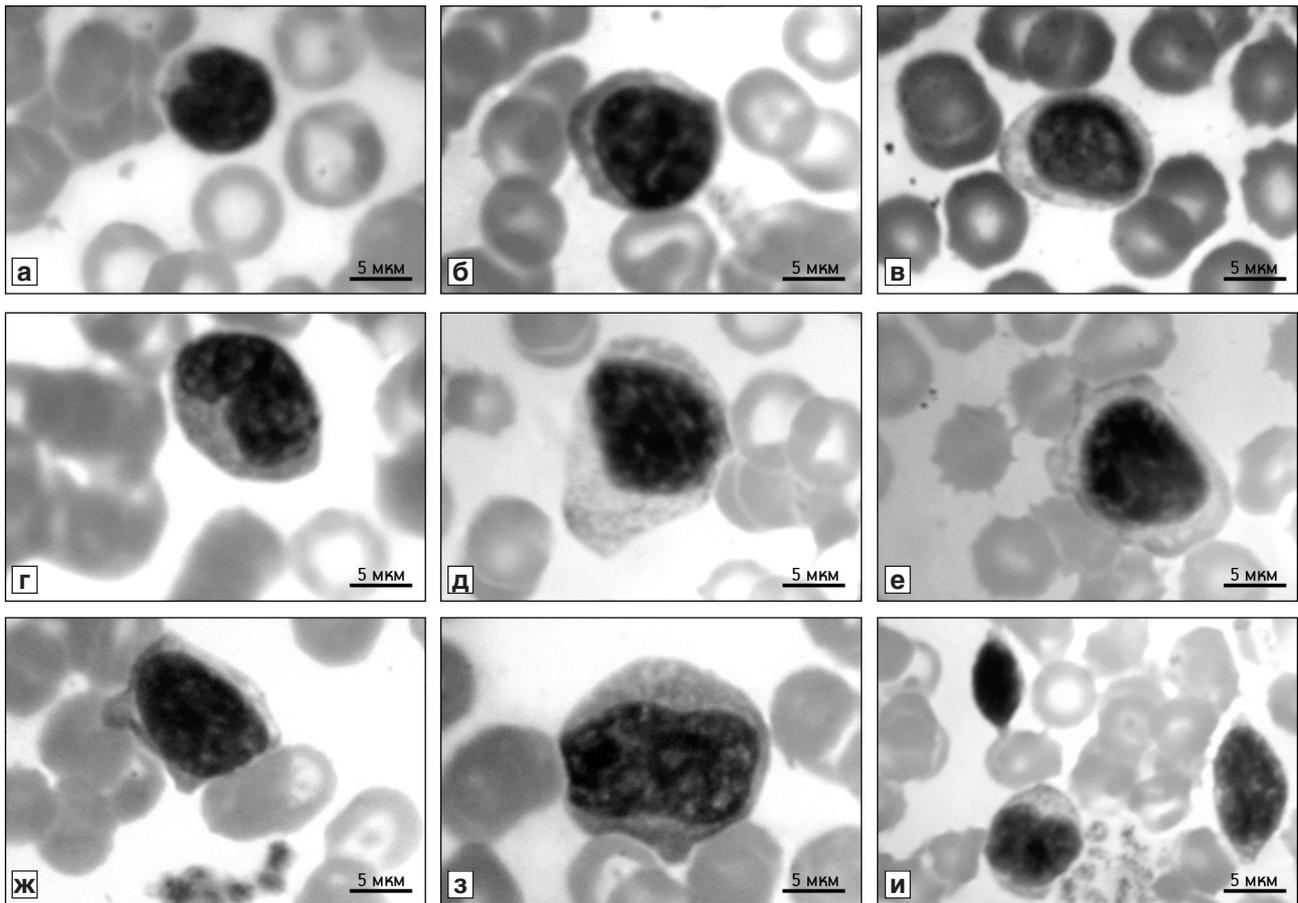
Обсуждение полученных данных. Различные варианты пересадки или репозиции *in situ* лоскутов с осевым кровоснабжением на основе ПНЭА крыс широко применяются в исследованиях патогенеза синдрома ишемии—реперфузии и разработке методов его профилактики и лечения. Наиболее близкий аналог использованной нами экспериментальной модели [13] предусматривает 8-часовую ишемию. Мы учли, что при плановых пересадках и транспозициях васкуляризованных лоскутов в клинике период выключения кровотока обычно не превышает 90 мин [14]. Возраст животных выбран на основании данных о периодизации жизни крыс относительно возрастных периодов человека [16] с учётом того, что в большинстве клинических исследований средний возраст пациентов с дефектами покровных тканей превышает 30 лет.

