

Abstract

A. V. Kravtsova,

L. P. Abramova,

V. O. Veckshin,

Kharkiv National Medical University, 4, Nauki ave., Kharkiv, Ukraine, 24089

IMMUNOLOGICAL BLOOD PARAMETERS OF ANIMAL AFTER DURAPLASTY

Restoration of form and function to the craniofacial skeleton following trauma, congenital malformations or resection poses a considerable clinical challenge for the plastic surgeon. Materials available to treat these conditions include autografts (tissue from the patient), allografts (tissue from a donor) and synthetic materials such as metals, ceramics and polymers. After cerebral or spinal operative procedures, it is imperative to provide a complete and watertight dural closure to minimize the risks of cerebrospinal fluid fistulas, infections, brain herniation, cortical scarring, and adhesions. In our previous research, we studied use of the chitin-chitosan membrane for dura plasty in experimental model and proved its effectiveness and absence of a reaction from the CSF.

Therefore, the aim of this work was to evaluate the changes in the immunological parameters of peripheral blood after the implantation of material based on chitosan for plasty of the dura mater.

In this research we provide duraplasty for 90 rabbits used autologous fascia, a collagen-based commercial, and an innovative chitosan-based agent. The venous blood was collected from the jugular vein of the animals in amount of 1.5 ml before the operation (control), and also 2 weeks, 2 and 6 months after surgery. The levels of immunoglobulins A, G, M, interleukin-2, percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells were determined in blood serum.

Our results have shown that the use of auto- and alomaterials for dura mater plasty led to reactive changes in the immune system at the time of 2 weeks and 2 months after the operation, which was manifested by an imbalance in the immunoglobulins levels and effector T cells balance, as well as an increase in the regulatory IL -2. In animals with the use of a collagen membrane, the content of the latter remained elevated even 6 months after the operation.

Keywords: dura mater, plastics, autofascia, collagen, chitosan.

Corresponding author: *anny_k@ukr.net*

Резюме

А. В. Кравцова,

Л. П. Абрамова,

В. О. Векшин,

Харківський національний медичний університет, Проспект Науки 4, м. Харків, Україна, 24089

ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТВАРИН ПІСЛЯ ПЛАСТИКИ ТВЕРДОЇ МОЗКОВОЇ ОБОЛОНКИ

Ретельне закриття дефекту після операції є єдиним засобом попередження ліквореї, що забезпечується в тому числі використанням засобів для пластики твердої мозкової оболонки. В наших попередніх роботах проведені дослідження використання хітин-хітозаної мембрани для пластики твердої мозкової оболонки в експерименті та доведена його ефективність та відсутність реакції з боку ліквору.

Тому, метою цієї роботи була оцінка зміни імунологічних показників периферійної крові на імплантацію матеріалу на основі хітозану для пластики твердої мозкової оболонки.

В дослідженні використано 90 кролів, яким проводили пластику твердої мозкової оболонки аутофасцією, комерційним засобом на основі колагену та інноваційним засобом на основі хітозану. Венозну кров тварин отримували з яремної вени у кількості 1,5 мл від кожної тварини перед операцією (контроль), а також через 2 тижні, 2 та 6 місяців після оперативного втручання з пластики твердої мозкової оболонки. У сироватці крові тварин визначали рівні іммуноглобулінів А, G, M, інтерлейкіну-2, відсоток CD4⁺ та CD8⁺.

Отримані результати показали, що застосування ауто- та аломатеріалів для пластики твердої мозкової оболонки призводило до реактивних змін в показниках імунної системи у терміни 2 тижні та 2 місяці після операції, що проявлялося дисбалансом рівнів іммуноглобулінів та ефекторних Т-клітин, а також підвищенням вмісту регуляторного ІЛ-2. У тварин з використанням колагенової мембрани вміст останнього залишався підвищеним навіть через 6 місяців після операції.

Ключові слова: тверда мозкова оболонка, пластика, аутофасція, колаген, хітозан.

Резюме

**А. В. Кравцова,
Л. П. Абрамова,
В. О. Векшин,**

Харьковский национальный медицинский университет, Проспект Науки, 4, г. Харьков, Украина, 24089

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ПЛАСТИКИ ТВЕРДОЙ МОЗГОВОЙ ОБОЛОЧКИ

Тщательное закрытие дефекта после операции является единственным средством предупреждения ликвореи, что обеспечивается в том числе использованием средств для пластики твердой мозговой оболочки. В наших предыдущих работах проведены исследования использования хитин-хитозановой мембраны для пластики твердой мозговой оболочки в эксперименте и доказана его эффективность и отсутствие реакции со стороны ликвора.

