

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ КАПСУЛЫ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СУПЕРЛЕГКОГО ПОЛИПРОПЕЛЕН-ПОЛИВИНИЛИДЕНФТОРИДНОГО ЭНДОПРОТЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Суковатых Б.С.*, Назаренко П.М., Затолокина М.А.,
Мутова Т.В., Мутов В.Я., Гунов С.В.

ФГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск

DOI: 10.25881/20728255_2023_18_2_52

Резюме. Цель: изучить влияние аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, на динамику клеточного компонента соединительнотканной капсулы при имплантации суперлегкого полипропилен-поливинилиденфторидного эндопротеза.

Выполнено экспериментальное исследование на 50 кроликах породы Шиншилла. Сформированы 2 равные группы по 25 особей в каждой. В обеих группах на апоневроз передней брюшной стенки имплантировался суперлегкий полипропилен-поливинилиденфторидный эндопротез. В 1 (основной) группе под протез вводилась аутоплазма, обогащенная тромбоцитами, а во 2 (контрольной) — не вводилась. Проведены гистологическое и иммуногистохимическое исследования с моноклональными антителами к маркеру клеточной пролиферации Ki-67. Оценивали динамику толщины клеточной стенки капсулы, воспалительной и фибробластической реакций и индекса пролиферации.

Результаты: После введения аутоплазмы отмечается статистически достоверное увеличение толщины капсулы в конце эксперимента в 2,8 раза, снижение выраженности воспалительной реакции на 7 сутки в 1,5 раза, увеличение фибропластической реакции от 1,9 до 2,3 раз, повышение пролиферативной активности клеток от 1,3 до 2,7 раза на различных сроках эксперимента.

Заключение: Введение плазмы, обогащенной тромбоцитами, повышает пролиферативную активность клеток соединительной ткани.

Ключевые слова: эксперимент, суперлегкий полипропилен-поливинилиденфторидный эндопротез, аутоплазма, обогащенная тромбоцитами, клетки соединительной ткани, пролиферативная активность.

Введение

В 21 веке в хирургической практике вентральных грыж широкое распространение получило эндопротезирование брюшной стенки, что обеспечило снижение рисков развития рецидивов до 3–5% [1]. Для закрытия грыжевых дефектов брюшной стенки наиболее часто применяются стандартные с диаметром нити 120 микрон и тяжелые с диаметром нити 140 микрон синтетические импланты, которые формируют очень прочный соединительно-тканый рубец [2]. Отрицательным свойством применение таких имплантов является ограничение подвижности брюшной стенки за счет вовлечения мышечно-апоневротических структур в соединительнотканый рубец [3]. У пациентов развивается хронический болевой синдром при выполнении повседневной работы, появляется чувство ощущения

DYNAMICS OF THE CELLULAR COMPONENT OF THE CONNECTIVE TISSUE CAPSULE DURING IMPLANTATION OF A SUPER-LIGHT POLYPROPYLENE-POLYVINYLIDENE FLUORIDE ENDOPROSTHESIS (EXPERIMENTAL STUDY)

Sukovatykh B.S.*, Nazarenko P.M., Zatulokina M.A., Butova T.V., Mutov V.Y., Egunov S.V.

Kursk State Medical University, Kursk

Abstract. Objective: to study the effect of platelet-enriched autoplasm on the dynamics of the cellular component of the connective tissue capsule during implantation of a super-light polypropylene-polyvinylidene fluoride endoprosthesis.

An experimental study was performed on 50 Chinchilla rabbits. 2 equal groups of 25 individuals each were formed. In both groups, a super-lightweight polyvinylidene fluoride endoprosthesis was implanted on anterior abdominal wall aponeurosis. In the 1st (main) group, platelet-enriched autoplasm was injected under the prosthesis, and in the 2nd (control) group, it was not injected. Histological and immunohistochemical studies with monoclonal antibodies to the marker of cell proliferation Ki-67 were carried out. The dynamics of the capsule cell wall thickness, inflammatory and fibroblastic reactions, and proliferation index were evaluated.

Results: After the introduction of autoplasm, there was a statistically significant increase in the thickness of the capsule at the end of the experiment by 2.8 times, a decrease in the severity of the inflammatory reaction on day 7 by 1.5 times, an increase in the fibroplastic reaction from 1.9 to 2.3 times, an increase in the proliferative activity of cells from 1.3 to 2.7 times at various periods of the experiment.

