

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

<https://doi.org/10.52581/1814-1471/80/05>
УДК 591.498-005.9-021.6-06:591.87:591.4.068.1

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОЖЕ И ПОДКОЖНОЙ КЛЕТЧАТКЕ ПРИ СОЗДАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛИМФЕДЕМЫ НА ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ БЕЛОЙ КРЫСЫ

В.Ф. Байтингер^{1,2}, И.В. Суходоло³, О.С. Курочкина^{✉1,3}, М.Е. Павлова³,
Ю.В. Кистенёв⁴, Н.А. Кривова⁴, А.В. Талецкий⁵, В.В. Николаев⁴

¹ НИИ микрохирургии, Томск, Российская Федерация

² Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация

³ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Томск, Российская Федерация

⁴ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Томск, Российская Федерация

⁵ Томский областной онкологический диспансер, Томск, Российская Федерация

Аннотация

В статье описано воссоздание модели лимфедемы задней конечности крысы по методике V. Triassa и соавт. (2019), подробно представлены морфологические изменения в коже и подкожной клетчатке животных на разных сроках развития хронического лимфатического отека. Гистологические изменения в тканях дермы и гиподермы до 3 мес характерны для острого лимфатического отека, с 4-го по 6-й мес гистологическая картина соответствует стадии компенсации. Наиболее выраженные изменения, типичные для хронического лимфатического отека, развиваются к 6-му мес.

Ключевые слова: модель лимфедемы, гистология, морфометрия, хронический лимфатический отек.

Конфликт интересов: авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Байтингер В.Ф., Суходоло И.В., Курочкина О.С., Павлова М.Е., Кистенёв Ю.В., Кривова Н.А., Талецкий А.В., Николаев В.В. Морфологические изменения в коже и подкожной клетчатке при создании экспериментальной модели лимфедемы на задней конечности белой крысы // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2022. Т. 25, № 1. С. 40–52. doi 10.52581/1814-1471/80/05

NEW TECHNOLOGIES

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SKIN AND SUBCUTANEOUS TISSUE DURING THE CREATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF LYMPHEDEMA ON THE HIND LIMB OF A WHITE RAT

V.F. Baytinger^{1,2}, I.V. Sukhodolo³, O.S. Kurochkina^{✉1,3}, M.E. Pavlova³, Yu.V. Kistenev⁴,
N.A. Krivova⁴, A.V. Taletskiy⁵, V.V. Nikolaev⁴

¹ Institute of Microsurgery, Tomsk, Russian Federation

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,
Krasnoyarsk, Russian Federation

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation⁴ National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation⁵ Tomsk Regional Oncological Center, Tomsk, Russian Federation**Abstract**

The paper describes the reconstruction of the rat hind limb lymphedema model according to the method of V. Triacca et al. (2019), presents in detail morphological changes in the skin and subcutaneous tissue of animals at different stages of the development of chronic lymphatic edema. Histological changes in the tissues of the dermis and hypodermis up to 3 months are characteristic of acute lymphatic edema, from the 4th to the 6th month the histological picture is characteristic of the compensation stage. The most pronounced changes characteristic of chronic lymphatic edema develop by the 6th month.

Keywords: lymphedema model, histology, morphometry, chronic lymphatic edema

Conflict of interest: the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this paper.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Baytinger V.F., Sukhodolo I.V., Kurochkina O.S., Pavlova M.E., Kistenev Yu.V., Krivova N.A., Taletskiy A.V., Nikolaev V.V. Morphological changes in the skin and subcutaneous tissue during the creation of an experimental model of lymphedema on the hind limb of a white rat. *Issues of Reconstructive and Plastic Surgery*. 2022;25(1):40–52. doi 10.52581/1814-1471/80/05

ВВЕДЕНИЕ

Лимфедема конечности – это отек мягких тканей, возникающий в результате накопления богатой белком жидкости в интерстициальном пространстве и вызванный недостаточностью лимфодренажа в комбинации с недостаточной экстралимфотической утилизацией белков, приводящий к фиброзным изменениям кожи и подкожной клетчатки [1]. Лимфедема является хроническим прогрессирующим заболеванием, результаты лечения которого зависят от стадии морфологических изменений в тканях. В литературе описано большое количество моделей лимфатического отека, но добиться его клинического проявления весьма сложно, поэтому заключение о развитии отека в тканях животного чаще всего делается на основании данных гистологического исследования биоптатов либо других методов оценки функционального состояния лимфатической системы. К одному из таких методов относится лимфофлюорография, которая была применена при создании модели лимфедемы на задней конечности крысы V. Триасса и соавт. (2019) [2]. Благодаря лимфофлюорографии была доказана эффективность предложенной этими авторами модели нарушения оттока лимфы на ранних сроках после лимфоденэктомии в сочетании с лучевой терапией. Поскольку результат хирургических и консервативных методов лечения лимфедемы конечностей наиболее выражен на ранних стадиях патологического процесса, то изучение динамики морфологических изменений в коже и подкожной клетчатке при скрытом развитии патологического процесса является весьма актуальным.

Цель исследования: изучить динамику морфологических изменений в коже и подкожной клетчатке задней конечности крысы на ранних стадиях развития хронического лимфатического отека.

Задачи исследования:

1. Воссоздать модель хронического лимфатического отека конечности в эксперименте путем комбинации паховой и подколенной лимфодиссекции и лучевой терапии.

2. Провести динамическое гистологическое исследование кожи и подкожной клетчатки задней конечности крысы при создании модели лимфедемы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 16 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой тела 200–250 г. Возраст животных составил 8–10 нед.

Животные были разделены на две группы: 1-я группа ($n = 10$) – животные с моделью лимфедемы задней конечности после проведения лимфодиссекции подколенных и паховых лимфатических узлов и лучевой терапии по методике V. Триасса и соавт. (2019) [2]; 2-я группа ($n = 6$) – контрольная.

Техника оперативного вмешательства и алгоритм лучевой терапии во 1-й группе

Под общей анестезией препаратом «Золетил» (Virbac, Франция) в дозе 2 мг/кг массы тела животного и «Рометар» (Boiveta, Чехия) 1,5–2,0 мг/кг массы животного выполняли депиляцию паховой области и задней конечности крысы.

В тыльную поверхность лапы для идентификации подколенных и паховых лимфатических узлов подкожно вводили 0,1 мл 0,01%-го раствора метиленового синего комнатной температуры. Поглаживающими движениями в области тыла стопы, голени и паха проводили лимфодренажный массаж задней конечности в течение 5–7 мин. В подколенной области через разрез длиной до 1 см выделяли подколенный лимфатический узел, окрашенный метиленовым синим. Узел иссекали с окружающей подкожно-жировой клетчаткой, пересекая идущий к нему глубокий лимфатический коллектор (рис. 1, а). На кожу накладывали узловые швы.

