

РЕЗУЛЬТАТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМПОЗИТНОЙ ГЕМИФАЦИАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

О.Г. Хурцилава¹, М.А. Волох¹, Н.Г. Губочкин², Н.Г. Кикория¹, Г.Р. Ишбулатова¹, А.Ф. Лесняков¹

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

THE RESULT OF THE EXPERIMENTAL COMPOSITE HEMIFACIAL TRANSPLANTATION

O.G. Hurtsilava¹, M.A. Volokh¹, N.G. Gubochkin², N.G. Kikoriya¹, G.R. Shbulatova¹, A.F. Lesnyakov¹

¹ North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2014

Представлен результат разработки экспериментальной модели комpositной гемифациальной трансплантации у крыс с последующим изучением иммунологического статуса реципиента. Проведена оценка состояния пересаженного трансплантата и общего состояния крыс после операции на фоне иммуносупрессивной терапии в динамике.

Ключевые слова: аллотрансплантация, иммуносупрессивная терапия, комpositный гемифациальный трансплантат, экспериментальное исследование.

The article presents the results of an experimental model of the composite hemifacial graft in rats with further study of the immunological status of the recipient. The estimation of the state of the transplanted graft and the general condition of the rats after surgery during immunosuppressive therapy in the dynamics.

Key words: allotransplantation, immunoreduction therapy, composite hemifacial flap, experimental investigation.

Введение

Лицо является не только функциональной, но и социально значимой зоной [1]. Реконструкция обширных дефектов лица после травм, ожогов, радикальных удалений опухолей остается нерешенной проблемой для хирургов вследствие недостаточного объема аутогенных тканей, сложной формы структур лица, необходимости соответствия текстуры и цвета кожи. Именно поэтому необходимо совершенствование алгоритма хирургического лечения глубоких посттравматических дефектов лица. Аллотрансплантация лица может служить альтернативой стандартным методам реконструкции. Аллотрансплантация лица или его части относится к области трансплантации сложных (комpositных) комплексов тканей [2]. Комpositный трансплантат отличается содержанием различных типов тканей: кожа, подкожная жировая клетчатка, мышцы, сухожилия, хрящи, кости, сосуды, нервы. Так же, как любой тип аллотрансплантата, трансплантат сложных тканей лица будет распознан иммунной системой как чужеродная ткань и отторгнут. Это может

быть предотвращено с помощью пожизненной иммуносупрессивной терапии, но с достаточно высоким риском развития побочных эффектов и осложнений. В настоящее время изучение иммунологических реакций в основном базируется только на опыте пересадки таких органов, как сердце, поджелудочная железа, почки и печень, или комплекса сердце-легкие [1]. Несмотря на фармакологические достижения, риск побочных эффектов, связанных с иммуносупрессивной терапией, остается главным ограничением в аллотрансплантации органов и комплексов сложных тканей.

Для изучения ближайших и отдаленных результатов таких операций необходимо создание экспериментальной модели. Одной из первых была внедрена full-face модель (трансплантат сложного комплекса тканей всей лицевой части крысы). Она является технически трудоемкой, длительность операции превышает 10 часов и сопровождается большим количеством осложнений с высокой периоперационной летальностью, в т.ч. и от развития мозговых сосудистых катастроф [3]. Следует учитывать, что для

изучения иммунного ответа необходим большой материал для исследования. Каждая экспериментальная аллотрансплантация требует значительного количества операционного времени, что очень затрудняет сбор материала. Следовательно, оптимальная экспериментальная модель должна отвечать следующим критериям:

– максимально короткой продолжительностью операции;

– низкой периоперационной летальностью.

Дальнейшее изучение показателей иммунного ответа в эксперименте является одной из главных задач при композитной гемифациальной аллотрансплантации, и экспериментальные исследования – это важный шаг на пути к успешному выполнению этих операций у людей.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено с соблюдением принципов гуманного обращения с подопытными животными и согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики»)». Исследования проведены в соответствии с протоколом, утвержденным этическим комитетом Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. Работу с подопытными животными выполняли сотрудники, имеющие соответствующую квалификацию и прошедшие обучение.