Conclusion: The administration of plasma enriched with platelets increases the proliferative activity of connective tissue cells.

Keywords: experiment, super-light polypropylene-polyvinylidene fluoride endoprosthesis, platelet-enriched autoplasm, connective tissue cells, proliferative activity.

«инородного тела» в брюшной стенке, снижается качество жизни [4].

Одной из тенденций современной герниологии является смещение акцента в сторону имплантации легких с диаметром нити 90 микрон и супер легких с диаметром нити 70 микрон синтетических протезов, на внедрение которых не развивается грубого соединительнотканного рубца [5]. К сожалению при имплантации легких протезов формируется не достаточно прочная соединительнотканная капсула из-за малого количества клеточного компонента, что при водит к увеличению рецидивов грыжи до 8–10% [6].

Для стимуляции регенераторных процессов в зоне герниопластики стали применять эмбриональные фибробласты, аскорбиновую кислоту, оротат калия, солкосерил и другие лекарственные препараты [7].

* e-mail: sukovatykhbs@kursksmu.net

Большую известность для стимуляции репаративных процессов в различных областях медицины получила аутоплазма, обогащённая тромбоцитами (АпОТ), которая содержит факторы роста. Факторы роста оказывают воздействие на все репаративные процессы и являются естественными полипептидами нашего организма [8]. Полное влияние АпОТ на течение раневого процесса изучено не до конца и остаётся открытыми ряд интересующих аспектов, которые представлены в данной работе. В частности остаётся не изученной влияние АпОТ на динамику клеточного компонента соединительнотканной капсулы вокруг протеза.

Цель: изучить влияние АпОТ на динамику клеточного компонента соединительнотканной капсулы при имплантации суперлегкого полипропилен-поливинилиденфторидного эндопротеза.

Материалы и методы

Эксперимент был выполнен на кроликах породы Chinchilla в количестве 50. Животных разделили на две равные группы по 25 особей в каждой. В обеих группах выполнялось эндопротезирование на апоневроз передней брюшной стенки суперлегким полипропилен-поливинилиденфторидным эндопротезом с диаметром нити 70 микрон. Животным первой группы под эндопротез вводили АпОТ, а второй группе не вводили АпОТ. Подробная технология экспериментального исследования представлена нами в предшествующей работе [9].

Для проведения гистологического исследования выполнялось иссечение передней брюшной стенки, обязательно вместе с имплантированным протезом. Потом проводилась фиксация в растворе нейтрального формалина с последующей заливкой парафином по общепринятой методике. Половина полученного материала направлена для гистологического, а другая — для иммуногистохимического исследования.

При изучении гистологических препаратов оценивали динамику толщины клеточной стенки капсулы в микрометрах (мкм), воспалительной и фибробластической реакций по процентному количеству клеток воспалительного и фибробластического ряда в соединительнотканной капсуле.

Иммуногистохимическое исследование выполняли с моноклональными антителами к маркеру клеточной пролиферации Ki-67, проводимую в соответствии с протоколом Ultra — Vision ONE [10]. Ядерный антиген Ki-67 даёт возможность при взаимодействии с моноклональными антителами определить клетки находящиеся в фазе клеточного цикла, так как они будут окрашиваться, а клетки в покое не будут.

Интенсивность деления клеток оценивали по возможности клеток давать положительную экспрессию Ki-67 в непересекающихся полях зрения, что свидетельствует о нахождении клеток в активной фазе клеточного цикла. После был выполнен расчёт индекса пролиферации (ИП), который является прямым отношением количества кле-

ток с положительной реакцией на Ki-67 к общему числу клеток в поле зрения. Данное соотношение для удобства было переведено в %.

Статистическую обработку выполнили в программе Microsoft Office «Excel 2010». Полученные цифровые значения в результате эксперимента обрабатывали для оценки статистической значимости расхождения средних значений в сравниваемых группах. Определяли значение среднего арифметического (M) и ошибку средней арифметической (m). При изучении типа распределения было принято решение использования критерия Манна-Уитни для оценки достоверности. Данное решение принято из-за высокого отклонения от кривой Гауссова распределения. Из-за низкой чувствительности к непараметрическим методикам, был выбран уровень значимости $p \leq 0,05$, соответствующий экспериментальным медико-биологическим исследованиям.

