

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ ДИСТАНТНОГО СТИМУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КОЖНОГО ЛОСКУТА НА ПЕРФУЗИЮ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНЫХ И СИСТЕМНЫХ НАРУШЕНИЙ

А.Н. Иванов, Д.Д. Лагутина, Т.В. Степанова

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Минздрава России, Саратов, Российская Федерация

Цель настоящего исследования – изучение особенностей механизмов реализации дистантного стимулирующего действия аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута (АТПКЛ) на перфузию микроциркуляторного русла при локальных и системных микроциркуляторных нарушениях. **Материалы и методы.** Эксперимент проведен на 87 белых крысах-самцах, разделенных на 5 групп: 1) контрольная; 2) животные с локальными нарушениями микроциркуляции, вызванными перерезкой и нейрорафией седалищного нерва; 3) животные с системными нарушениями микроциркуляции, вызванными аллоксановым диабетом; 4) животные, которым вместе с нейрорафией проведена АТПКЛ; 5) животные, которым на фоне аллоксанового диабета проведена АТПКЛ. Микроциркуляцию кожи тыльной поверхности стопы исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). В крови животных определяли содержание вазоактивных веществ, включая катехоламины (КА), гистамин и васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF). Проводили морфологическое исследование тканей области аутотрансплантации на 42-е сутки эксперимента. **Результаты.** АТПКЛ на 42-е сутки эксперимента приводит к нормализации перфузии при локальных и системных нарушениях микроциркуляции. АТПКЛ при повреждении нерва, и в большей степени при аллоксановом диабете, приводит к снижению уровня КА. Под влиянием АТПКЛ концентрация гистамина в крови более выражено увеличивалась у животных с травмой нерва. У животных с травмой нерва АТПКЛ увеличивала содержание VEGF в крови, чего не отмечалось у крыс с аллоксановым диабетом. Морфология зоны аутотрансплантации характеризовалась дегенеративными изменениями эпидермиса и дермы аутотрансплантата вне зависимости от модели микроциркуляторных нарушений. Зона аутотрансплантата инфильтрируется эозинофилами более выражено при травме нерва, чем у крыс с аллоксановым диабетом. **Заключение.** АТПКЛ оказывает дистантное стимулирующее действие на микроциркуляцию, которое проявляется в одинаковом объеме в условиях как локальных, так и системных нарушений микрокровотока. Механизм реализации дистантного стимулирующего действия АТПКЛ на микроциркуляцию многокомпонентный и включает комплекс регуляторных реакций, степень выраженности которых неодинакова в условиях локальных и системных нарушений микрокровотока.

Ключевые слова: аутотрансплантация, микроциркуляция, регенерация, кожный лоскут.

Для корреспонденции: Иванов Алексей Николаевич. Адрес: 410054, Саратов, ул. Большая Садовая, д. 137, корп. 5.
Тел. (927) 279-95-99. E-mail: lex558452@gmail.com

Corresponding author: Alexey Ivanov. Address: 137/5, Bolshaya Sadovaya str., Saratov, 410054, Russian Federation.
Phone: (927) 279-95-99. E-mail: lex558452@gmail.com

CHARACTERISTICS OF MECHANISMS OF THE DISTANT STIMULATING EFFECT OF SKIN FLAP AUTOGRAFT ON MICROVASCULAR PERFUSION IN LOCAL AND SYSTEMIC MICROCIRCULATION DISORDERS

A.N. Ivanov, D.D. Lagutina, T.V. Stepanova

Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation

Objective: to study the characteristics of mechanisms of the distant stimulating effect of full-thickness skin autograft (FTSG) on microvascular perfusion in local and systemic microcirculation disorders. **Materials and methods.** The experiment was carried out on 87 white male rats, divided into 5 groups: 1) control; 2) animals with local microcirculation disorders induced by sciatic nerve transection and neurography; 3) animals with systemic microcirculation disorders caused by alloxan-induced diabetes; 4) animals that underwent FTSG after sciatic nerve transection and neurography; 5) animals that underwent FTSG in alloxan-induced diabetes. Laser Doppler flowmetry (LDF) was used to study microcirculation of the dorsal skin of the rear paw. Serum concentrations of vasoactive substances, including catecholamines (CA), histamine, and vasoendothelial growth factor (VEGF) in the experimental animals were measured. A morphological study of the tissues of the autograft site was carried out on day 42 of the experiment. **Results.** On day 42 of the experiment, FTSG normalized perfusion in local and systemic microcirculation disorders. FTSG decreases CA level in nerve injury, and to a greater extent in alloxan-induced diabetes. Serum histamine increase under FTSG was more pronounced in rats with nerve injury. Serum VEGF in rats with nerve injury and FTSG increased, which was not observed in alloxan-induced diabetes. Histological assay of the autograft site revealed degenerative changes in the epidermis and dermis of the autotransplant in both experimental models of microcirculatory disorders. Eosinophilic infiltration of the autograft site was more pronounced in nerve injury than in alloxan-induced diabetes. **Conclusion.** FTSG has a distant stimulating effect on microcirculation, which manifests itself in the same degree in both local and systemic microcirculation disorders. The distant stimulating effect of FTSG on microcirculation is multicomponent in nature and includes a set of regulatory reactions, whose severity differs in local and systemic microcirculatory disorders.

Keywords: autograft, microcirculation, regeneration, skin flap.

ВВЕДЕНИЕ

Физиологической основой поддержания гомеостаза в тканях и органах живых организмов является транскпиллярный обмен в микроциркуляторном русле, при этом нормальное функционирование микроциркуляции связано с метаболической активностью клеток [1]. Кроме того, нарушения микрокровотока являются основным звеном в патогенезе различных патологических процессов, а также играют важную роль в процессе саногенеза, обеспечивая трофическую поддержку репаративных процессов [2]. Системные и местные метаболические нарушения оказывают влияние на состояние микроциркуляторного русла, что ведет к еще большему усугублению дисметаболизма в органах и тканях [3, 4]. В условиях нормы и патологии собственные клетки и ткани организма способны влиять на состояние микроциркуляции за счет синтеза и выделения биологически активных веществ, регулирующих микроциркуляцию на местном и системном уровнях [5].