В паховой области выполняли разрез длиной до 2,5–3,0 см, проводили ревизию с выделением паховых лимфатических узлов. Следует отметить, что окрашивание паховых лимфатических узлов наблюдали только в одном случае, в остальных случаях контраст не доходил до паховой области. Для достоверности полного иссечения неокрашенных паховых лимфатических узлов проводили резекцию всей подкожно-жировой клетчатки паховой области площадью 4 × 2 см (рис. 1, б). Накладывали узловые швы на кожу (рис. 1, в).

Послеоперационное облучение мягких тканей задней конечности проводили через 1 мес после операции. Время лучевой терапии было выбрано исходя из расчета того, что в ближайшие 3 нед с момента операции в тканях обычно наблюдается послеоперационный отек.

Процедуру лучевого воздействия проводили под наркозом. Животное располагали на спине с фиксацией задней конечности, на область которой устанавливали рентгеновский коллиматор площадью 3 × 4 см (рис. 2). Глубина воздействия рентгеновских лучей – 1,5 см. Близкофокусная рентгенотерапия проводилась на аппарате X-Strahl 200 (Xstrahl, Великобритания). Поглощенная доза составляла 20 Гр за 20 мин (4 раза по 5 мин с интервалом между сеансами облучения – 2 мин). Расчет дозы проводили в соответствии с модифицированной и дополненной моделью ВДФ (время – доза – фракционирование) для коротко дистанционной рентгенотерапии в дозоэквивалентных режимах.

Наблюдение за животным вели из диспетчерской через видеокамеру в режиме реального времени (рис. 3).



Рис. 1. Этапы операции: а – окрашенный метиленовым синим подколенный лимфатический узел; б – вид послеоперационных ран паховой и подколенной области с иссеченными тканями. в – окончательный вид послеоперационных ран в подколенной и паховой областях

Fig. 1. Stages of the surgery: а – popliteal lymph node stained with methylene blue; б – view of postoperative wounds of the inguinal and popliteal region with excised tissues. в – final view of postoperative wounds in the popliteal and inguinal areas

Рис. 2. Внешний вид установки и размещение экспериментального животного во время облучения



Fig. 2. View of the device and placement of the experimental animal during irradiation

Рис. 3. Вид с экрана монитора за процессом работы установки во время облучения



Fig. 3. View from the monitor screen of the process of operation of the installation during irradiation

Через 1 мес после операции и через 2 нед с момента лучевой терапии (1,5 мес от начала эксперимента) проводили измерение и сравнение длин окружности прооперированной и здоровой задних конечностей животного. Измерение проводили в см по точкам (рис. 4, 5). Первая точка измерения размечалась на 1 см выше пяточной кости. Рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили для каждого измерения. По формуле усеченного конуса рассчитывали объем голени (см³) от первой до пятой точки (для достоверности вычисляли два объема – от первого до третьего измерения и от третьего до пятого измерения, а затем выполняли их сложение). Для объемов также рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Так как объем выборок был небольшим, для дальнейшего сравнения использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Statistica 7.0).

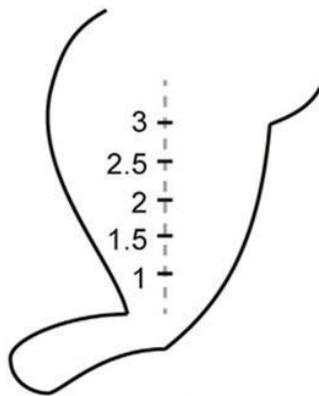


Рис. 4. Схематическое изображение точек для проведения измерения окружности задней конечности (точки расположены на 1; 1,5; 2; 2,5 и 3 см выше пяточной кости)

Fig. 4. Schematic representation of points for measuring the circumference of the hind limb (the points are located 1; 1.5; 2; 2.5 and 3 cm above the calcaneus)



Рис. 5. Измерение длины окружности задней конечности лентой Jobst

Fig. 5. Measuring the circumference of the hind limb with a Jobst tape

Биоптаты кожи (собственно дерма и гиподерма) внутренней поверхности задней конечности крыс подвергали стандартному гистологическому исследованию. Биоптаты забирали через 1, 2, 3, 4 и 6 мес под наркозом. В качестве контроля использовали фрагменты кожи аналогичных участков задней конечности животных контрольной группы (n = 6). Биоптаты фиксировали в 10–12%-м растворе нейтрального формалина (BioVitrum, Санкт-Петербург) в течение 24 ч, промывали и дегидратировали, затем заливали в парафин. Изготавливали парафиновые срезы толщиной 5–7 мкм при помощи ротационного микротомы Accu-Cut SRM™200 (Sakura, Япония) и окрашивали гистологические препараты гематоксилином и эозином [3].

С помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot G10 (Япония) выполняли съемку гистологических препаратов с 6 биоптатов для каждой контрольной точки, с которых снимали по 7–10 случайных полей зрения для каждого биоптата (ув. 100, ув. 200).

На гистологических препаратах проводили морфометрический анализ сосудистых и тканевых реакций в дерме и гиподерме задней конечности крысы при развитии лимфатического отека.

Цифровые фотографии подвергали морфометрическому исследованию с использованием компьютерной программы ImageJ 1.43 (режим доступа <http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>). За единицу измерения принимали 1 мм² ткани биоптата. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием функции Plugin «Grid» в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, высчитывали объемную плотность сосудов микроциркуляторного русла (%) и диаметр просвета сосуда (мкм) [4, 5].

Для оценки тканевых реакций измеряли толщину (мкм) эпидермиса, сосочкового и сетчатого слоев дермы и гиподермы, коллагеновых волокон в 50 полях зрения. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием функции Plugin «Grid» в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли объемную плотность соединительной ткани и тканевой жидкости (%).

Через 6 мес животных выводили из эксперимента внутримышечным введением препарата «Zoletil-100» в дозе 5 мг/кг массы тела с последующей декапитацией.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью пакета программ Statistica 7.0. При статистической обработке количественных данных проверяли гипотезу о нормальном законе распределения полученных данных. Для этого применяли критерий Шапиро–Вилка. Полученные результаты не подчинялись закону нормального распределения, поэтому для описания этих данных ис-

пользовали медиану Me , нижний и верхний квартили (Q_{25} ; Q_{75}). Для определения статистической значимости различий количественных признаков применяли непараметрические критерии: U -критерий Манна-Уитни для независимых выборок и критерий Вилкоксона – для зависимых выборок. Различия двух сравниваемых величин (исследуемых и контрольных значений) считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Протокол экспериментального исследования был одобрен комитетом по биоэтике НИ ТГУ (выписка из протокола заседания № 1 от 02.04.2019).