Животные содержались в отдельной комнате вивария в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 18–20°C и относительной влажности воздуха 30–70%. В комнатах содержания животных соблюдались 12-часовой цикл освещения «день-ночь» и не менее чем 11-кратная смена объема воздуха в час.

Подвид и вес крыс. Экспериментальное исследование было проведено на крысах – 10 самцах инбредной линии BALB/с весом крысы-реципиента $321 \pm 12,4$ г и весом крысы-донора $334 \pm 16,8$ г. Возраст животных – 4 недели.

Анестезиологическое пособие. В эксперименте проводилась комбинированная анестезия: золетил (3 мг/100г, внутримышечно) и пропофол (1 мг/100г), который вводился через внутривенный катетер установленный в хвостовую вену, в разведении 0,9% физиологическим раствором в пропорции 1:4.

Протокол операции. После обработки операционного поля антисептическим раствором у крысы-донора выполнен кожный разрез

лицевой части согласно предоперационной разметке. В лоскут были включены покровные ткани по линии *nasofrontalis* с наружным ухом и тканями шеи. Покровные ткани века, носа и ротового отверстия были интактны (рис. 1).

На переднебоковой поверхности шеи через подкожную мышцу осуществлен доступ к кивательной мышце, визуализирована общая сонная артерия и ее ветви: наружная и внутренняя (рис. 2).

После перевязки ветвей наружной сонной артерии у крысы-донора выполнена эксплантация сложного комплекса тканей лицевой части животного согласно предоперационной разметке (рис. 3).

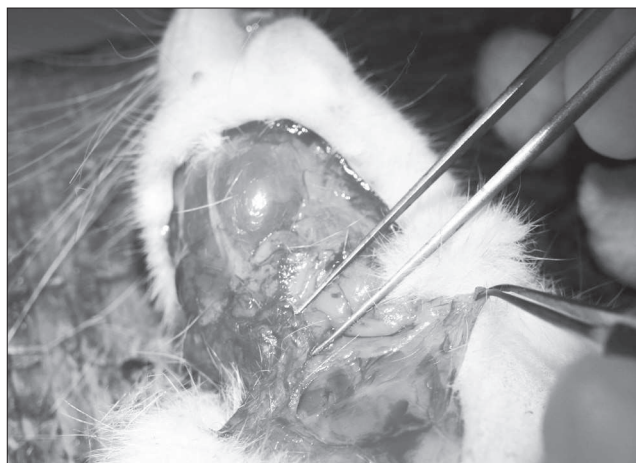


Рис. 1. Этап эксплантации сложного комплекса тканей

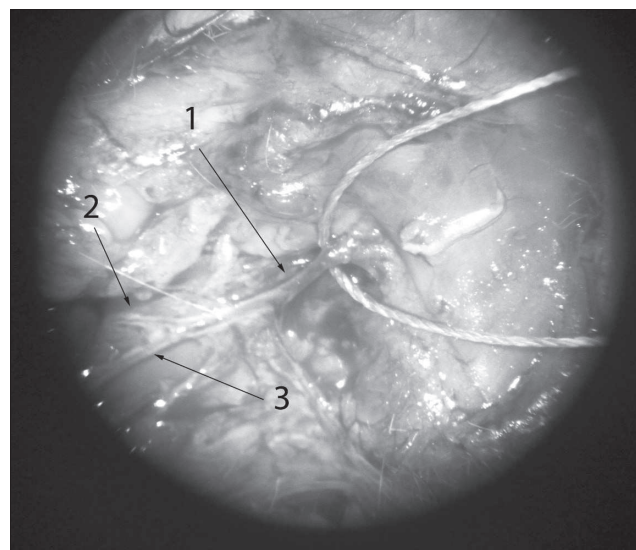


Рис. 2. Этап выделения сосудистого пучка лоскута при увеличении в 4 раза: 1 – *a. carotis communis*; 2 – *a. carotis interna*; 3 – *a. carotis externa*. Также визуализирована ветвь наружной сонной артерии – *a. facialis*