Современный уровень развития научных знаний определяет процесс регенерации тканей и органов организма как сложный комплекс взаимосвязанных последовательных местных и общих реакций

организма, которые протекают с участием многих регуляторных систем с разным уровнем организации [6]. При этом следует отметить, что у разных клеток и тканей организма регенераторный потенциал и интенсивность продукции биологически активных веществ, стимулирующих репаративные процессы, различны. Так, некоторыми исследователями было продемонстрировано ускорение процессов регенерации под влиянием препаратов на основе плаценты [7, 8]. Несмотря на эффективность применения аллотканей, включая ткани фетоплацентарного комплекса, в регенеративной медицине, их использование связано с риском развития инфекционных и иммунных осложнений. Поэтому более перспективным методом стимуляции регенераторных процессов является использование аутоклеток, в частности кожи. Показано, что жировая ткань подкожной клетчатки богата биологически активными веществами, которые обеспечивают высокий регенераторный потенциал [9]. Было экспериментально показано, что аутоотрансплантация жировой ткани стимулирует микрокровооток, а также положительно влияет на системные изменения метаболических процессов [10, 11]. Кроме того, в состав клеточных популяций кожи входят лейкоцитарные клетки, кото-

рые продуцируют различные биологически активные вещества [12].

Ранее было продемонстрировано, что аутоотрансплантация полнослойного кожного лоскута (АТПКЛ) в межлопаточную область обладает дистантным стимулирующим эффектом на микроциркуляцию в коже тыльной поверхности стопы у интактных белых крыс, у животных при повреждении седалищного нерва, а также в условиях экспериментального аллоксанового диабета [13, 14]. Было показано, что механизм действия АТПКЛ многокомпонентный и включает в себя комплекс изменений гистологии зоны аутоотрансплантации, концентраций вазоактивных веществ в крови, механизмов модуляции микрокровотока [13, 14]. Вместе с тем в предыдущих исследованиях не учитывалась зависимость биостимулирующего эффекта АТПКЛ от распространенности поражения микроциркуляторного русла, в частности, не установлены различия в степени реализации эффекта при локальном и системном поражении сосудистого русла, что критически важно для определения ограничений применения данного метода при системных нарушениях микроциркуляции. Кроме того, в настоящее время отсутствуют данные о влиянии этиологии поражения сосудистой системы на реализацию данного эффекта, которые могут способствовать выявлению дополнительных ограничений для практического применения метода, так как в ряде случаев изменение метаболических процессов, обуславливающих нарушение микроциркуляции, может количественно и качественно изменять характер регуляторных реакций при АТПКЛ, включая модуляцию воспалительной реакции, вазомоторную активность и другие. Как указывалось выше, механизм дистантного стимулирующего действия АТПКЛ сложен и включает в себя множество регуляторных реакций, взаимодействия и иерархия которых остаются невыясненными. В частности, имеющиеся данные не позволяют однозначно судить о том, какие регуляторные реакции имеют триггерное значение, а какие вторичны, не ясно, какие из них универсальны, а какие строго специфичны для определенного способа моделирования нарушений микроциркуляции. В этой связи научную и практическую значимость представляет выявление зависимости особенностей комплекса регуляторных реакций при биостимуляции собственными тканями организма от характера и распространенности поражения микроциркуляторного русла, что и определило направление настоящего исследования, целью которого являлось изучение особенностей реализации дистантного стимулирующего действия АТПКЛ на перфузию микроциркуляторного русла кожи при локальных и системных нарушениях микрокровотока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на 87 белых нелинейных крысах. Эксперимент проводился в соответствии с рекомендациями этического комитета Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского (протокол № 1 от 05.02.2019 года). Все манипуляции выполнялись под общей анестезией внутримышечным введением ксилазина («Interchemie», Нидерланды) в дозе 1 мг/кг и золептила («VirbacSanteAnimale», Франция) в дозе 0,1 мл/кг. В процессе эксперимента было сформировано 5 групп животных: 1-я группа – контрольная, которая включала в себя 10 интактных крыс; 2-я группа – сравнительная, состоящая из 27 крыс с локальными нарушениями микроциркуляции, вызванными перерезкой и нейрорафией седалищного нерва; 3-я группа – сравнительная – из 20 крыс с системными нарушениями микроциркуляции, вызванными аллоксановым сахарным диабетом; 4-я группа – опытная, включала 20 крыс, которым проводили АТПКЛ в межлопаточную область одновременно с нейрорафией седалищного нерва; 5-я группа – опытная – из 10 крыс, которым на 21-е сутки после введения аллоксана выполняли АТПКЛ.

В качестве модели локальных нарушений микроциркуляции использовали денервационную гиперчувствительность, которая возникает и развивается при перерезке и отсроченной нейрорафии седалищного нерва и сопровождается спазмом сосудов микроциркуляторного русла и ухудшением состояния микрокровотока [15]. Пересечение седалищного нерва выполнялась на уровне средней трети бедра. Нейрорафия осуществлялась через 21 сутки после перерезки нерва путем наложения эпинеуральных швов с применением атравматических игл и шовного материала 7/0 USP.

Системные нарушения микроциркуляции моделировали путем развития у животных сахарного диабета, вызванного аллоксаном, который оказывает прямое β -цитотоксическое действие на островковый аппарат поджелудочной железы и вызывает абсолютную недостаточность инсулина, характерную для сахарного диабета 1-го типа [16]. Аллоксан в дозе 100 мг/кг веса животного вводили подкожно однократно. Развитие сахарного диабета верифицировано статистически значимым ($p < 0,05$) повышением уровня гликированного гемоглобина в 1,7 раза по сравнению с интактными животными до 9,3 (6,9; 12,1) %.