Работу выполняли в лаборатории экспериментальной физиологии НИИББ НИ ТГУ, на кафедре морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, на базе АНО «НИИ микрохирургии».

РЕЗУЛЬТАТЫ

При внешнем осмотре задних конечностей крыс через 1,5 мес с момента начала эксперимента (1 мес после операции и 2 нед с момента

облучения) не было отмечено видимой разницы в объеме прооперированной и облученной конечности в сравнении со здоровой. При расчете медиан, верхнего и нижнего квартилей для окружностей в разных точках области голени задней конечности и для объемов голени в этой области не было выявлено статистически значимых различий между здоровой конечностью и конечностью с моделью хронического лимфатического отека (табл. 1).

При гистологическом исследовании кожи внутренней поверхности задней конечности крыс через 1 мес после оперативного вмешательства до начала лучевой терапии гиподерма по сравнению с таковой в группе контроля характеризовалась выраженным фиброзом и присутствием лишь единичных адипоцитов (рис. 6, 7). В сетчатом слое дерма обильно васкуляризована, что является признаком усиленного ангиогенеза, сосуды полнокровны.

В сосочковом слое дермы выявлено избыточное скопление жидкости, в сетчатом слое – нерегулярные межфибрилярные пространства (рис. 7, б).

Таблица 1. Длины окружностей (см) и объемы (см³) задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Table 1. Circumference (cm) and volume (cm³) of the hind limb of a rat in the shin area when creating a model of lymphedema, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Группа	Длина окружности конечности, см					Объем, см ³
	P1	P2	P3	P4	P5	
Голень, контроль (1 мес)	3,85 (3,20; 3,90)	4,65 (4,00; 4,90)	6,10 (5,10; 7,10)	7,55 (7,00; 7,80)	7,65 (7,50; 8,00)	5,83 (4,32; 6,72)
Голень, операция (1 мес)	3,45 (3,20; 3,60)	4,55 (4,20; 5,00)	6,10 (6,00; 6,50)	7,30 (6,70; 7,80)	7,90 (7,00; 8,10)	5,79 (5,66; 5,93)
Голень, контроль (1,5 мес)	3,00 (2,90; 3,20)	4,00 (3,50; 5,30)	6,50 (5,60; 7,60)	7,00 (6,90; 7,50)	8,20 (7,80; 8,20)	6,03 (5,35; 7,31)
Голень, операция + лучевая терапия (1,5 мес)	3,10 (3,00; 3,20)	4,40 (4,00; 5,20)	5,50 (5,00; 6,00)	6,90 (6,00; 7,60)	8,20 (7,50; 8,20)	5,71 (4,87; 7,73)

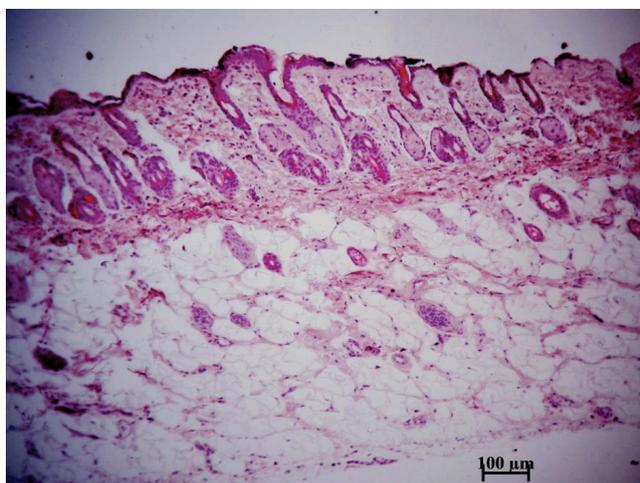


Рис. 6. Кожа внутренней поверхности задней конечности животного контрольной группы

Fig. 6. Skin of the inner surface of the hind limb of the rat of the control group

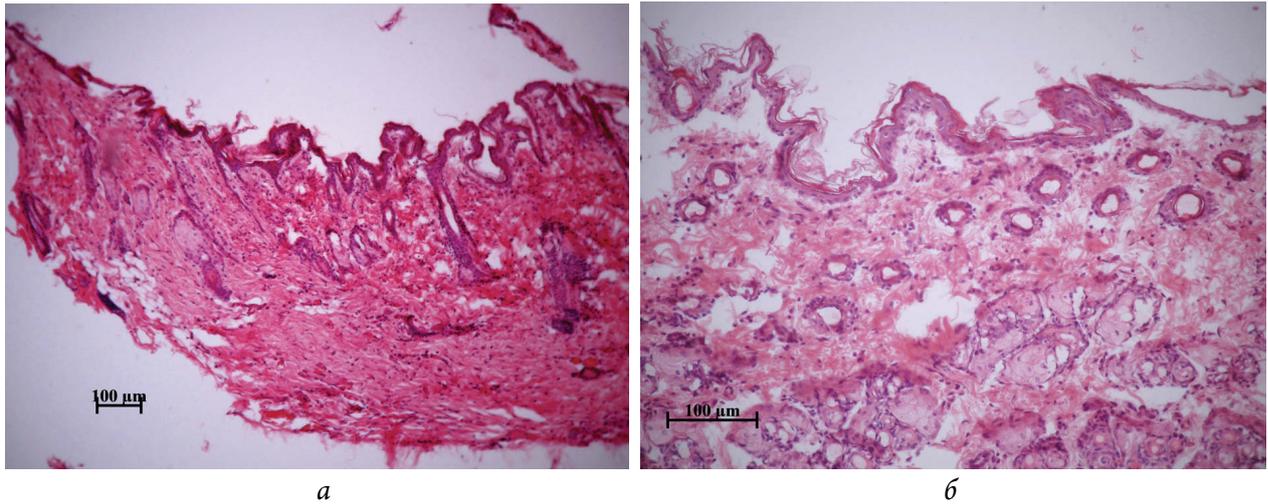


Рис. 7. Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс через 1 мес после операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов): а – ув. $\times 100$; б – ув. $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 7. Skin of the inner surface of the hind limb of rats 1 month after the operation (lymph node dissection of the popliteal and inguinal lymph nodes): а – magn. $\times 100$; б – magn. $\times 200$. Stained with hematoxylin and eosin