Результаты и обсуждение

Изменения с течением времени толщины перипротезной капсулы после имплантации суперлегкого эндопротеза продемонстрированы на рисунке 1.

Увеличение толщины капсулы напрямую зависит от наличия обогащенной тромбоцитами аутоплазмы. Так к 7 суткам отмечается статистически достоверное увеличение толщины капсулы в группе с введением АпОТ на 1,3 раза, а под конец эксперимента уже в 2,8 раза, чем в группе без введения АпОТ ($p \leq 0,05$).

О динамике воспалительной реакции в соединительнотканной капсуле судили по изменению количества клеток воспалительного ряда: гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов, тучных клеток. Интенсивность изменения воспалительной реакции, после имплантации суперлегкого эндопротеза представлена на рисунке 2.

Количество клеток воспалительного ряда на 3 сутки эксперимента с введением АпОТ было в 1,22 раза больше по сравнению с группой без введения АпОТ. На 7 сутки в группе животных без введения АпОТ произошло увеличение воспалительной реакции в 1,1 раза, а в группе с введением АпОТ наоборот произошло снижение количества

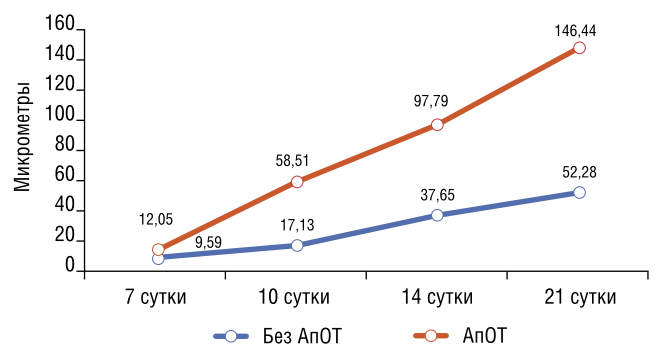


Рис. 1. Динамика изменения толщины перипротезной капсулы.

Суковатых Б.С., Назаренко П.М. и др.

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ КАПСУЛЫ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СУПЕРЛЕГКОГО ПОЛИПРОПЕЛЕН-ПОЛИВИНИЛИДЕНФТОРИДНОГО ЭНДОПРОТЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

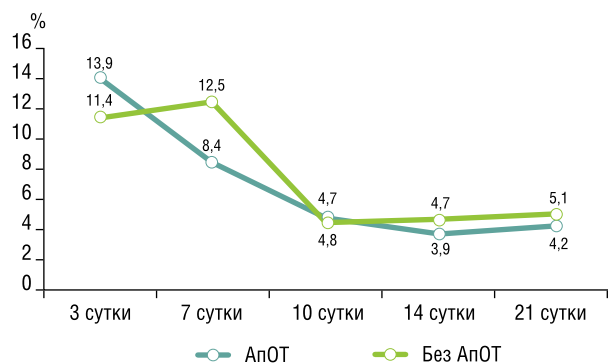


Рис. 2. Динамика клеток воспалительного ряда в перипротезной капсуле.

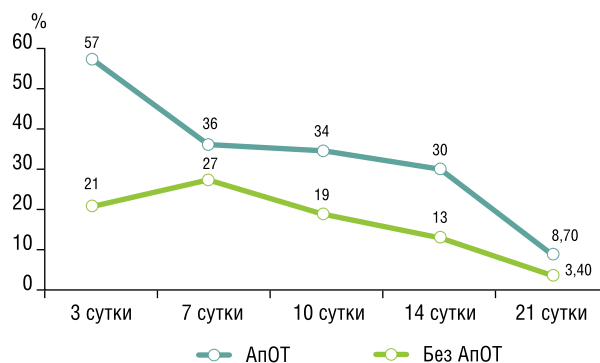


Рис. 4. Динамика индекса пролиферативной активности.