Поэтому, целью данной работы была оценка изменений иммунологических показателей периферической крови на имплантацию материала на основе хитозана для пластики твердой мозговой оболочки.

В исследовании использованы 90 кроликов, которым проводили пластику твердой мозговой оболочки аутофасцией, коммерческим средством на основе коллагена и инновационным средством на основе хитозана. Венозную кровь животных получали из яремной вены в количестве 1,5 мл от каждого животного перед операцией (контроль), а также через 2 недели, 2 и 6 месяцев после оперативного вмешательства по поводу пластики твердой мозговой оболочки. В сыворотке крови животных определяли уровни иммуноглобулинов А, G, M, интерлейкина-2, процент CD4⁺ и CD8⁺.

Полученные результаты показали, что применение ауто- и аломатериалов для пластики твердой мозговой оболочки приводило к реактивным изменениям в показателях иммунной системы в сроки 2 недели и 2 месяца после операции, что проявлялось дисбалансом уровней иммуноглобулинов и эффекторных Т-клеток, а также повышением содержания регуляторного ІЛ-2. У животных с использованием коллагеновой мембраны содержание последнего оставалось повышенным даже через 6 месяцев после операции.

Ключевые слова: твердая мозговая оболочка, пластика, аутофасция, коллаген, хитозан.

Автор, відповідальний за листування: anny_k@ukr.net



Вступ

Лікворея є одним з розповсюджених ускладнень, яке асоціюється з нейрохірургічними втручаннями та є предиктором розвитку інфекційних ускладнень, а також значно збільшує термін перебування госпіталізації [1, 2, 3]. Частота виникнення такого ускладнення коливається від 2 до 20 % в залежності від виду операції та розміру дефекту твердої мозкової оболонки [4]. Dubeu та співавтори вказують на 13 % розвитку даного ускладнення при операції на задній черепній ямці [5], що є найбільшим відсотком серед усіх ускладнень.

Ретельне закриття дефекту після операції є єдиним засобом попередження ліквореї, що забезпечується в тому числі використанням засобів для пластики твердої мозкової оболонки. З 30-х років минулого століття широко використовуються алогенні та гетерогенні матеріали, а також синтетичні засоби, які виступають в ролі матриці для міграції фібробластів з подальшим розвитком сполучної тканини [6, 7, 8]. Проте, є данні щодо неефективності деяких матеріалів та наявності інфекційних ускладнень, що спонукає вчених до розробки більш ефективних засобів медичного призначення [9]. При цьому, під час розробки засобу необхідно враховувати не лише ефективність матеріалу, а також відсутність токсичності та послаблення впливу на імунну систему. Відповідно до вимог EN ISO 10993, щодо засобів медичного призначення, визначення загальної токсичності є абсолютно необхідним етапом дослідження нових виробів.

Вибір матеріалу засобу для пластики твердої мозкової оболонки залежить як від його фізичних (міцність, деградація), так і від біологічних властивостей (відсутність алергенності та токсичності, апірогенність та здатність стимулювати процеси регенерації). Одним з матеріалів, на основі якого можлива розробка біосумісних імплантатів, є хітозан та його похідні. Хітозан – природний полісахарид, який є похідним від хітону. Хітозан не має алергенних властивостей, є біосумісним, біодеградує, має антибактеріальні властивості та здатен стимулювати регенерацію. Суттєвою перевагою даного матеріалу є його відносно низька вартість. Дослідження останніх років показали переваги засобів на основі хітозану для пластики шкіри та лікування опіків і трофічних виразок, для пластики кісткової тканини та судин, в якості кровоспинних засобів. Нажаль, є лише поодинокі дані щодо

розробок матеріалів на основі хітозану для пластики ТМО.

В наших попередніх роботах доповідалось про проведення досліджень з використання хітин-хітозанової мембрани для пластики твердої мозкової оболонки в експерименті, де була доведена його ефективність та відсутність реакції з боку ліквору.

Тому, метою даної роботи була оцінка імунологічних показників периферійної крові на імплантацію матеріалу на основі хітозану для пластики твердої мозкової оболонки.