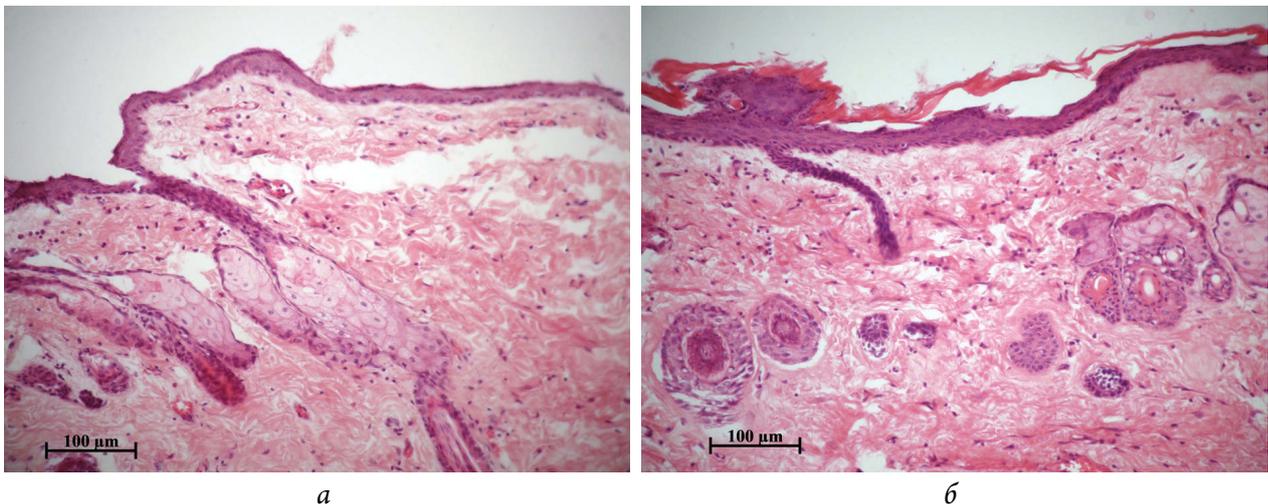


Рис. 8. Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс через 2 (а) и 3 мес (б) после операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

Fig. 8. Skin of the inner surface of the hind limb of rats 2 (а) and 3 (б) months after the surgery (lymph node dissection of popliteal and inguinal lymph nodes in combination with radiation therapy). Stained with hematoxylin and eosin. Magn. $\times 200$

Через 2 мес в эпидермисе животных первой группы выявлялся гиперкератоз, подэпидермально – участки скопления тканевой жидкости, полнокровные сосуды, участки фиброза сетчатого слоя дермы (рис. 8, а).

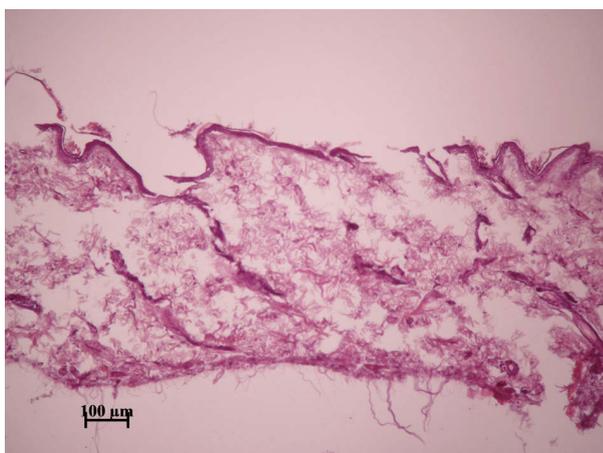
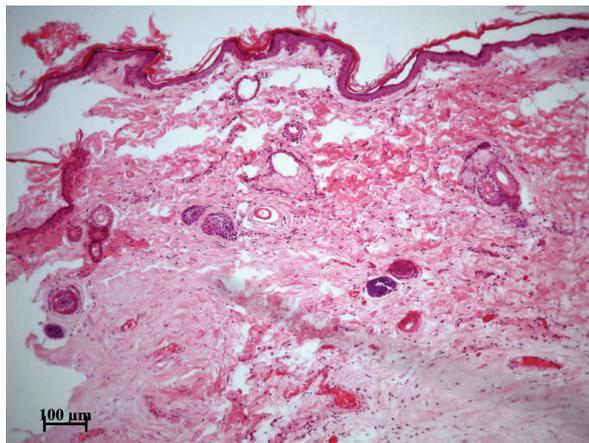
Через 3 мес в эпидермисе животных с моделью хронического лимфатического отека при комбинации паховой и подколенной лимфодиссекции и лучевой терапии определялись гиперкератоз, увеличение толщины мальпигиевого (росткового) слоя (акантоз), в дерме – фиброламеллярная гиперплазия, периаднексальный фиброз, атрофия потовых желез; гиподерма была замещена пучками утолщенных коллагеновых волокон (рис. 8, б).

Через 4 мес в 1-й группе отмечались сглаженность контура сосочкового слоя, гиперкератоз, акантоз, в сетчатом слое дермы – участки скопления тканевой жидкости, атрофия сальных и потовых желез, участки гиперконденсации коллагеновых волокон, фиброламеллярная гиперплазия, вокруг единично сохранных потовых и сальных желез периаднексальный фиброз, гиподерма замещена грубыми коллагеновыми волокнами (рис. 9).

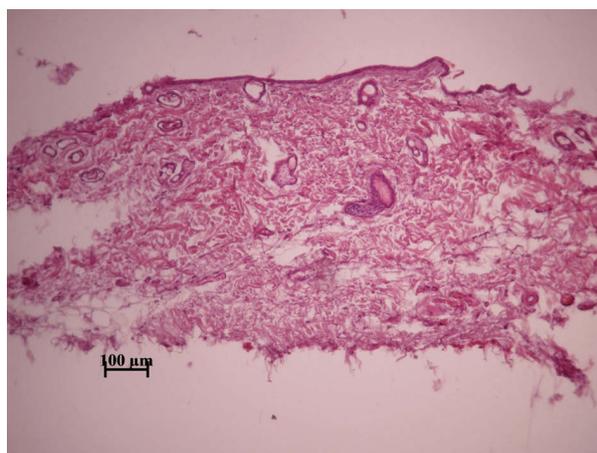
Через 6 мес после операции в коже крыс наблюдались истончение эпидермиса, атрофия сальных и потовых желез, деструкция, хаотичное расположение, местами – разволокнение пучков коллагеновых волокон, скопление между ними тканевой жидкости (рис. 10).