Рис. 3. Вид сложного гемифациального комплекса тканей перед трансплантацией: 1 – *v. jugularis externa*; 2 – *a. carotis externa*

После предоперационной разметки, согласно размерам донорского лоскута, у крысы-реципиента иссечен гемифациальный комплекс тканей. Осуществлен доступ к общей сонной артерии с освобождением ее от периваскулярных тканей ниже места бифуркации. Выполнена частичная резекция кивательной мышцы для создания более благоприятных условий наложения анастомоза и предотвращения давления на него после операции.

После подготовки при 24-кратном увеличении операционного микроскопа Carl Zeiss с использованием пролена 10/0 выполнен артерио-артериальный анастомоз «конец в бок» между общей сонной артерией реципиента диаметром 0,6 мм и наружной сонной артерией донора диаметром 0,3 мм (рис. 4, 5). Венозный анастомоз выполнен «конец в конец».

Стандартными методами проверена проходимость анастомозов и контроль жизнеспособности лоскута (рис. 6).



Рис. 4. Этап выполнения анастомоза

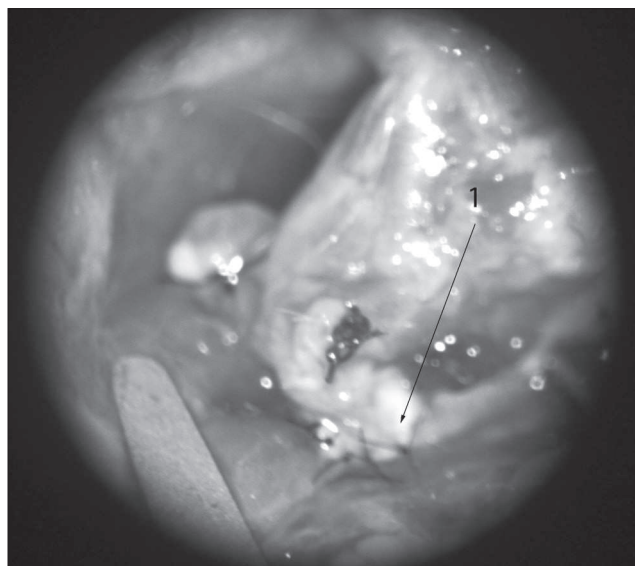


Рис. 5. Конечный этап выполнения артериального анастомоза при увеличении в 24 раза: 1 – артерио-артериальный анастомоз «конец в бок»



Рис. 6. Вид реципиента после операции

Для предупреждения тромбирования анастомозов крысе-реципиенту подкожно вводили фраксипарин в дозировке 25 анти Ха Ед/кг/сут. Для оценки кровотока в зоне сосудистого анастомоза на 4-е сутки после операции была выполнена доплерография аппаратом Минимакс-Допплер-К с ультразвуковым датчиком частотой 20 МГц, позволяющая оценить гемодинамику на глубине до 3,5 мм и регистрировать скорость кровотока от 0,01 см/с. Диаметр рабочей части датчика, находившейся в непосредственном контакте с тканью, был равен 1,5 мм. Максимальный по звуку и амплитуде сигнал получен при угле между направлением тока крови (сосудом) и лучом датчика 60 градусов (рис. 7).

Также для оценки состояния микроциркуляторного русла в пересаженном лоскуте выполняли надрез покровных тканей на всю глубину кожи.