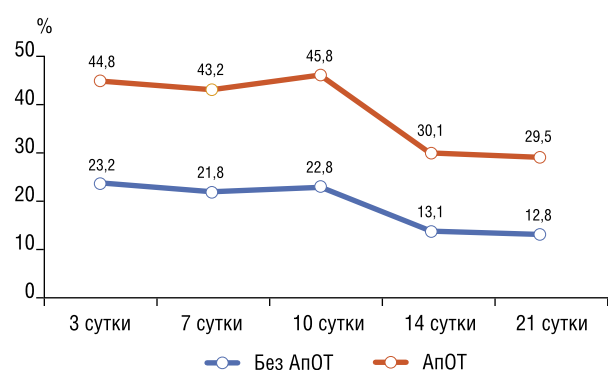


Рис. 3. Динамика клеток фибробластического ряда в перипротезной капсуле.

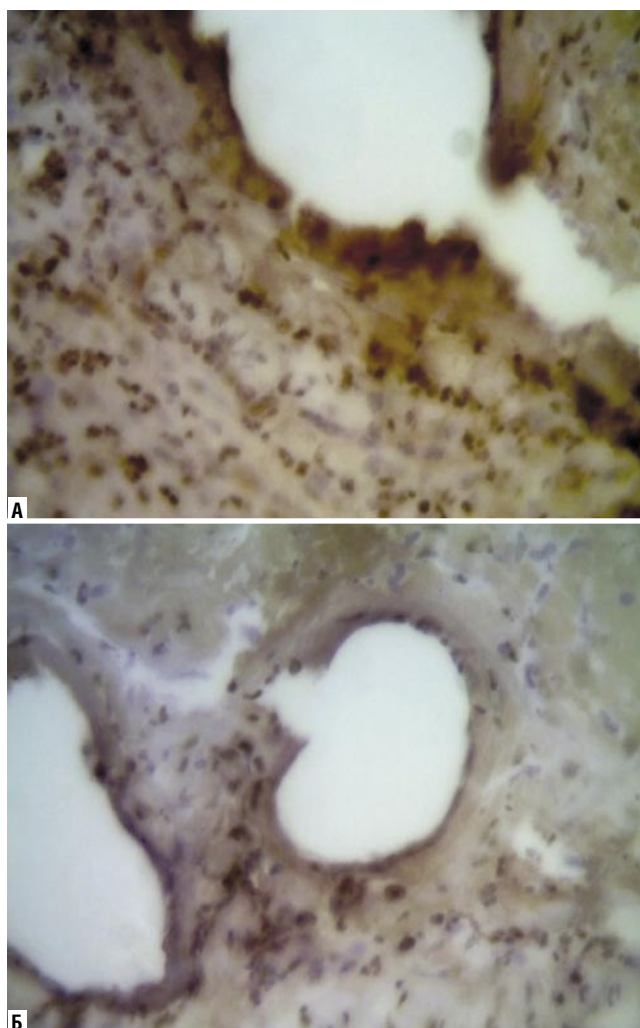
клеток воспаления в 1,7 раза. К 10 суткам эксперимента воспалительный процесс вокруг капсулы завершился в обеих группах.

Изменения количества макрофагов, фибробластов и фиброцитов показывающих интенсивность фибробластической реакции, после имплантации суперлегкого эндопротеза представлено на рисунке 3.

У животных в условиях эксперимента после введения АпОТ в область протеза наблюдалось увеличение фибробластической реакции, которая превосходила реакцию у животных без введения АпОТ. На 3 сутки она была больше в 1,9 раза, на 7 сутки и на 10 суток в 2 раза, на 14 сутки и на 21 сутки в 2,3 раза ($p \leq 0,05$).

Далее проведен анализ иммуногистохимического исследования пролиферативной активности клеточного компонента соединительной ткани, окружающей суперлегкий эндопротез, по экспрессии Ki-67. Динамика индекса пролиферативной активности представлена на рисунке 4.

На 3 сутки исследования в условиях АпОТ обнаружены более половины клеток в активной фазе с положительной экспрессией Ki-67 от общего их количества, окружающих протез. Индекс пролиферации на 3 сутки эксперимента выше в группе с введением АпОТ в 2,7 раза (Рис. 5 А), чем в группе без ее введения (Рис. 5 Б) ($p \leq 0,05$).

Рис. 5. Микрофотография тканей, окружающих нити эндопротеза, на 3 сутки эксперимента. А — в условиях применения АпОТ. Б — без применения АпОТ. Иммуногистохимическая реакция, DAB. Ув. $\times 200$.