Рис. 9. Кожа внутренней поверхности задней конечности крысы через 4 мес после операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Fig. 9. Skin of the inner surface of the hind limb of rat 4 month after the surgery (lymph node dissection of popliteal and inguinal lymph nodes in combination with radiation therapy). Stained with hematoxylin and eosin. Magn. $\times 100$



а



б

Рис. 10. Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс через 6 мес после операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией): а – хаотичное расположение коллагеновых волокон; б – скопление тканевой жидкости между коллагеновыми волокнами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Fig. 10. The skin of the inner surface of the hind limb of rats 6 months after surgery (lymph node dissection of the popliteal and inguinal lymph nodes in combination with radiation therapy): а – chaotic arrangement of collagen fibers; б – accumulation of tissue fluid between collagen fibers. Stained with hematoxylin and eosin. Magn. $\times 100$

При развитии хронического лимфатического отека в коже и подкожной клетчатке задних конечностей отмечалась лимфатическая гемангиопатия, которая характеризуется увеличением плотности сосудистого компонента, представленного капиллярами. Морфометрическое исследование сосудистого компонента показало статистически значимое увеличение объемной плотности сосудов (V_c) при создании модели

лимфедемы в сравнении с группой контроля (табл. 2).

Следует отметить, что максимальная объемная плотность сосудов регистрировалась через 1 мес, что обусловлено неоангиогенезом и послеоперационным отеком. Ко 2-му мес отмечалось минимальное значение объемной плотности сосудов в коже прооперированной задней конечности крысы.

Таблица 2. Объемная плотность сосудов кожи задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, $M \pm m$

Table 2. Volumetric density of skin vessels of the rat hind limb in the leg area when creating a model of lymphedema, $M \pm m$

Показатель	Контроль	1 мес	2 мес	3 мес	4 мес	6 мес
Объемная плотность сосудов, %	1,14 \pm 1,03	5,00 \pm 1,22* [#]	2,12 \pm 1,54* ^{◇, v}	2,80 \pm 1,23*	3,56 \pm 1,81*	3,90 \pm 1,66* [#]

Примечание. * – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя в группе контроля; [◇] – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 1-го мес; [#] – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 2-го мес; ^v – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 6-го мес.

Таблица 3. Диаметры сосудов (мкм) кожи задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Table 3. Vessel diameters (μm) of the skin of the rat hind limb in the shin area when creating a model of lymphedema, $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Показатель	Контроль	1 мес	2 мес	3 мес	4 мес	6 мес
Me ($Q_{25}; Q_{75}$), МКМ	25,79 (17,88; 32,73)	16,72 (12,64; 21,93)*, Δ , \square , ν	16,48 (12,96; 24,81)*, Δ , \square , ν	21,37 (18,33; 30,42) \diamond , $\#$, \square , ν	13,37 (9,84; 18,62)*, \diamond , $\#$, Δ	13,37 (10,37; 19,15)*, \diamond , $\#$, Δ

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5: * – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя в группе контроля; \diamond – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 1-го мес; $\#$ – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 2-го мес; Δ – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 3-го мес; \square – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 4-го мес; ν – $p < 0,05$ – при сравнении со значениями показателя 6-го мес.

В дальнейшем объемная плотность сосудов постепенно нарастала, хотя к 3-му и 4-му мес не отмечалось статистически значимых различий по сравнению со значениями 2-го мес. Лишь к 6-му мес имело место статистически значимое увеличение объемной плотности сосудов в сравнении со 2-м мес.

Большинство сосудов через 4 и 6 мес с момента создания модели лимфедемы были представлены капиллярами диаметром от 3 до 15 мкм (табл. 3).

Распределение сосудов по их диаметру в зависимости от сроков развития заболевания представлено на гистограммах (рис. 11–13). Так, в коже задней конечности у животных контрольной группы максимальное количество сосудов имели диаметр от 10 до 40 мкм, т.е. встречались капилляры, артериолы и венулы, единично – сосуды диаметром от 60 до 70 мкм (рис. 11).

Через 1 и 2 мес с момента операции максимальное количество сосудов имеет диаметр от 10 до 20 мкм, единичные сосуды имеют диаметр от 60 до 70 мкм (рис. 11). Через 3 мес состояние сосудистого компонента схоже с таковым в контрольной группе. Через 4 и 6 мес диаметр сосудов составлял, главным образом, 4–20 мкм (табл. 3). Отмечались лишь единичные сосуды диаметром более 20 мкм (рис. 13, в, г).

Толщина эпидермиса в сравнении с группой контроля статистически значимо была увеличена к 4-му мес. К этому же сроку проявлялась тенденция к увеличению толщины гиподермы, однако статистически значимое увеличение толщины всех слоев кожи регистрировалось лишь к 6-му мес (табл. 4).

Статистически значимое увеличение объемной плотности тканевой жидкости по сравнению с контрольными значениями отмечалось на 2–3-м мес эксперимента, объемная плотность коллагеновых волокон при создании модели лимфедемы в сравнении с группой контроля повышалась к 4–6-му мес (рис. 14).

Измерение толщины коллагеновых волокон выявило развитие гиперконденсации коллагена при создании модели лимфедемы (табл. 5). Уменьшение толщины коллагеновых волокон к 6-му мес свидетельствовало о дезорганизации коллагена.

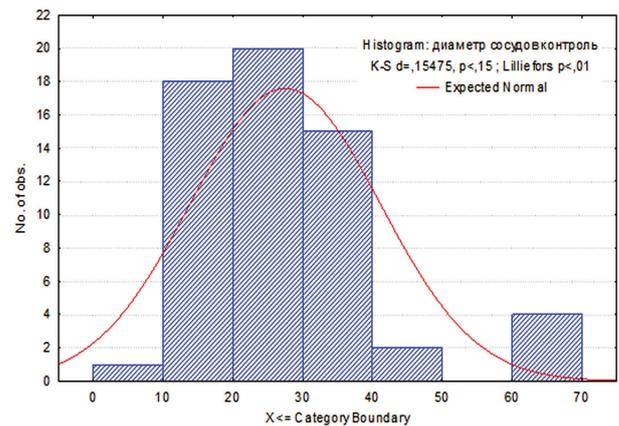


Рис. 11. Гистограмма распределения сосудов по диаметру в контрольной группе, мкм

Fig. 11. Histogram of the distribution of vessels by diameter in the control group, μm