АТПКЛ у животных опытных групп осуществляли на 21-е сутки от начала эксперимента (перерезки седалищного нерва или введения аллоксана соответственно). Полнослойный кожный лоскут размером 0,1% от площади поверхности тела животного иссекался в межлопаточной области, обрабатывали

поочередно в перекиси водорода 3%, этиловом спирте 70% и физиологическом растворе 0,9%. В ране, образовавшейся при иссечении лоскута, формировали подкожный карман, в который помещали обработанный аутооттрансплантат. Операционная рана ушивалась наглухо [17].

Микрокровоток кожи тыльной поверхности стопы исследовали с помощью «ЛАКК-ОП» (НПП «Лазма», Россия) на 42-е сутки эксперимента у животных сравнительных и опытных групп. В качестве контроля были использованы ЛДФ-граммы интактных животных. Состояние микроциркуляции оценивали по величине показателя перфузии в перфузионных единицах.

Забор крови у животных осуществляли на 42-е сутки эксперимента пункцией правых отделов сердца с использованием пробирок «VACUETTE» (Greiner Bio-One, Австрия) с активатором свертывания и разделительным полиэфирным гелем для получения сыворотки, а также с 3,2% цитратом натрия для получения плазмы и изготовления мазков.

Уровень катехоламинов (КА) в крови в качестве основных вазоконстрикторных веществ определяли микроскопией с помощью микровизора μ -Vizo 101 (ЛОМО, Россия) мазков, окрашенных цитохимическим методом по А.И. Мардарь и Д.П. Кладиенко (1986) нитратом серебра и эозином с предварительной экспозицией в растворе бихромата калия для получения адrenoхромов сорбированных на эритроцитах. Уровень КА в крови выражали в условных единицах, определяемых как количество адсорбированных на 100 эритроцитах мазка гранул импрегнированных серебром адrenoхромов.

Определение концентрации в крови вазодилаторных веществ, включая гистамин и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), выполняли иммуноферментным анализом с использованием полуавтоматических ридеров StatFax4200 (Awareness Technology, США) и Epoch (BioTek Instruments, США), а также реагентов VEGF Rat (RnD Systems, США) и Histamine-ELISA (IBL International, Германия).

Животные выводились из эксперимента передозировкой препаратов для наркоза непосредственно после забора крови. Ткани зоны АТПКЛ забирались и фиксировались в 10% формалине для гистологического исследования. В качестве контроля использовали образцы кожи интактных животных. Гистологические срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином Майера (ООО «Биовитрум», Россия) и эозином (ООО «Биовитрум», Россия). Микроскопию препаратов зоны АТПКЛ выполняли с помощью системы AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Количественный подсчет клеточных популяций дермы аутооттрансплантата выполнялся при увеличении объектива $\times 40$.

Статистическую обработку выполняли средствами пакета программ Statistica 10.0. Большинство полученных данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Сравнение между группами проводилось с расчетом U-критерия Манна-Уитни и показателя достоверности различия p , критический уровень которого принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании микроциркуляции кожи тыльной поверхности стопы у группы животных, которым выполнялась перерезка и отсроченная нейрорафия седалищного нерва, отмечалось значимое снижение перфузионного показателя относительно контрольных значений на 42-е сутки эксперимента. У животных, которым одновременно с нейрорафией выполнялась АТПКЛ, на 42-е сутки эксперимента наблюдалось улучшение состояния микроциркуляции, о чем свидетельствовало достоверное повышение показателя перфузии на 44% по сравнению с его величиной у животных в соответствующей группе сравнения. Показатель перфузии у животных данной группы не отличался от значений, наблюдаемых в контрольной группе (рис.).

Показано, что у животных с экспериментальным диабетом к 42-м суткам после введения аллоксана наблюдалось статистически значимое снижение перфузии кожи тыльной поверхности стопы по сравнению с животными в контрольной группе, что свидетельствует о редукции микрокровотока. У животных, которым на фоне аллоксанового диабета выполнялась АТПКЛ, на 42-е сутки эксперимента наблюдалось статистически значимое увеличение данного показателя относительно группы животных с нарушенным углеводным обменом на 43%, что свидетельствовало об улучшении состояния микроциркуляции. При сравнении двух опытных групп установлено, что уровень перфузии статистически выше у животных, которым выполнялась АТПКЛ на фоне системных нарушений микрокровотока (рис.).

При исследовании роли изменений симпатической регуляции сосудистого тонуса в реализации дистантного стимулирующего эффекта АТПКЛ установлено, что у крыс, которым выполнялась нейрорафия, на 42-е сутки после оперативного вмешательства наблюдается статистически значимое увеличение содержания катехоламинов в крови относительно контроля. У животных данной группы обнаружено, что под действием АТПКЛ происходит снижение количества катехоламинов примерно в 1,5 раза относительно группы животных, которым АТПКЛ на фоне нейрорафии не проводилась (табл. 1).

Вместе с тем у животных с системными нарушениями микроциркуляции, индуцированными

аллоксановым диабетом, к 42-м суткам также наблюдается значительное повышение содержания катехоламинов в крови. АТПКЛ у крыс с аллоксановым диабетом почти вдвое снижает уровень катехоламинов в крови относительно соответствующей группы сравнения. Следовательно, АТПКЛ лимитирует

активность симпатической нервной системы более выражено при системных микроциркуляторных нарушениях, возникающих на фоне нарушенного углеводного обмена (табл. 1).