Рис. 7. Оценка кровотока в лоскуте методом доплерографии

Общее состояние животного оценивали по следующим показателям: дыхание, активность, вес, аппетит, наличие трудностей при кормлении. Клиническими признаками отторжения служили: эритема трансплантата, отек, выпадение волос, шелушения, изъязвления, прогрессирующий некроз.

Иммуносупрессивный протокол. После комбинированной гемифациальной трансплантации крыса-реципиент получала монотерапию циклоспорином (препарат «Сандиммун Неорал»). Сандиммун Неорал, раствор для приема внутрь. Действующее вещество – циклоспорин, (циклический полипептид, состоящий из 11 аминокислот). Циклоспорин представляет собой селективный иммунодепрессант, ингибирующий активацию кальцийневрина лимфоцитов в фазе G0 или G1 клеточного цикла. Таким образом, предотвращается активация Т-лимфоцитов и на клеточном уровне – антигензависимое высвобождение лимфокинов, включая ИЛ-2 (фактор роста Т-лимфоцитов). Сандиммун Неорал (раствор для приема) имеет следующую особенность. Раствор представляет собой микроэмульсионный преконцентрат, который образует микроэмульсию в присутствии жидкости (жидкость, с которой смешивают раствор для приема внутрь перед приемом или жидкость в желудке при приеме препарата в форме капсул). За счет этого уменьшается вариабельность фармакокинетических параметров и обеспечивается линейная зависимость между дозой и эффектом циклоспорина с более равномерным профилем абсорбции и меньшей зависимостью от одновременного приема пищи. Циклоспорин вводился перорально по схеме: 0–7 сутки послеоперационного периода 16 мг/кг, затем 2 мг/кг в сутки. Продолжительность эксперимента составила 45 дней.

Для статистической обработки материала использовали программу Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

Время операции составило 275 ± 65 мин, из них время ишемии 65 ± 13 мин. Летальность – 0%. В одном наблюдении на 3 сутки после операции сформировалась зона некроза, которая составила не более 15% поверхности пересаженного лоскута. Отторжение сухого струпа произошло на 8 сутки с полным восстановлением целостности кожного покрова крысы-реципиента. В одном наблюдении из-за технических сложностей венозный анастомоз выполнить не удалось, тем не менее, композитный гемифациальный лоскут прижился.

При выполнении на 4-е сутки после операции контрольной доплерографии с установкой датчика в проекции анастомоза во всех случаях был получен сигнал, что косвенно подтверждало наличие кровотока в пересаженном лоскуте. С этой же целью выполнялся надрез кожи пересаженного лоскута вблизи наружного слухового прохода и была получена кровь в ране (рис. 8).



Рис. 8. Надрез кожи в пределах лоскута

При оценке общего состояния животных признаков нарушения дыхания отмечено не было, наблюдалось снижение активности и аппетита крыс в течение первых 4 суток.

На вторые сутки в 3 наблюдениях выявлены преходящие неврологические нарушения в виде пареза левой передней лапы силой 3 балла. Отрицательная динамика массы тела продолжалась в течение 5 суток после операции, общая потеря веса составила $32 \pm 5,6$ г, однако к 9 суткам показатели общего состояния животных стали соответствовать дооперационному уровню, и вес стабилизировался на уровне $319 \pm 11,4$ г.

На протяжении всего периода эксперимента клинических признаков отторжения не наблюдали, в связи с этим схему введения циклоспорина не корректировали.

В современном обществе специалистами и учеными активно обсуждаются хирургические, социальные и этические аспекты трансплантации лица. В настоящий момент хирургические и иммунологические аспекты выполнения трансплантации лица находятся в стадии формирования основ и обобщения знаний. Для выполнения доскональной иммунологической оценки необходимо создание экспериментальной модели.

Создание fullface (трансплантата сложного комплекса тканей всей лицевой части животного) модели технически достаточно трудоемко [4]. Этот недостаток побудил разработать модель гемифациальной трансплантации на основе общей сонной артерии и наружной яремной вены [4]. Данная операция протекала с низким числом периоперационных осложнений и технически потребовала меньших временных затрат.