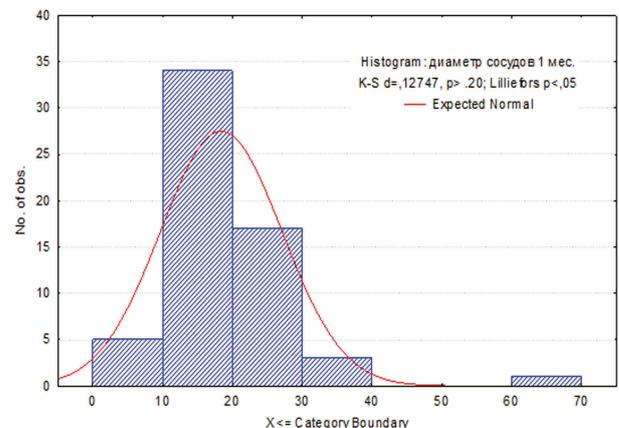


Рис. 12. Гистограмма распределения сосудов по диаметру через 1 мес после операции, мкм

Fig. 12. Histogram of the distribution of vessels by diameter 1 month after surgery, μm

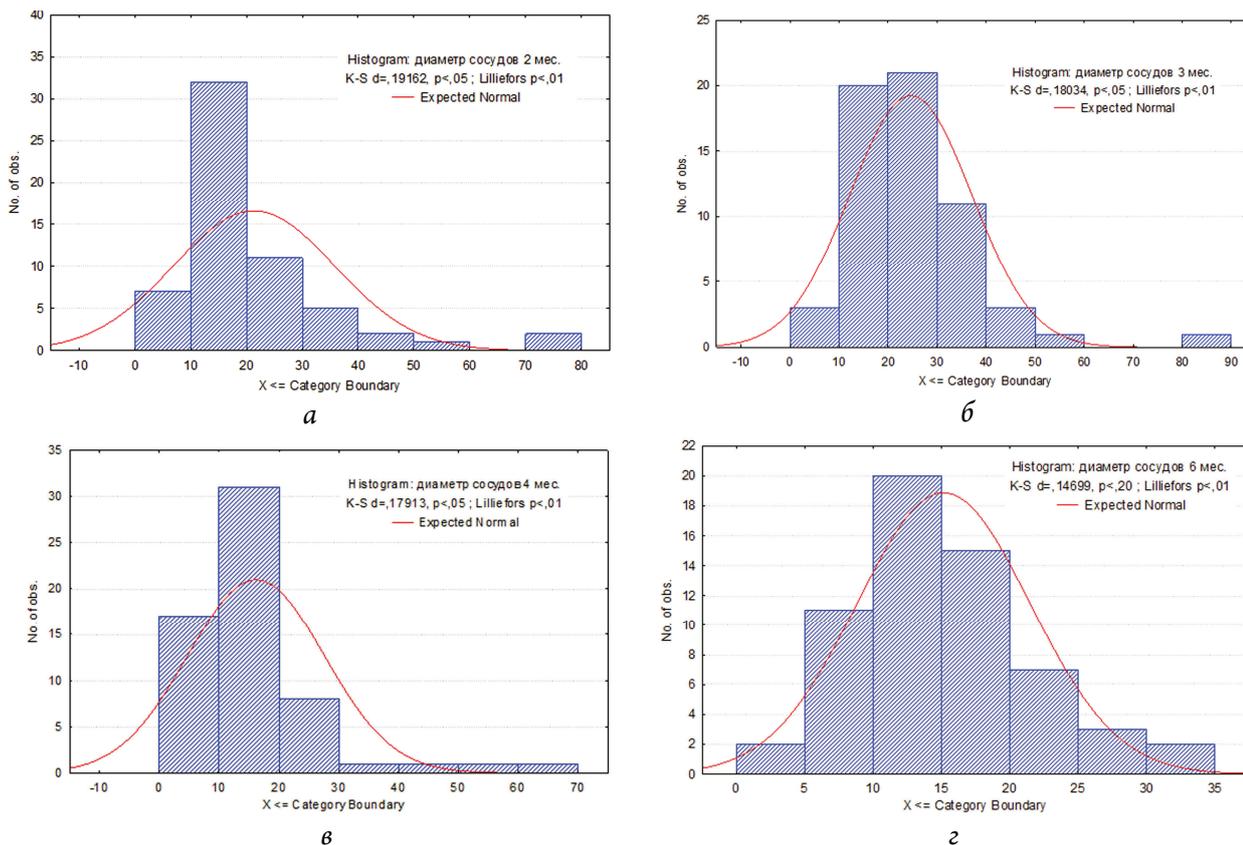


Рис. 13. Гистограмма распределения сосудов по диаметру через 2 (а), 3 (б), 4 (в) и 6 мес (г) после создания модели лимфедемы, мкм

Fig. 13. Histogram of the distribution of vessels by diameter 2 (a), 3 (б), 4 (в) and 6 months (г) after the creation of the lymphedema model, μm

Таблица 4. Толщина эпидермиса и кожи задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, Me (Q₂₅; Q₇₅)

Table 4. Thickness of the epidermis and skin of the rat hind limb in the shin area when creating a model of lymphedema, Me (Q₂₅; Q₇₅)

Показатель	Контроль	1 мес	2 мес	3 мес	4 мес	6 мес
Толщина эпидермиса, мкм	13,37 (11,59; 16,39)	14,38 (12,80; 15,55) ^{□v}	14,98 (12,80; 17,66) [□]	15,11 (13,12; 18,03) [□]	21,37 (17,43; 27,28) ^{*, ◊#Δv}	17,88 (14,66; 19,74) ^{*, ◊□}
Толщина кожи, мкм	936,51 (892,31; 961,90)	731,24 (673,80; 757,44) ^{*, #, Δ, □, v}	848,45 (796,59; 867,30) ^{*, ◊, Δ, □, v}	791,78 (761,09; 848,17) ^{*, ◊, #, □, v}	944,48 (880,99; 995,98) ^{◊, #, Δ, v}	1034,78 (1013,81; 1059,42) ^{*, ◊, #, Δ, □}