При исследовании уровня гистамина выявлено, что перерезка и нейрорафия не вызывает его значи-

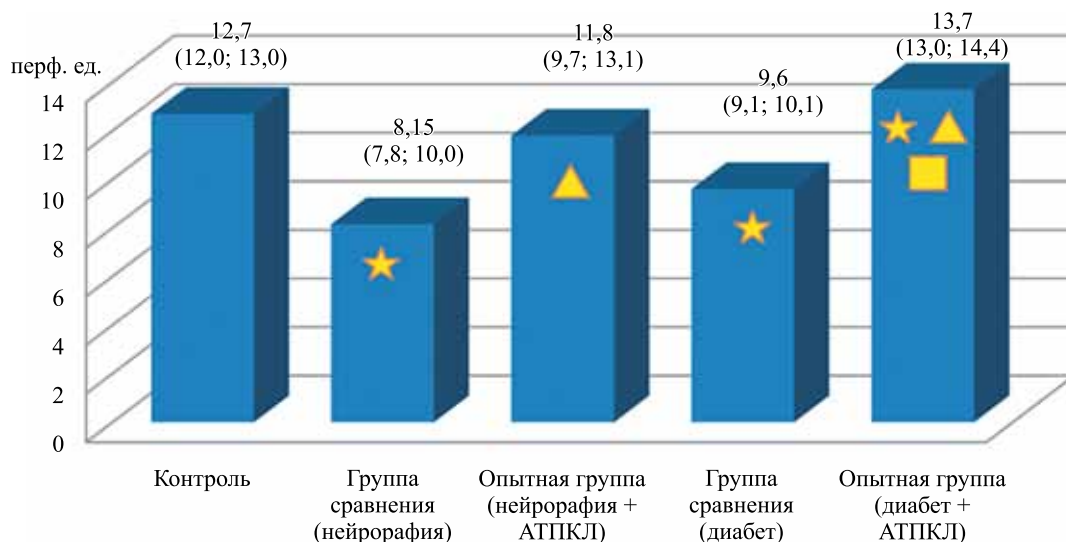


Рис. Изменение перфузионного показателя кожи тыльной поверхности стопы при АТПКЛ на фоне повреждения седалищного нерва и аллоксанового диабета. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) обозначены: звездой – по сравнению с контролем, треугольником – относительно соответствующей группы сравнения и квадратом – при сравнении опытных групп между собой

Fig. Changes in the perfusion index of the dorsal skin of the rear paw with FTSG autotransplantation in sciatic nerve injury and alloxan-induced diabetes. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are indicated by: a star (relative to the control), a triangle (relative to the corresponding comparison group), and a square (when the experimental groups are compared to each other)

Таблица 1

Изменение содержания вазоактивных веществ в крови после АТПКЛ у животных с повреждением седалищного нерва и аллоксановым диабетом

Changes in the serum concentrations of vasoactive substances after FTSG autotransplantation in rats with sciatic nerve injury and alloxan-induced diabetes

Группа / Показатель	Контроль	Группа сравнения (нейрорафия)	Опытная группа (нейрорафия + АТПКЛ)	Группа сравнения (диабет)	Опытная группа (диабет + АТПКЛ)
Концентрация КА в крови, у. е.	22 (16; 25)	105 (95; 110) $p_1 = 0,000161$	65 (60; 70) $p_1 = 0,000176$ $p_2 = 0,021572$	56 (49; 60) $p_1 = 0,000001$	30 (26; 33) $p_1 = 0,001236$ $p_2 = 0,000001$ $p_3 = 0,000003$
Гистамин, мг/л	1,7 (0,6; 2,1)	1,34 (1,19; 2,1) $p_1 = 0,885234$	3,16 (2,59; 3,69) $p_1 = 0,000939$ $p_2 = 0,001764$	1,1 (0,6; 2,2) $p_1 = 0,732678$	2,8 (2,2; 3,2) $p_1 = 0,025348$ $p_2 = 0,021828$ $p_3 = 0,023271$
VEGF, пг/мл	9,4 (7,3; 15,7)	8,6 (4,65; 9,96) $p_1 = 0,222082$	16,97 (9,96; 28,5) $p_1 = 0,004041$ $p_2 = 0,045501$	85,2 (79,6; 97,5) $p_1 = 0,000453$	83,3 (78,9; 86,3) $p_1 = 0,001033$ $p_2 = 0,286423$ $p_3 = 0,001033$

Примечание. p_1 – значимость различий относительно контроля; p_2 – значимость различий относительно группы сравнения; p_3 – значимость различий при сравнении опытных групп между собой.

Note. p_1 – significance of differences relative to the control; p_2 – significance of differences relative to the comparison group; p_3 – significance of differences when the two experimental groups are compared to each other.

мых изменений относительно контроля. Вместе с тем у животных опытной группы, которым выполнялась АТПКЛ, концентрация гистамина в плазме на 42-е сутки эксперимента превышает как контрольные значения, так и значения соответствующей группы сравнения. Установлено, что АТПКЛ, выполненная на фоне нарушенного углеводного обмена, увеличивает концентрацию гистамина в плазме на 42-е сутки эксперимента, которая превышает как контрольные значения, так и значения группы сравнения в среднем в 2,5 раза (табл. 1). При этом концентрация гистамина в плазме крови у животных, которым проводилась АТПКЛ на фоне аллоксанового диабета, значительно ниже, чем у крыс с АТПКЛ, выполненной на фоне повреждения и нейрорафии седалищного нерва.

Установлено, что АТПКЛ, выполненная одновременно с нейрорафией поврежденного седалищного нерва, вызывает увеличение концентрации VEGF в сыворотке на 42-е сутки эксперимента, которая превышает контрольные значения в 1,8 раза (табл. 1). Выявлено, что введение аллоксана вызывает у крыс значимое увеличение концентрации в крови VEGF. При этом у животных, которым выполнялась АТПКЛ, также наблюдалась повышенная концентрация VEGF относительно контрольных значений, которая не имела значимых различий с таковой у крыс соответствующей группы сравнения (табл. 1).

При микроскопии препаратов тканей области аутотрансплантации обнаружено истончение кожного лоскута, сопровождающееся деградацией эпидермиса. Вместе с тем отмечается изменение состава клеточных популяций дермы аутотрансплантата, проявляющееся увеличением числа фибробластов, лимфоцитов и макрофагов. Отличительной особенностью препаратов данной группы является увеличенное количество эозинофилов в среднем до 6 клеток в поле зрения (табл. 2).