Для соблюдения условий, предъявляемых к экспериментальной модели, с целью изучения иммунологического статуса после выполнения гемифациальной аллотрансплантации была предложена описанная выше методика.

Обсуждая случай выживания гемифациального трансплантата при выполнении слепого артериального анастомоза, можно предположить, что это связано с наличием выраженной сосудистой архитектоники у крыс, и наиболее вероятно, существующий анастомоз повышает устойчивость тканей к острой ишемии и сохраняет жизнеспособность трансплантата до того периода, когда устанавливаются связи между сосудами донора и ложем реципиента с восстановлением путей оттока (первые 4–5 суток). Именно в этот отрезок времени (4-е сутки) выполнена диагностическая доплерография в проекции места анастомоза и диагностический надрез кожи донорского лоскута для подтверждения его жизнеспособности. Возможность существования модели «артериального» лоскута подтверждена и литературными данными [5, 6].

Используемый анастомоз на наружной сонной артерии не влияет на кровоснабжение тканей головного мозга, что и обеспечивает низкую послеоперационную летальность.

Выбор препарата «Циклоспорин» для нашего экспериментального исследования обусловлен опытом зарубежных коллег и рядом преимуществ данного препарата перед остальными иммунодепрессантами. Циклоспорин является селективным иммунодепрессантом, действует на лимфоциты специфично и обратимо. В отличие

от цитостатиков, он не подавляет гемопоэз и не влияет на функцию фагоцитов. Циклоспорин увеличивает время жизни аллогенных трансплантатов кожи, сердца, почек, поджелудочной железы, костного мозга, тонкой кишки, легких. Циклоспорин также подавляет развитие клеточных реакций в отношении аллотрансплантата, кожные реакции гиперчувствительности замедленного типа, экспериментального аллергического энцефаломиелита, артрита, обусловленного адьювантом Фройнда, болезни «трансплантат против хозяина» (ТПХ) и зависимое от Т-лимфоцитов образование антител. Была показана эффективность применения препарата Сандимун при пересадке костного мозга и солидных органов у человека для предупреждения и лечения отторжения и болезни ТПХ, а также при лечении различных состояний, которые по своей природе являются аутоиммунными или могут рассматриваться как таковые.

Выводы

Выполненная композитная фациальная гемитрансплантация в эксперименте, может служить технически более выгодной экспериментальной моделью для изучения иммунологического статуса. Однако для получения более детальных выводов необходимо продолжение эксперимента и накопление материала.

Литература

1. *Pomahac, B.* Face transplantation / B. Pomahac, D. Nowinski, J.R. Diaz-Siso // Current problems in surgery. – 2011. – Vol. 48, № 5. – P. 293–357.
2. *Semionova, M. Z.* The Know-How of Face Transplantation / M.Z. Semionova // New York : Springer, 2011. – 512 p.
3. *Demir, Y.* Tolerance induction in composite facial allograft transplantation in the rat model / Y. Demir, S. Ozmen, A. Klimczak // Plastic and reconstructive surgery. – 2004. – Vol. 114, № 7. – P. 1790–1801.
4. *Landin, L.* Functional outcome after facial allograft transplantation in rats / L. Landin, P. Cavadas, E. Gonzalez // J Plast Reconstr Aesthet Surg. – 2008. – Vol. 61, № 9. – P. 1034–1043.
5. *Белоусов, А.Е.* Пластическая реконструктивная и эстетическая хирургия / А.Е. Белоусов. – СПб. : Гиппократ, 1998. – 744 с.
6. *Erer, C.M.* Survival of free radial forearm flap without venous return / C.M. Erer, N. Cerkes, C. Ersezin // Brit. J. Plast. Surgery. – 1991. – Vol. 44, № 1. – P. 60–61.