Матеріали та методи дослідження.

Матеріал для пластики твердої мозкової оболонки отримувалась з 3 % розчину хітозану (мол. маса 200 кДа, ступінь деацетилювання 80-90 %). Для цього 10 мл 3 % розчину хітозану в 1 % оцтової кислоти виливали на круглу тефлонову підкладку (діаметр підкладки 8 см, висота шару розчину 5 мм), випарювали розчинник при кімнатній температурі протягом 48-72 годин. Для покращення механічних властивостей і для зниження часу деградації плівки в розчин хітозана додавали частинки хітину (1-2 мм). Співвідношення хітозану і хітину 80:20. Струшуванням гомогенно розподіляли частинки у в'язкому розчині хітозану до отримання однорідної суспензії. Отриману плівку обробляли 5 % розчином NaOH протягом 2 годин, багаторазово промивали дистильованою водою і обробляли гліцерином протягом 30 хвилин для додавання еластичності і м'якості.

Для дослідження було відібрано 15 зразків хітин-хітозанової мембрани та таку ж кількість зразків клаптів широкої фасції стегна, отриманих від кролів породи шиншила, а також комерційного матеріалу на основі колагену.

Дизайн експерименту

З метою визначення впливу матеріалу на показники периферійної крові було проведено експериментальне дослідження на 90 кролях породи шиншила. Відповідно до мети та задач дослідження тварини були розділені на 3 серії:

I серія (18 тварин) – пластика ТМО виконувалась із застосування аутоотрансплантату – широкої фасції стегна.

II серія (36 тварин) – пластика ТМО виконувалась із застосуванням комерційного засобу на основі колагену. Тварини даної серії були розділені на 2 підгрупи:

Па – пластика без фіксації матеріалу,

Пв – пластика з фіксацією матеріалу за допомогою атравматичного шовного матеріалу.



III серія (36 тварин) – пластика ТМО виконувалась із застосуванням плівки на основі хітозану, армованої хітином. Тварини даної серії були розділені на 2 підгрупи:

Ша – пластика без фіксації матеріалу,

Шв – пластика з фіксацією матеріалу за допомогою атравматичного шовного матеріалу.

Методика пластики ТМО.

Після загального знеболення та катетеризації периферійної вени проводили гоління голови від надочного краю черепа до основи вух. Після обробки операційного поля розчином С-4 виконували Т-подібний розріз, спочатку у фронтальній площині між краями вух проведений перед їхньою основою, а потім перпендикулярно до нього у сагітальній площині від лінії першого розрізу по середній лінії майже до перенісся. Трикутні шкірні клапті відсепарувались у різні сторони. Дугоподібним розрізом на 0,5 см від місця прикріплення до кістки роз'єднували скроневи м'яз, та відсепарували распатором разом з окістям у латеральному напрямку, але не більше ніж цього вимагав майбутній трепанаційний доступ. За допомогою трепана та гострокінцевої фрези 0,5 см в діаметрі виконували два отвори на 0,5-0,7 см один від одного. Кусачками Люера та Лістона робили єдиний трепанаційний доступ і вирівнювали гострі краї. Рану очищали від стружки та уламків, за потреби проводили гемостаз із діплоє. Хрестоподібно розсікали ТМО.

Широку фасцію стегна фіксували до власної ТМО за допомогою атравматичного шовного матеріалу. Матеріал на основі колагену та імплантат на основі хітозану фіксувався за рахунок наявності адгезивних властивостей. З метою порівняння ефективності фіксації мембран у другій підгрупі II та III серії використовували додаткову фіксацію матеріалів за допомогою атравматичного шовного матеріалу. Імплантат задалегідь формували більший за розмір дефекту, його укладали між непошкодженою ТМО і внутрішньою поверхнею кістки.

Після виконання пластики без закриття кісткового дефекту проводили ушивання м'язу і переходили на протилежну частину голови де виконували за тими ж етапами пластику ТМО. Операцію завершували накладанням вузлових швів на шкіру та накладанням асептичної пов'язки.

Тварин виводили з експерименту через 2 тижні, 2 та 6 місяців після проведеної пластики.