В ходе морфологического анализа препаратов у животных с аллоксановым диабетом было обнаружено, что к 42-м суткам эксперимента наблюдалось истончение аутотрансплантата. У 20% крыс данной группы в нем отсутствовал эпидермис. Толщина гиподермы резко сокращалась у всех животных. В дерме и гиподерме наблюдались полнокровные артериальные и венозные сосуды. В составе дермы присутствовали дегенерирующие волосяные фолликулы. Дерма аутотрансплантата содержала большое количество фибробластов, была умеренно инфильтрирована лейкоцитами. В составе лейкоцитарной инфильтрации доминировали лимфоциты и клетки макрофагального ряда. У животных на фоне нарушенного углеводного обмена присутствовали единичные эозинофилы в дерме аутотрансплантата, но

Таблица 2

Динамика клеточных популяций дермы аутотрансплантата у животных с повреждением седалищного нерва и аллоксановым диабетом

Dynamics of cell populations of the autograft dermis in sciatic nerve injury and alloxan-induced diabetes

Показатель \ Группа	Контроль	Группа сравнения (нейрорафия + АТПКЛ)	Опытная группа (аллоксановый диабет + АТПКЛ)
Фибробласты	42 (27; 52)	104 (60; 182) $p_1 = 0,000077$	119 (97; 165) $p_1 = 0,000028$ $p_2 = 0,394742$
Фibroциты	18 (13; 23)	21 (14; 32) $p_1 = 0,558185$	27 (21; 44) $p_1 = 0,034962$ $p_2 = 0,183147$
Нейтрофилы	0 (0; 0)	1 (0; 4) $p_1 = 0,005414$	0 (0; 1) $p_1 = 0,291698$ $p_2 = 0,044686$
Эозинофилы	0 (0; 0)	3 (2; 8) $p_1 = 0,000016$	1 (0; 2) $p_1 = 0,010519$ $p_2 = 0,000292$
Лимфоциты	0 (0; 2)	13 (5; 19) $p_1 = 0,000034$	20 (14; 27) $p_1 = 0,000017$ $p_2 = 0,077135$
Моноциты / гистиоциты / макрофаги	0 (0; 0)	1 (1; 3) $p_1 = 0,001393$	2 (0; 3) $p_1 = 0,047679$ $p_2 = 0,394742$

Примечание. p_1 – значимость различий относительно контроля; p_2 – значимость различий относительно группы сравнения.

Note. p_1 – significance of differences relative to the control; p_2 – significance of differences relative to the comparison group

их количество было значимо меньше, чем у крыс с повреждением седалищного нерва (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизм развития локальных микроциркуляторных нарушений при повреждении седалищного нерва обусловлен, с одной стороны, денервационной гиперчувствительностью сосудов прекапиллярного звена микроциркуляторного русла, характеризующейся повышением экспрессии альфа-1-адренорецепторов на мембране гладкомышечных клеток и их чувствительности к катехоламинам [15]. С другой стороны, травматическое повреждение нервного ствола сопровождается активацией симпатической нервной системы, и как свидетельствуют полученные данные, повышением содержания катехоламинов в крови. В совокупности эти два фактора приводят к повышению тонуса гладкомышечных клеток сосудов прекапиллярного звена и вазоконстрикции мелких артерий и артериол, что проявляется уменьшением перфузии кожи тыльной поверхности стопы оперированной конечности. Недавние исследования свидетельствуют, что у мышей введение аллоксана также сопровождается повышением экспрессии альфа-1-адренорецепторов в гладкомышечных клетках сосудов кожи в период 2–4 недель развития аллоксанового диабета. С помощью лазерной спекл-контрастной визуализации было показано, что у этих животных норадреналин вызывает редукцию артериального и венозного кровотока кожи спины без последующего восстановления, что отражает стойкую вазоспастическую реакцию, обусловленную гиперчувствительностью сосудов к катехоламинам [18]. Полученные в ходе настоящего исследования результаты свидетельствуют, что у крыс при аллоксановом диабете повышается уровень циркулирующих катехоламинов. Повышение содержания катехоламинов в крови при аллоксановом диабете может быть связано с влиянием гипергликемии на активность ферментов, обеспечивающих синтез и разрушение этих биогенных аминов. Так, в условиях эксперимента было показано, что гипергликемия у мышей с диабетом повышает в мезангиальных клетках почек экспрессию тирозингидроксилазы, сопровождающуюся повышенным потреблением тетрагидробиоптерина и увеличением продукции катехоламинов. При этом наблюдалось снижение активности моноаминоксидазы, что препятствовало разрушению катехоламинов [19]. Следовательно, развивающиеся при диабете микроциркуляторные нарушения, так же, как и при травме нерва, обусловлены, с одной стороны, повышением уровня циркулирующих катехоламинов, с другой – увеличением экспрессии альфа-1-адренорецепторов на мембране гладкомышечных клеток, обуславливающих развитие гиперчувствительности сосудов к действию циркулирующих катехоламинов.

То есть наблюдаемые микроциркуляторные нарушения у крыс с травматическим повреждением седалищного нерва и животных с аллоксановым диабетом не только аналогичны, но и имеют гомологичные механизмы развития. Однако в случае травмы нерва нарушения микроциркуляции носят преимущественно локальный характер, а при аллоксановом диабете – системный.