На 7-е сутки эксперимента отмечено, что в условиях АпОТ происходит снижение пролиферативной активности по сравнению с 3-ми сутками 1,6 раза. Однако, по сравнению с группой без введения АпОТ индекс пролиферации оказался в 1,3 раза выше (Рис. 6 А, Б) ($p \leq 0,05$).

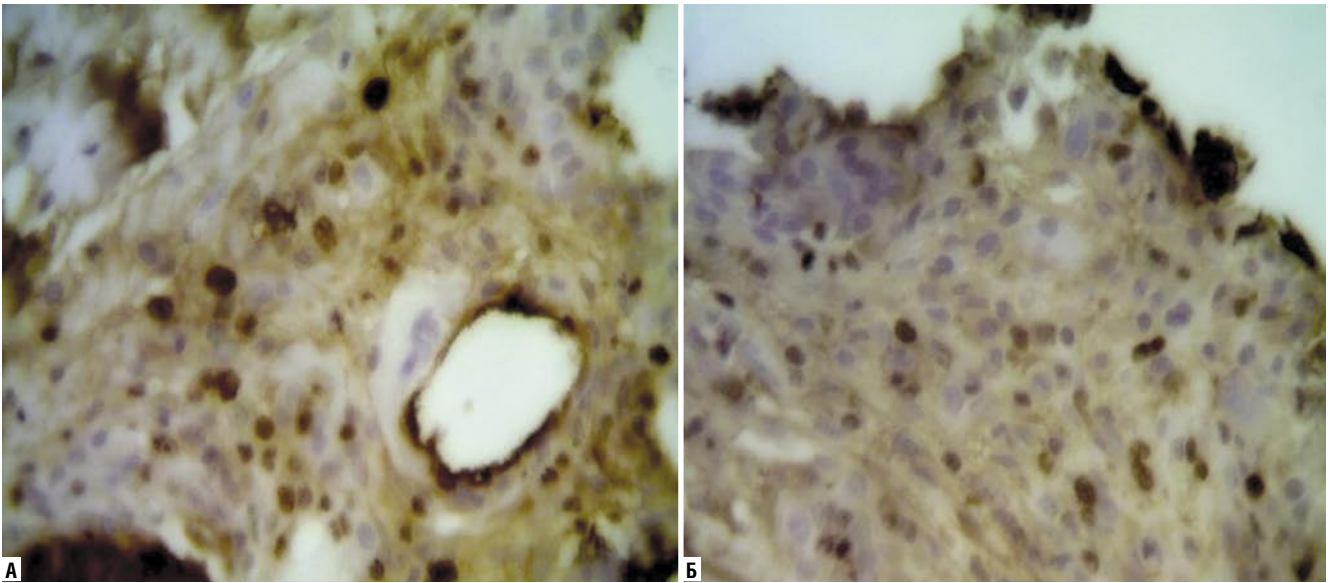


Рис. 6. Микрофотография тканей, окружающих нити эндопротеза, на 7-е сутки эксперимента. А — в условиях применения АпОТ. Б — без применения АпОТ. Иммуногистохимическая реакция, DAB. Ув. $\times 400$.