Как показали результаты, в обозначенных условиях у половозрелых крыс линии Вистар в 7 случаях из 10 достигнуто полное приживание

лоскута, а у 3 в области его проксимальной половины наблюдался эпидермолизис.

Для оценки состояния кожно-фасциального лоскута применяли компьютерный анализ его цифровых изображений, который в последние годы используется в качестве основного, а в некоторых публикациях — единственного метода оценки [11], что свидетельствует об оптимальном соотношении его затратности и информативности. Применение в нашем исследовании режима макросъёмки как наружной, так и внутренней поверхности лоскута позволило объективизировать оценку приживания и васкуляризации лоскута, в том числе выраженность его реперфузионного повреждения.

Нами впервые получены данные о взаимосвязи качества приживания васкуляризованного лоскута с дооперационными показателями содержания лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и реактивных лимфоцитов в периферической крови. Они согласуются с известными представлениями о роли этих клеток в патогенезе синдрома ишемии—реперфузии. В частности, сочетание высоких показателей содержания тромбоцитов и лейкоцитов, характерное для животных с худшими параметрами приживания, согласуется с данными о том, что аккумуляция тромбоцитов в постишемических венах зависит от адгезии лейкоцитов (главным образом нейтрофилов) к эндотелию, и наоборот, адгезия лейкоцитов к эндотелию после ишемии—реперфузии требует присутствия тромбоцитарного Р-селектина [15]. Наряду с нейтрофилами, во вторичных постишемических повреждениях тканей существенную роль играют эозинофилы. Об этом свидетельствует их быстрое накопление в предварительно ишемизированных тканях у экспериментальных животных [9] и человека [3]. Вопрос о роли реактивных агранулоцитов требует дополнительных исследований. Известна роль Т-лимфоцитов в нарушении эндотелиального барьера [15]. Нами установлено, что для животных с отчетливо выраженными признаками репер-



Агранулоциты в мазках периферической крови у крыс.

а—в — типичные лимфоциты; г — моноцит, д—ж — реактивные лимфоциты; з — реактивный моноцит; и — атипичные лимфоциты.
Окраска по Романовскому—Гимзе

фузионных повреждений лоскута было характерно высокое содержание реактивных светлых лимфоцитов и моноцитов, охватывающих эритроциты. Весьма вероятно, что такие взаимодействия циркулирующих клеток затрудняют капиллярный кровоток и сказываются неблагоприятно на репарации ишемизированных тканей.

Сочетание высоких, хотя и не выходящих за пределы физиологической нормы, значений числа лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов и эозинофилов с повышенным содержанием реактивных больших светлых лимфоцитов в периферической крови до операции повышает вероятность дефектов приживления васкуляризованных кожно-фасциально-жировых лоскутов у крыс. Полученные результаты дают основание исследования дооперационных показателей периферической крови для решения вопросов прогностической значимости у человека при плановых операциях по пересадке и транспозиции лоскутов.