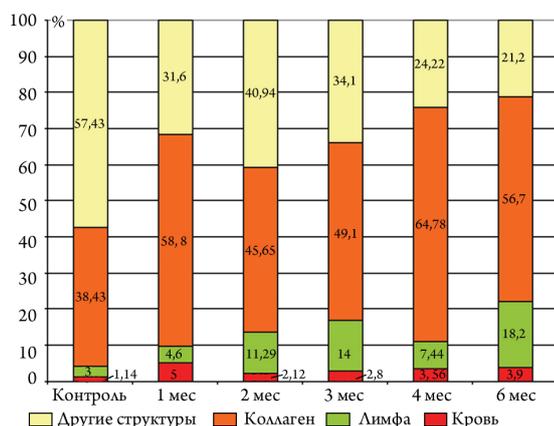


Рис. 14. Объемная плотность сосудов, тканевой жидкости, коллагена и других структур (адипоциты, сальные и потовые железы, волосяные фолликулы)

Fig. 14. Volume density of vessels, tissue fluid, collagen and other structures (adipocytes, sebaceous and sweat glands, hair follicles)

Таблица 5. Толщина коллагеновых волокон кожи задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, $Me (Q_{25}; Q_{75})$ **Table 5.** Thickness of collagen fibers in the skin of the hind limb of a rat in the shin area when creating a model of lymphedema, $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Показатель	Контроль	1 мес	2 мес	3 мес	4 мес	6 мес
Толщина коллагеновых волокон, мкм	1,76 (1,19; 2,52)	2,97 (2,10; 3,60)*	2,90 (2,26; 3,68)*.v	3,03 (2,14; 3,88)*.v	3,00 (2,14; 3,97)*.v	2,38 (1,73; 3,03)*.#.Δ□

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным литературы, в клинической практике развитие хронического лимфатического отека проходит три стадии [6–8]:

1) острая – характеризуется видимым отеком, который достигает пика к 7–10-му дню и сохраняется до 3–6 нед;

2) латентная – наступает в результате формирования лимфо-лимфатических мостиков из вновь образованных лимфатических сосудов и длится от 3 до 12 мес;

3) клиническая – возникает при нарастании лимфостаза, постепенном фиброзном перерождении лимфатических сосудов и снижении проницаемости их стенки, нарушении контрактильной способности и клапанного аппарата, расширении внутриэндотелиальных связей в лимфатических капиллярах. Впервые проявляется через 6–12 мес после лимфодиссекции, травмы лимфатических сосудов или обширной резекции тканей. Может вообще не наступить при включении в процесс достаточно мощных компенсаторно-приспособительных механизмов, обеспечивающих поддержание лимфоотока.

По результатам нашего гистологического исследования, через 1 мес после лимфодиссекции подколенных и паховых лимфатических узлов в коже прооперированной задней конечности крысы развивался отек тканей, наступала полимеризация коллагеновых микрофибрилл, развивалось полнокровие в дерме, происходило замещение адипоцитов коллагеновыми массами. Однако данные изменения в дерме и гиподерме (в большей степени) носят обратимый характер.

Через 2 мес после оперативного вмешательства и через 1 мес после воздействия лучевой терапии в коже экспериментальных животных отмечается развитие гиперкератоза, гиперконденсации коллагеновых волокон с развитием фиброза сетчатого слоя. Через 3 мес процесс прогрессирует с развитием акантоза, периаднексального фиброза, атрофии потовых желез. Изменения в эту стадию затрагивают сосочковый слой дермы.

К 4-му мес изменения более выражены: наблюдается атрофия сальных и потовых желез, вокруг единично сохранных потовых и сальных желез отмечается периаднексальный фиб-

роз. В этот же период статистически значимо изменяется толщина эпидермиса. Изменения в коже при развитии лимфедемы со 2-го по 4-й мес характеризуются развитием фиброза на всех уровнях (гиподерма, сетчатый слой дермы, сосочковый слой дермы и эпидермис). Следует отметить, что процесс в кожных покровах начинает развиваться по направлению от фасции к коже и доходит до эпидермиса, что согласуется с данными литературы [9].

К 6-му мес в тканях отмечаются накопление межклеточной жидкости, деструкция коллагена, гиалиноз сосудов и прогрессирование фиброза. Процесс носит необратимый характер и сопровождается стойкими изменениями объемной плотности сосудов, тканевой жидкости, коллагеновых волокон и других структур (адипоцитов, сальных и потовых желез, волосяных фолликулов).

Таким образом, несмотря на клиническое отсутствие отека в тканях прооперированной и облученной задней конечности были зафиксированы гистологические изменения, характерные для развития лимфедемы в клинических условиях [9]. В течение первых 2 мес они проявлялись развитием острого отека, со 2-го по 4-й мес – замещением фиброзной тканью кожных покровов в направлении от фасции к эпидермису, а к 6-му мес в тканях наблюдались максимально выраженная гиперконденсация коллагена и его дезорганизация.

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного морфологического исследования показали, что первые 1–2 мес после лимфодиссекции и лучевой терапии характеризуются развитием острого отека, со 2-го по 4-й мес наступает латентная стадия, которая может быть обратима. В период 4-го по 6-й мес происходят более грубые изменения в структуре коллагена, приводящие к его дезорганизации, что влечет за собой развитие и наступление клинической стадии отека.

2. Полученные в динамике морфологические изменения в коже и подкожной клетчатке в эксперименте соответствуют стадийности развития хронического лимфатического отека в клинических условиях.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Casley-Smith J., Casley-Smith J.R. Modern treatment for lymphoedema. Lymphoedema Association of Australia, 1997. 335 p.
2. Triacca V., Pisano M., Lessert C. et al. Experimental drainage device to reduce lymphoedema in a rat model // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2019. Vol. 57, № 6. P. 859–867.
3. *Микроскопическая техника: руководство* / под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
4. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
5. Голаев А.А. Морфофункциональная характеристика стенки и внутриорганных кровеносных сосудов тонкой кишки при моделировании условий ее аутотрансплантации и электромагнитном воздействии (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2004. 20 с.
6. Абалмасов К.Г. Хирургическое лечение хронических лимфатических отеков конечностей и половых органов (клинико-экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук. М., 1992. 469 с.
7. Rutkowski J.M. Moya M., Johannes J. Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9 // *Microvascular research*. 2006. Vol. 72, № 3. P. 161–171.
8. Куприянов В.В., Бородин Ю.И., Караганов Я.Л., Выренков Ю.Е. Микролимфология. М.: Медицина, 1983. 288 с.
9. Горшков С.З., Мусалатов Х.А. Слоновость конечностей и наружных половых органов. М.: Медицина, 2002. 208 с.