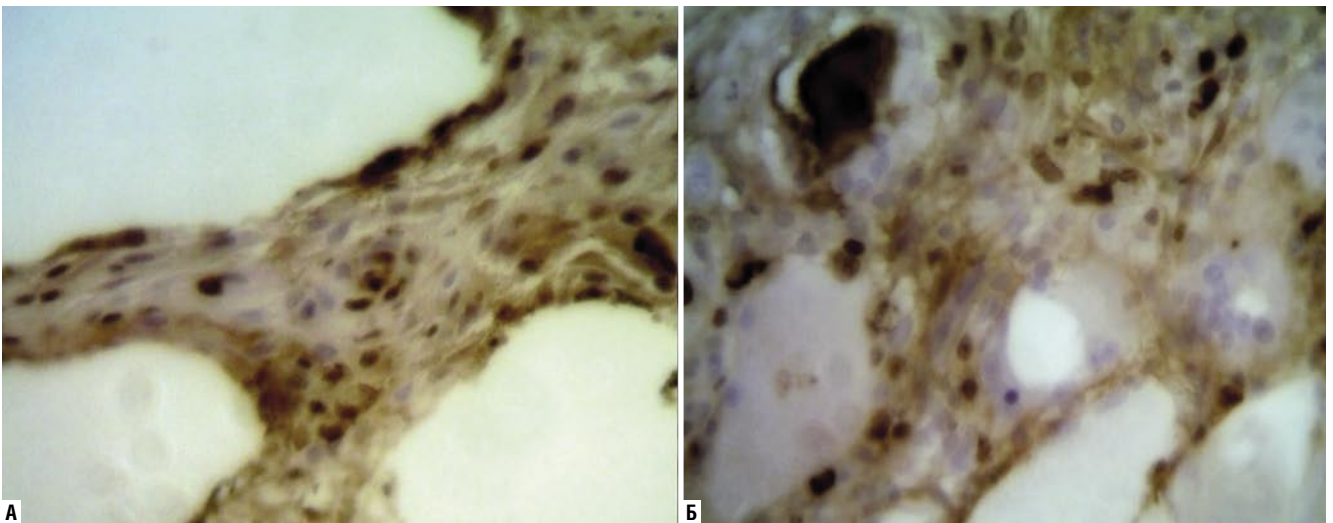


Рис. 7. Микрофотография тканей, окружающих нити эндопротеза, на 10 сутки эксперимента. А — в условиях применения АпОТ. Б — без применения АпОТ. Иммуногистохимическая реакция, DAB. Ув. $\times 400$.

К 10-м суткам пролиферативная активность продолжает идти на спад в обеих группах. Индекс пролиферации в группе с введением АпОТ выше, чем без ее введения в 1,8 раза ($p \leq 0,05$) (Рис. 7 А, Б).

На 14-е сутки эксперимента зарегистрировано сильное снижение плотности клеток на единицу площади, что по своей сути свидетельствует о сильном снижении клеток воспалительного ряда. Наибольшая пролиферативная активность клеток выявлена в условиях применения АпОТ. Пролиферативная активность в данной группе выше в 2,3 раза, чем в группе без ее введения ($p \leq 0,05$) (Рис. 8 А, Б).

На 21-е сутки (окончание эксперимента) выявлено заметное снижение пролиферативной активности клеток

в обеих группах в 3,5 раза, что объясняется наличием перипротезной капсулы, а также зрелостью соединительнотканых волокон. Индекс пролиферации в условиях АпОТ выше в 2,7 раза, чем в группе без использования аутоплазмы ($p \leq 0,05$) (Рис. 9 А, Б).

Таким образом, наибольшая пролиферативная активность клеток соединительной ткани в группе животных с введением АпОТ отмечена на 3 сутки эксперимента, а в группе животных без введения плазмы на 7 сутки. На всех сроках эксперимента пролиферативная активность в группе с введением АпОТ превосходила аналогичный показатель в контрольной группе. Введение АпОТ в область имплантации протеза позволяет повысить клеточный компонент соединительнотканной капсулы.

Суковатых Б.С., Назаренко П.М. и др.

ДИНАМИКА КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННОЙ КАПСУЛЫ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СУПЕРЛЕГКОГО ПОЛИПРОПЕЛЕН-ПОЛИВИНИЛИДЕНФТОРИДНОГО ЭНДОПРОТЕЗА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