АТПКЛ в межлопаточной области на фоне как повреждения нерва, так и при аллоксановом диабете оказывает дистантное стимулирующее действие на микроциркуляцию кожи тыльной поверхности стопы у белых крыс. Перфузионный показатель кожи поверхности стопы у экспериментальных животных опытных групп увеличивался в среднем на 43–44% относительно соответствующих групп сравнения, что свидетельствует об одинаковой степени выраженности дистантного стимулирующего действия АТПКЛ как при локальных, так и при системных нарушениях микроциркуляции. Ранее проведенные исследования свидетельствуют, что реализация дистантного стимулирующего эффекта АТПКЛ на микроциркуляцию у интактных крыс в условиях повреждения седалищного нерва и при нарушениях углеводного обмена сопряжена со снижением нейрогенного тонуса сосудов [14, 17]. Представленная в настоящей работе динамика содержания катехоламинов в крови согласуется с ранее полученными данными и свидетельствует, что АТПКЛ в межлопаточной области на фоне локальных и системных нарушений микроциркуляции ограничивает активность симпатoadреналовой системы. Ограничение влияния симпатической системы на сосуды микроциркуляторного русла под влиянием ауто трансплантации может объяснять поддержание адекватной перфузии в дистальной конечности у крыс опытных групп. Механизм ограничения активности симпатoadреналовой системы под влиянием АТПКЛ может быть обусловлен обнаруженными дегенеративными изменениями кожного лоскута, которые могут сопровождаться образованием пептидных фрагментов, выполняющих функцию цитомединов. Цитомедины в качестве пептидных регуляторов способны оказывать дистантные эффекты, в том числе и на функционирование нервной системы [20]. Аналогичный механизм ограничения эффектов симпатической нервной системы на сосудистое русло был описан для пептидного препарата «СЕМАКС», действие которого характеризовалось уменьшением экспрессии альфа-адренорецепторов в условиях эксперимента на белых крысах [21]. Полученные при выполнении настоящей работы данные свидетельствуют, что ограничение влияния симпатической нервной системы на микроциркуляцию при АТПКЛ более выражено при системных микроциркуляторных нарушениях, обусловленных абсолютной инсулиновой недостаточностью.

Ранее было отмечено, что АТПКЛ, выполненная на фоне нейрорафии седалищного нерва, оказывает эффект не только на содержание циркулирующих катехоламинов, но и других биогенных аминов, в том числе обладающих вазодилатационной активностью, в частности, повышает концентрацию гистамина в плазме крови [13]. Результаты настоящей работы демонстрируют, что АТПКЛ оказывает аналогичное действие на плазменную концентрацию гистамина и после введения аллоксана. Вместе с тем среднее значение концентрации гистамина в группе животных, которым АТПКЛ выполнялась после введения аллоксана, на 12% ниже значений опытной группы, крысам которой аутоотрансплантация проводилась на фоне повреждения седалищного нерва.

Одним из возможных механизмов реализации дистантного стимулирующего эффекта АТПКЛ на микроциркуляцию в условиях нормального углеводного обмена при нарушенной иннервации конечности является способность пролонгировать продукцию ростовых факторов, в частности VEGF и нейротрофина 3 [13, 22]. Источниками ростовых факторов могут выступать фибробласты [23] и клетки лейкоцитарной инфильтрации аутоотрансплантата, в частности эозинофилы [24], тучные клетки [25], макрофаги [26] выделяют VEGF, стимулирующий ангиогенез, вызывающий дилатацию сосудов и повышение их проницаемости. Однако в ходе данного исследования обнаружено, что АТПКЛ не реализует данный механизм действия в условиях аллоксанового диабета у крыс. У животных опытной группы концентрация данного фактора в сыворотке крови значительно превышает контрольные значения, но не имеет отличий от сравнительной группы крыс с аллоксановым диабетом. При системных нарушениях микроциркуляции, вызванных экспериментальным диабетом, высокий уровень VEGF в крови связан с системной альтерацией эндотелия гипергликемией, что является компенсаторным механизмом восстановления сосудистой стенки [27]. В этой связи, вероятно, исходно высокий уровень VEGF у крыс с аллоксановым диабетом блокирует его продукцию клетками аутоотрансплантата по механизму отрицательной обратной связи.

Описанные выше биохимические механизмы реализации дистантного стимулирующего действия АТПКЛ на микроциркуляцию тесно взаимосвязаны с гистоморфологической перестройкой аутоотрансплантата. Гистоморфологические изменения аутоотрансплантата стереотипны и включают деградацию эпидермиса, истончение дермы и гиподермы, слабо выраженную лейкоцитарную инфильтрацию. Незначительные различия между опытными группами заключаются в количестве эозинофилов в составе клеточных популяций дермы аутоотрансплантата. Их присутствие в тканях аутоотрансплантата связано с

выделением гистамина тучными клетками, который участвует в реализации дистантного вазодилатирующего эффекта [28]. У животных на фоне нарушенного углеводного обмена наблюдалось меньшее количество эозинофилов в зоне аутоотрансплантата по сравнению с животными с нейрорафией. Данные результаты гистологического исследования согласуются с биохимическими данными, отражающими менее выраженное увеличение концентрации гистамина в крови под влиянием АТПКЛ у животных с аллоксановым диабетом. Авторами в работе [29] было показано, что аллоксан у крыс значительно снижает содержание тучных клеток в коже. Учитывая менее выраженное увеличение уровня гистамина в плазме при АТПКЛ в условиях нарушений углеводного обмена, можно предположить, что малое число эозинофилов в составе аутоотрансплантата у крыс с аллоксановым диабетом обусловлено снижением интенсивности дегрануляции тучных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АТПКЛ оказывает дистантное стимулирующее действие на микроциркуляцию, которое проявляется в одинаковом объеме в условиях как локальных, так и системных нарушений микрокровотока, и не имеет явной зависимости от этиологического фактора, их индуцирующего. Полученные данные сравнительного анализа эффектов АТПКЛ на двух моделях сосудистой альтерации у белых крыс свидетельствуют, что локальные структурно-функциональные изменения аутоотрансплантата стереотипны, следовательно, могут считаться триггерными, а биохимические сдвиги концентраций регуляторных веществ имеют неодинаковую степень выраженности в зависимости от этиологии и распространенности нарушений микрокровотока. Различия концентраций биологически активных веществ в кровотоке позволяют выделить в комплексе регуляторных механизмов АТПКЛ универсальные и вариабельные реакции. К универсальным реакциям следует отнести изменение баланса биогенных аминов в крови, в частности изменение концентрации катехоламинов и гистамина. Следует также отметить, что коррекция вазоконстрикторной активности с помощью АТПКЛ более выражена при системных нарушениях микроциркуляции, индуцированных аллоксановым диабетом. В противоположность этому реализация влияния АТПКЛ на продукцию вазодилататорных веществ, в частности гистамина, более выражена при локальных нарушениях микрокровотока в денервированной конечности. Вариабельные реакции зависят от этиологии моделируемых микроциркуляторных нарушений, в частности, для микроциркуляторных эффектов АТПКЛ при денервации конечности специфически являются изменения продукции ростовых факторов, включая VEGF.