REFERENCES

1. Casley-Smith J., Casley-Smith J.R. Modern treatment for lymphoedema. Lymphoedema Association of Australia, 1997. 335 p.
2. Triacca V., Pisano M., Lessert C. et al. Experimental drainage device to reduce lymphoedema in a rat model. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2019;57(6):859-867.
3. *Mikroskopicheskaya tekhnika: rukovodstvo; pod red. D.S. Sarkisova, Yu.L. Perova* [Microscopic technique: Manual; D.S. Sarkisov, Yu.L. Perov (eds.)]. Moscow, Medicine Publ., 1996. 544 p. (In Russ.).
4. Avtandilov G.G. *Meditsinskaya morfometriya: rukovodstvo* [Medical morphometry. Guide]. Moscow, Medicine Publ., 1990. 384 p. (In Russ.).
5. Golayev A.A. *Morfofunktsional'naya harakteristika stenki i vnutriorgannykh krovenosnykh sosudov tonkoy kishki pri modelirovanii usloviy yeye autotransplantatsii i elektromagnitnom vozleystvii (eksperimental'noye issledovaniye): avtoref. dis. kand. med. nauk* [Morphofunctional characteristics of the wall and intraorganic blood vessels of the small intestine in modeling the conditions of its autotransplantation and electromagnetic influence (experimental study): Author. Diss. ... Cand. Med. sci.]. Moscow, 2004. 20 p. (In Russ.).
6. Abalmasov K.G. *Hirurgicheskoye lecheniye hronicheskikh limfaticheskikh otekov konechnostey i polovykh organov (Kliniko-eksperimental'noye issledovaniye): Dis. ... dokt. med. nauk* [Surgical treatment of chronic lymphatic edema of the extremities and genital organs (Clinical and experimental study): Diss. ... Dr. Med. sci.] Moscow, 1992. 469 p. (In Russ.).
7. Rutkowski J.M. Moya M., Johannes J. Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9. *Microvascular Research*. 2006;72(3):161-171.
8. Kupriyanov V.V., Borodin Yu.I., Karaganov Ya.L., Vyrenkov Yu.Ye. *Mikrolimfologiya* [Microlymphology]. Moscow, Medicine Publ., 1983. 288 p. (In Russ.).
9. Gorshkov S.Z., Musalato Kh.A. *Slonovost' konechnostey i naruzhnykh polovykh organov* [Elephantiasis of limbs and external genital organs]. Moscow, Medicine Publ., 2002. 208 p. (In Russ.).

Информация об авторах

Байтингер Владимир Фёдорович – д-р мед. наук, профессор, президент АНО «НИИ микрохирургии» (Россия, 634063, г. Томск, ул. Ивана Черных, д. 96); профессор кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1).

<https://orcid.org/0000-0002-5845-588X>

e-mail: baitinger@mail.tomsknet.ru

Суходоло Ирина Владимировна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Россия, 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2).

<https://orcid.org/0000-0001-9848-2068>

e-mail: staranie@mail.ru

Курочкина Оксана Сергеевна , канд. мед. наук, врач-хирург АНО «НИИ микрохирургии» (Россия, 634063, г. Томск, ул. Ивана Черных, д. 96), доцент кафедры анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Россия, 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2).

<https://orcid.org/0000-0001-8615-7663>

e-mail: kurochkinaos@yandex.ru

Павлова Марина Евгеньевна, студентка 6-го курса медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России» (Россия, 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 2).

e-mail: pavlinische@yandex.ru

Кистенёв Юрий Владимирович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зам. проректора по научной и инновационной деятельности ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36).

<https://orcid.org/0000-0001-5760-1462>

e-mail: yv.kistenev@gmail.ru

Кривова Наталья Андреевна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией экспериментальной физиологии, Институт биологии и биофизики, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36).

<https://orcid.org/0000-0002-3965-8665>

e-mail: nakri@res.tsu.ru

Талецкий Александр Владимирович, врач-онколог радиотерапевтического отделения ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (Россия, 634009, г. Томск, пр. Ленина, д. 36).

e-mail: talezkii@yandex.ru

Николаев Виктор Владимирович, мл. научн. сотрудник лаборатории лазерного молекулярного имиджинга и машинного обучения ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36).

<https://orcid.org/0000-0001-8189-0188>

e-mail: vik-nikol@bk.ru

Information about the authors

Vladimir F. Baytinger, Dr. Med. sci., Professor, President, Institute of Microsurgery (96, Ivan Chernykh st., Tomsk, 634063, Russia); Professor of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky (1, Partizan Zheleznyak st., Krasnoyarsk, 660022, Russia).

<https://orcid.org/0000-0002-5845-588X>

e-mail: baitinger@mail.tomsknet.ru

Irina V. Sukhodolo, Dr. Med. sci., Professor, head of the Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University (2, Moskovsky trakt st., Tomsk, 634050, Russia).

<https://orcid.org/0000-0001-9848-2068>

e-mail: staranie@mail.ru

Oksana S. Kurochkina , Cand. Med. sci., surgeon, Institute of Microsurgery, Associate Professor of the Department of Human Anatomy with the course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Siberian State Medical University (2, Moskovsky trakt st., Tomsk, 634050, Russia).

<https://orcid.org/0000-0001-8615-7663>

e-mail: kurochkinaos@yandex.ru

Marina E. Pavlova, 6th year student, the Faculty of Medicine and Biology, Siberian State Medical University (2, Moskovsky trakt st., Tomsk, 634050, Russia).

e-mail: pavlinische@yandex.ru

Yury V. Kistenev, Dr. Phys.-Math. sci., Professor, Deputy Vice-Rector for Research and Innovation, National Research Tomsk State University (36, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia).

<https://orcid.org/0000-0001-5760-1462>

e-mail: yv.kistenev@gmail.ru

Natalya A. Krivova, Dr. Biol. sci., Professor, head of the Laboratory of Experimental Physiology, Institute of Biology and Biophysics, National Research Tomsk State University (36, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia).

<https://orcid.org/0000-0002-3965-8665>

e-mail: nakri@res.tsu.ru

Alexander V. Taletsky, oncologist of the Radiotherapy Department, Tomsk Regional Oncological Center (36, Lenin Ave., Tomsk, 634009, Russia).

e-mail: talezkii@yandex.ru

Victor V. Nikolaev, Junior Researcher, the Laboratory of Laser Molecular Imaging and Machine Learning, National Research Tomsk State University (36, Lenin Ave., Tomsk, 634050, Russia).

<https://orcid.org/0000-0001-8189-0188>

e-mail: vik-nikol@bk.ru

Поступила в редакцию 12.12.2021; одобрена после рецензирования 12.01.2022; принята к публикации 18.01.2022
The paper was submitted 12.12.2021; approved after reviewing 12.01.2022; accepted for publication 18.01.2022