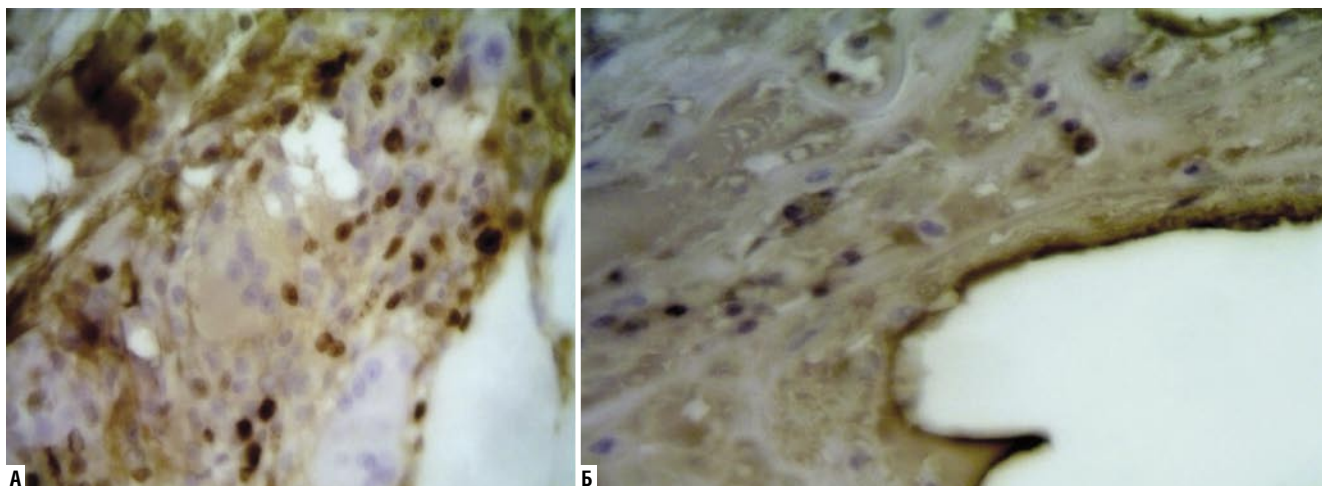


Рис. 8. Микрофотография тканей, окружающих нити эндопротеза, на 14-е сутки эксперимента. А — в условиях АпОТ. Б — без применения АпОТ. Иммуногистохимическая реакция, DAB. Ув. $\times 400$.

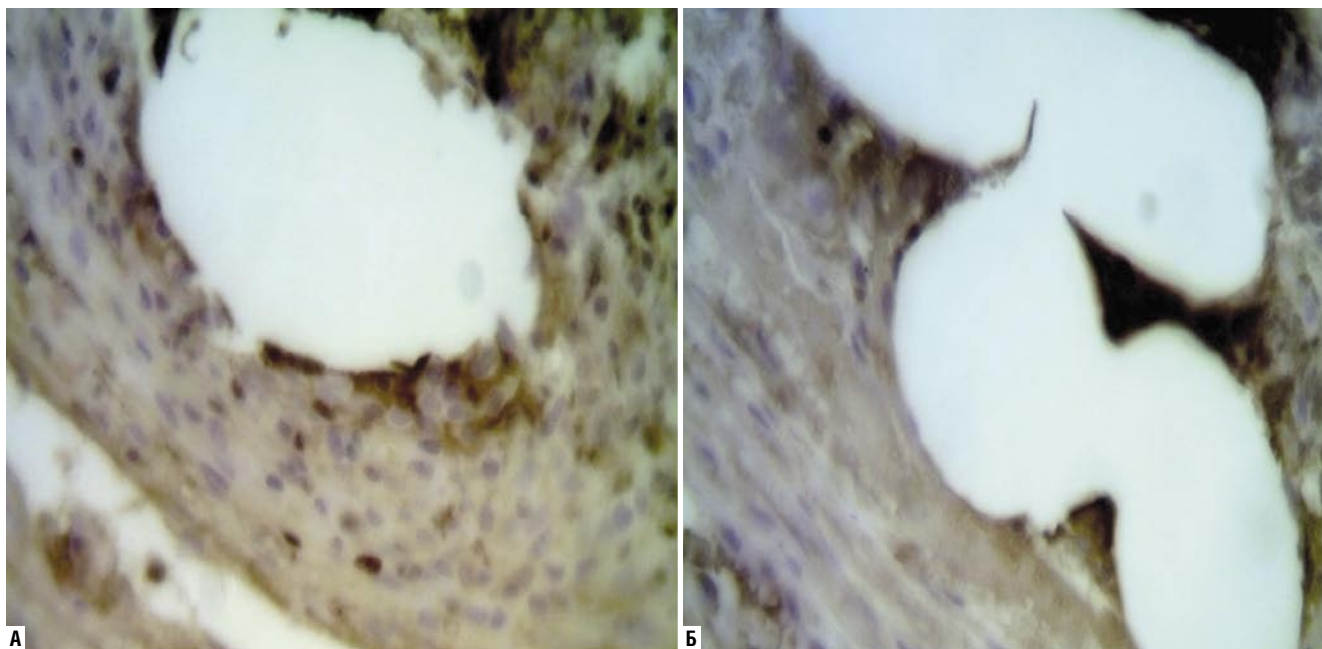


Рис. 9. Микрофотография тканей, окружающих нити эндопротеза на 21-е сутки эксперимента. А — в условиях введения АпОТ. Б — без применения АпОТ. Иммуногистохимическая реакция, DAB. Ув. $\times 400$.