Работа поддержана программой Минздрава РФ в рамках государственного задания ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А.Илизарова» для выполнения НИР на 2015–2017 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов М.Г. Гематологический атлас. М.: Медицина, 1985.
2. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. СПб.: Питер, 2001.
3. Шихалева Н.Г., Щудло Н.А., Щудло М.М., Борисова И.В. Гистологические изменения сосудов и предпосылки феномена «no-reflow» при повреждениях кисти и предплечья циркулярной пилой // Бюл. Восточно-Сибирск. науч. центра СО РАМН. 2011. № 4, ч. 1. С. 206–209.
4. Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А. Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии // Изв. Челябинск. НЦ (УРО РАН). 2004. Вып. 25. С. 17–22.
5. Узенбаева Л.Б., Виноградова И.А., Голубева А.Г. и др. Возрастные изменения лейкоцитарной формулы и морфометрических параметров больших гранулярных лимфоцитов крови крыс при различных режимах освещения // Успехи геронтол. 2006. Вып. 19. С. 79–84.
6. Brevard P.B. Beta-Carotene increases monocyte numbers in peripheral rat blood // Int. J. Vitam. Res. 1994. Vol. 64, № 1. P. 21–25.
7. Desyatnikova S., Winslow C., Cohen J.I., Wax M.K. Effect of Anemia on the Fasciocutaneous Flap Survival in a Rat Model // The Laryngoscope. 2001. Vol. 111, I. 4. P. 572–575.

8. Davison S.P., Clemens M.W., Kochuba A.L. Anatomy of Free Flap Failures: Dissection of a Series // *Sci. Res.* 2013. Vol. 3, № 3. P. 89–95.
9. Gormus Z.I., Ergene N., Toy H. et al. Preventive role of magnesium on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury-an experimental study // *Biol. Trace Elem. Res.* 2009. Vol. 127, № 2. P. 183–189.
10. Hassanpour S.E., Mohammadkhah N., Arasteh E. Is it safe to extract the reverse sural artery flap from the proximal third of the leg? // *Arch. Iran Med.* 2008 Vol. 11, № 2. P. 179–185.
11. Krammer C.V., Ibrahim R.M., Hansen T.G., Sorensen J.A. The effect of epinephrine and dobutamine on skin flap viability in rats: a randomized double-blind placebo-controlled study // *Plast. Reconstr. Surg.* 2015. Vol. 68, № 1. P. 113–119.
12. Levy R.A., Johari V.P., Pantanowitz L. *Non-Neoplastic Disorders of White Blood Cells // Non-Neoplastic Hematopathology and Infections.* Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
13. Moura T.D., Marques A.A., Bernal S.O. et al. Study of the effect of streptokinase and allopurinol in island skin flaps submitted to prolonged ischemia: experimental study in rats // *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2009. Vol. 55, № 5. P. 601–605.
14. Pereira C.M., Figueiredo M.E., Carvalho R. et al. Anesthesia and surgical microvascular flaps // *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2012. Vol. 62, № 4. P. 563–579.
15. Rodrigues S.F., Granger D.N. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure // *Cardiovasc. Res.* 2010. Vol. 87. P. 291–299.
16. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's // *Int J. Prev. Med.* 2013. Vol. 4, № 6. P. 624–630.

Поступила в редакцию 15.05.2015

INTERRELATION BETWEEN THE PREOPERATIVE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL BLOOD AND THE QUALITY OF ENGRAFTMENT OF VASCULARIZED ADIPO-FASCIO-CUTANEOUS FLAPS IN RATS

N.A.Shchudlo, M.M.Shchudlo, L.I.Sbrodova

The aim of this work was to determine the interrelation between the preoperative blood counts and the quality of vascularized adipo-fascio-cutaneous flap survival. In 10 adult male Wistar rats, a flap with the area of 18 cm² was formed on the basis of superficial inferior epigastric artery; after a 90 min ischemic period it was replanted. 12 days after operation the quality of flap survival was assessed with computer-assisted planimetry. It was found that the combination of preoperative leukocyte, thrombocyte, neutrophil and eosinophil counts as well as reactive lymphocyte counts close to the maximal reference values increased the probability of epidermolysis.

Key words: *vascularized flap, engraftment, peripheral blood, rats*

Clinical and Experimental Laboratory of Reconstructive Microsurgery and Hand Surgery, G.A. Ilizarov Russian Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics», Kurgan