Таким образом, взаимосвязи структурно-функциональных изменений тканей в области аутотрансплантации и циркулирующих в системном кровотоке факторов регуляции микроциркуляции обуславливают компенсаторное изменение баланса регуляторных механизмов, что обеспечивает стабильную реализацию дистантного стимулирующего влияния АТПКЛ на микрокровооток, вне зависимости от распространенности и этиологии его поражения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Миронов СП, Крупаткин АИ, Голубев ВГ, Панов ДЕ. Диагностика и выбор тактики лечения при повреждении периферических нервов. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2005; 2: 33–39. Mironov SP, Krupatkin AI, Golubev VG, Panov DE. Diagnostika i vybor taktiki lecheniya pri povrezhdeniyah perifericheskikh nervov. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova*. 2005; 2: 33–39.
2. Щаницын ИИ, Иванов АН, Бажанов СП, Нинель ВГ, Пучиньян ДМ, Норкин ИА. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы. *Успехи физиологических наук*. 2017; 48 (3): 92–112. Shchanicyn IN, Ivanov AN, Bazhanov SP, Ninel' VG, Puchin'yan DM, Norkin IA. Stimulyaciya regeneracii perifericheskogo nerva: sovremennoe sostoyanie, problem i perspektivy. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2017; 48 (3): 92–112.
3. Inanc M, Tekin K, Kiziloprak H, Ozalkak S, Doguizi S, Ayacan Z. Changes in Retinal Microcirculation Precede the Clinical Onset of Diabetic Retinopathy in Children With Type 1 Diabetes Mellitus. *J Ophthalmol*. 2019; 207: 37–44. doi: 10.1016/j.ajo.2019.04.011.
4. Стаценко МЕ, Туркина СВ, Шилина НН, Косивцова МА, Лопушкова ЮЕ, Винникова АА и др. Особенности состояния микроциркуляции у больных хронической сердечной недостаточностью и сахарным диабетом второго типа. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2015; 1 (45): 35–39. Stacenko ME, Turkina SV, Shilina NN, Kosivcova MA, Lopushkova YuE, Vinnikova AA i dr. Osobennosti sostoyaniya mikrocirkulyacii u bol'nyh hronicheskoy serdechnoj nedostatochnost'yu i saharnym diabetom vtorogo tipa. *Volgogradskij nauchno-medicinskij zhurnal*. 2015; 1 (45): 35–39.
5. Kuo L, Hein TW. Vasomotor regulation of coronary microcirculation by oxidative stress: role of arginase. *Front Immunol*. 2013; 19 (4): 237.
6. Михайлузов РН. Факторы роста – перспективные технологии воздействия на раневой процесс. Харківська хірургічна школа. 2014; 5 (68): 90–98. Mihajlusov RN. Faktory rosta – perspektivnye tekhnologii vozdeystviya na ranevoj process. *Harkivs'ka hirurgichna shkola*. 2014; 5 (68): 90–98.
7. Громова ОА, Торшин ИЮ, Волков АЮ. Элементный состав препарата Лаеннек и его ключевая роль в фармакологическом воздействии препарата. *Пластическая хирургия и косметология*. 2010; 4: 1–7. Gromova OA, Torshin IYu, Volkov AYU. Elementnyj sostav preparata Laennek i ego klyuchevaya rol' v farmakologicheskom vozdeystvii preparata. *Plasticheskaya hirurgiya i kosmetologiya*. 2010; 4: 1–7.
8. Öhnstedt E, Lofton Tomenius H, Vågesjö E, Phillipson M. The discovery and development of topical medicines for wound healing. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019; 14: 485–497. doi: 10.1080/17460441.2019.1588879/.
9. Ноздрин ВИ, Белоусова ТА, Альбанова ВИ, Лаврик ОИ. Гистофармакологические исследования кожи (наш опыт). М., 2006. 376. Nozdrin VI, Belousova TA, Al'banova VI, Lavrik OI. Gistofarmakologicheskie issledovaniya kozhi (nash opyt). М., 2006. 376.
10. Hocking SL, Stewart RL, Brandon AE. Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance and inflammation in mice. *Diabetologia*. 2015; 58 (7): 1587–600.
11. Foster MT, Shi H, Softic S et al. Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2011; 54 (11): 2890–2899.
12. Храмова ЮС, Арташян ОС, Юшков БГ, Волкова ЮЛ, Незговорова НЮ. Влияние тучных клеток на репаративную регенерацию тканей с разной степенью иммунологической привилегированности. *Цитология*. 2016; 58 (5): 356–363. Hramcova YuS, Artashyan OS, Yushkov BG, Volkova YuL, Nezgovorova NYu. Vliyanie tuchnyh kletok na reparativnuyu regeneraciyu tkanej s raznoj stepen'yu immunologicheskoy privilegirovannosti. *Citologiya*. 2016; 58 (5): 356–363.
13. Иванов АН, Лагутина ДД, Гладкова ЕВ, Матвеева ОВ, Мамонова ИА, Шутров ИЕ и др. Механизмы дистантного стимулирующего действия аутотрансплантации кожного лоскута при повреждении периферического нерва. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2018; 11: 1313–1324. Ivanov AN, Lagutina DD, Gladkova EV, Matveeva OV, Mamonova IA, Shutrov IE i dr. Mekhanizmy distantnogo stimulyuyushchego dejstviya autotransplantacii kozhnogo loskuta pri povrezhdenii perifericheskogo nerva. *Rossijskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2018; 11: 1313–1324.
14. Иванов АН, Попыхова ЭБ, Степанова ТВ, Пронина ЕА, Лагутина ДД. Изменение показателей микроциркуляции при аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута на фоне экспериментального сахарного диабета у крыс. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019; 4: 72–80. Ivanov AN, Popyhova EB, Stepanova TV, Pronina EA, Lagutina DD. Izmenenie pokazatelej mikrocirkulyacii pri autotransplantacii polnoslojnogo kozhnogo loskuta na fone eksperimental'nogo saharnogo diabeta u krys. *Regionalnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya*. 2019; 4: 72–80.
15. Иванов АН, Норкин ИА, Нинель ВГ, Щаницын ИИ, Шутров ИЕ, Пучиньян ДМ. Особенности измене-