Вывод

Введение аутоплазмы, обогащённой тромбоцитами, в зону имплантации суперлегкого полипропилен-поливинилиденфторидного эндопротеза позволяет повысить пролиферативную активность клеток соединительной ткани и к концу эксперимента сформировать в 2,8 раза более прочную соединительнотканную капсулу, чем у животных без введения аутоплазмы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Klinge U., Klosterhalfen B. Modified classification of surgical meshes for hernia repair based on the analyses of 1,000 explanted meshes. *Hernia*. 2012; 16(3): 251-258. doi: 10.1007/s10029-012-0913-6.
2. Егиев В.Н., Чижов Д.В., Филаткина Н.В. Взаимодействие полипропиленовых эндопротезов с тканями передней брюшной стенки // *Герниология*. — 2005. — №2. — С.41-49. [Egiev VN, Chizhov DV, Filatkina NV. Interaction of polypropylene endoprosthesis with tissues of the anterior abdominal wall. *Herniology*. 2005; 2: 41-49. (In Russ.)]
3. Anurov MV, Titkova SM, Oettinger AP. Biomechanical compatibility of surgical mesh and fascia being reinforced: dependence of experimental hernia defect repair results on anisotropic surgical mesh positioning. *Hernia*. 2012; 16(2): 199-210. doi: 10.1007/s10029-011-0877-y.

4. Шестаков А.Л., Федоров Д.Н., Иванчик И.Я., Боева И.А., Битарев Т.Т. Сравнительная оценка стандартных композитных и «облегченных» синтетических протезов, применяемых для герниопластики (экспериментальная работа) // Человек и его здоровье. — 2017. — №2. — С.81-87. [Shestakov AL, Fedorov DN, Ivanchik IYa, Boeva IA, Bitarev TT. Comparative evaluation of standard composite and "lightweight" synthetic prostheses used for hernioplasty (experimental work). *Man and his Health*. 2017; 2: 81-87. (In Russ.)] doi: 10.21626/vestnik/2017-2/14.
5. Lintin LAD, Kingsnorth AN. Mechanical failure of a lightweight polypropylene mesh. *Hernia*. 2014; 18(1): 131-133. doi: 10.1007/s10029-012-0959-5.
6. Petro CC, et al. Central failures of lightweight monofilament polyester mesh causing hernia recurrence: a cautionary note. *Hernia*. 2015; 19(1): 155-159. doi: 10.1007/s10029-014-1237-5.
7. Иванов И.С., Лазаренко В.А., Иванов С.В., Горьянова Г.Н., Иванов А.В., Тарабрин Д.В., Литвинова М.И. Соотношение коллагена I и III типов в коже и апоневрозе у пациентов с вентральными грыжами // Новости хирургии. — 2013. — №3. — С.33-36. [Ivanov I.S., Lazarenko V.A., Ivanov S.V., Goryainova G.N., Ivanov A.V., Tarabrin D.V., Litvinova M.I. The ratio of collagen types I and III in the skin and aponeurosis in patients with ventral hernias. *Surgery News*/ 2013; 3:33-36. (In Russ.)]
8. Ачкасов Е.Е. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике // Биомедицина. — 2013. — №4. — С.46-59. [Achkasov EE. Application of platelet-enriched autoplasm in clinical practice. *Biomedicine*. 2013; 4: 46-59. (In Russ.)]
9. Суковатых Б.С., Затолокина М.А., Мутова Т.В., Валуйская Н.В., Жуковский В.А. Эффективность стимуляции репаративных процессов плазмой, обогащенной тромбоцитами, при эндопротезировании брюшной стенки // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. — 2018. — №11 (4). — С.256-265. [Sukovatykh BS, Zato-lokina MA, Butova TV, Valuyskaya NV, Zhukovsky VA. Efficiency of stimulation of reparative processes with platelet-enriched plasma during abdominal wall endoprosthetics. *Bulletin of Experimental and Clinical Surgery*. 2018; 11(4): 256-265. (In Russ.)] doi: 10.18499/2070-478X-2018-11-4-275-284.
10. Fulawka L, Blaszczyk J, Tabakov M. Assessment of Ki-67 proliferation index with deep learning in DCIS (ductal carcinoma in situ). *Sci.Rep*. 2022; 12(1): 3166. doi: 10.1038/s41598-022-06555-3.