- ний микроциркуляции при регенерации седалищного нерва в условиях эксперимента. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4 (2): 281–285. Ivanov AN, Norkin IA, Ninel' VG, Shchanicyn IN, Shutrov IE, Puchin'yan DM. Osobennosti izmenenij mikrocirkulyacii pri regeneracii sedalishchnogo nerva v usloviyah eksperimenta. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4 (2): 281–285.
16. Джафарова РЭ. Сравнительное исследование различных моделей аллоксан-индуцированного сахарного диабета. *Казанский медицинский журнал*. 2013; 94 (6): 915–919. Dzhafarova RE. Sravnitel'noe issledovanie razlichnykh modelej alloksan-inducirovannogo saharnogo diabeta. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2013; 94 (6): 915–919.
17. Иванов АН, Шутров ИЕ, Норкин ИА. Аутоотрансплантация полнослойного кожного лоскута как способ биостимуляции микроциркуляции в условиях нормальной и нарушенной иннервации. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2015; 3 (55): 59–65. Ivanov AN, Shutrov IE, Norkin IA. Autotransplantaciya polnoslojnogo kozhnogo loskuta kak sposob biostimulyacii mikrocirkulyacii v usloviyah normal'noj i narushennoj innervacii. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya*. 2015; 3 (55): 59–65.
18. Feng W, Shi R, Zhang C, Liu S, Yu T, Zhu D. Visualization of skin microvascular dysfunction of type 1 diabetic mice using *in vivo* skin optical clearing method. *J Biomed Opt*. 2018; 24 (3): 1–9.
19. Marco GS, Colucci JA, Fernandes FB, Vio CP, Schor N, Casarini DE. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40 (4): 747–754.
20. Анохова ЛИ, Патеев АВ, Кузник БИ, Кохан СТ. Сравнительное влияние полипептидов эндометрия и тималина на некоторые показатели иммунитета и гемостаза в опытах *in vitro* и *in vivo*. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2011; 6: 156–159. Anohova LI, Pateyuk AV, Kuznik BI, Kohan ST. Sravnitel'noe vliyanie polipeptidov endometriya i timalina na nekotorye pokazateli immuniteta i gemostaza v opytah *in vitro* i *in vivo*. *Byulleten' VSNC SO RAMN*. 2011; 6: 156–159.
21. Горбачева АМ, Бердалин АБ, Стулова АН, Никогосова АД, Лин МД, Буравков СВ и др. Изменение симпатической иннервации хвостовой артерии крысы при экспериментальном инфаркте миокарда; влияние пептида «СЕМАКС». *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 4: 462–467. Gorbacheva AM, Berdalin AB, Stulova AN, Nikogosova AD, Lin MD, Buravkov SV i dr. Izmenenie simpaticheskoy innervacii hvostovoy arterii krysy pri eksperimental'nom infarkte miokarda; vliyanie peptida «SEMAKS». *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*. 2016; 4: 462–467.
22. Иванов АН, Шутров ИЕ, Нинель ВГ, Коришнуова ГА, Гладкова ЕВ, Матвеева ОВ и др. Влияние аутоотрансплантации кожного лоскута и прямой электростимуляции седалищного нерва на регенерацию нервных волокон. *Цитология*. 2017; 7: 489–497. Ivanov AN, Shutrov IE, Ninel' VG, Korshunova GA, Gladkova EV, Matveeva OV i dr. Vliyanie autotransplantacii kozhnogo loskuta i pryamoj elektrostimulyacii sedalishchnogo nerva na regeneraciyu nervnyh volokon. *Citologiya*. 2017; 7: 489–497.
23. Chakroborty D, Sarkar Ch, Lu K, Bhat M. Activation of dopamine d1 receptors in dermal fibroblasts restores vascular endothelial growth factor-a production by these cells and subsequent angiogenesis in diabetic cutaneous wound tissues. *Am J Pathol*. 2016; 186 (9): 2262–2270. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.05.008.
24. Panagopoulos V, Zinonos I, Leach D, Evdokiou A. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005; 37 (3): 628–636. doi: 10.1016/j.biocel.2004.09.001.
25. Lee AJ, Ro MJ, Park JI, Jang JH, Kim JH. The synthesis of VEGF in allergen-stimulated mast cells is through a leukotriene B4 receptor-2-dependent signaling pathway. *J Immunol*. 2016; 1: 196.
26. Монастырская ЕА, Лямина СВ, Малышев ИЮ. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии. *Патогенез*. 2008; 4: 31–39. Monastyrskaya EA, Lyamina SV, Malyshev IYu. M1 i M2 fenotipy aktivirovannyh makrofagov i ih rol' v immunnom otvete i patologii. *Patogenez*. 2008; 4: 31–39.
27. Исакова СС, Жармаханова ГМ, Дворацка М. Место ангиогенеза в развитии сахарного диабета и его осложнений (обзор литературы). *Вестник КазНМУ*. 2014; 2 (2): 303–307. Isakova SS, Zharmahanova GM, Dvoracka M. Mesto angiogeneza v razvitii saharnogo diabeta i ego oslozhnenij (obzor literatury). *Vestnik KazNMU*. 2014; 2 (2): 303–307.
28. Swartzendruber JA, Byrne AJ, Bryce PJ. Cutting edge: histamine is required for IL-4-driven eosinophilic allergic responses. *J Immunol*. 2012; 188 (2): 536–540.
29. De F Carvalho V, Campos LV, Farias-Filho FA, Florim LT, Barreto EO, Pirmez C et al. Suppression of allergic inflammatory response in the skin of alloxan-diabetic rats: relationship with reduced local mast cell numbers. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 147 (3): 246–254.

Статья поступила в редакцию 6.03.2020 г.
The article was submitted to the journal on 6.03.2020