Забір матеріалу

Венозну кров тварин отримували з яремної вени у кількості 1,5 мл від кожної тварини перед операцією (контроль), а також через 2 тижні, 2 та 6 місяців після оперативної пластики твердої мозкової оболонки. У сироватці крові тварин визначали рівні імуноглобулінів А, G, M та інтерлейкіну-2 імуноферментними методами на аналізаторі “LabLine-90” (Австрія) за допомогою комерційних наборів фірми “ELISA” (Німеччина). Відсоток CD4⁺ та CD8⁺ визначали за допомогою комерційних наборів фірми «Гранум» (Україна).

Статистичні методи.

Всі цифрові дані записували як середню величину ± похибку середньої величини (M ± m). Достовірність різниці між цифровими даними вираховували за допомогою t-критерію Стьюдента з використанням програми SPSS-Statisc 21.0 (trial-version).

Результати та їх обговорення.

Після пластики дефекту ТМО аутологічною фасцією відбувалося незначне зростання рівнів IgA та IgG, при цьому достовірної різниці з контролем для IgG не спостерігалось. Рівень IgM достовірно зменшувався на 32 % у порівнянні з контролем. Дисбаланс рівнів сироваткових імуноглобулінів в нашому експерименті міг бути наслідком реакції імунної системи на оперативне втручання, зважаючи на нормалізацію їх показників через 2 тижні. Через 2 місяці після операції залишалося незначне зменшення рівню IgM, проте через 6 місяців всі показники достовірно не відрізнялися від контролю (табл. 1).

Таблиця 1 – Вміст імуноглобулінів в крові тварин в різні терміни спостереження при використанні аутологічної фасції

	IgA, мкмоль/л	IgG, мкмоль/л	IgM, мкмоль/л
Контроль	2,43 ± 0,14	28,7 ± 1,8	5,5 ± 0,87
2 тижні	3,7 ± 0,23	32,4 ± 4,85	3,24 ± 0,25
2 місяці	2,5 ± 0,4	30,4 ± 4,2	4,8 ± 0,24
6 місяців	2,31 ± 0,18	29,8 ± 4,9	5,4 ± 0,47



За умов використання матеріалу на основі колагену відбувалося зростання рівню IgA та IgG через 2 тижні до $3,98 \pm 0,23$ мкмоль/л та $35,94 \pm 2,56$ мкмоль/л відповідно при відсутності фіксації матеріалу. При використанні шовного матеріалу показники імуноглобулінів достовірно не відрізнялися від попередньої групи. На відміну від серії тварин, в якій використовували аутологічну фасцію, динаміка нормалізації рівню сироваткових

імуноглобулінів була більш повільною. Через 2 місяці після операції їх рівень перевищував контроль на 19,3 % та 9,4 % без використання шовного матеріалу та на 11,1 % та 11,6 % – у групі з фіксацією. Рівень IgM підвищувався до $3,45 \pm 0,67$ мкмоль/л та $3,74 \pm 0,41$ мкмоль/л через 2 тижні після операції. Через 6 місяців спостереження вміст імуноглобулінів достовірно не відрізнявся від контролю (табл. 2).

Таблиця 2 – Вміст імуноглобулінів в крові тварин в різні терміни спостереження при використанні комерційного засобу на основі колагену

	IgA, мкмоль/л	IgG, мкмоль/л	IgM, мкмоль/л
контроль	$2,43 \pm 0,14$	$28,7 \pm 1,8$	$5,5 \pm 0,87$
2 тижні (без фіксації)	$3,98 \pm 0,23$	$35,4 \pm 2,56$	$3,45 \pm 0,25$
2 тижні (з фіксацією)	$3,8 \pm 0,17$	$32,9 \pm 4,12$	$3,74 \pm 0,18$
2 місяці (без фіксації)	$2,9 \pm 0,6$	$31,4 \pm 1,6$	$4,21 \pm 0,61$
2 місяці (з фіксацією)	$2,7 \pm 0,25$	$32,1 \pm 3,8$	$4,87 \pm 0,28$
6 місяців (без фіксації)	$2,42 \pm 0,36$	$27,6 \pm 5,2$	$5,3 \pm 0,37$
6 місяців (з фіксацією)	$2,65 \pm 0,09$	$28,3 \pm 1,69$	$5,47 \pm 0,84$

Таблиця 3 – Вміст імуноглобулінів в крові тварин в різні терміни спостереження при використанні матеріалу на основі хітозану

	IgA, мкмоль/л	IgG, мкмоль/л	IgM, мкмоль/л
контроль	$2,43 \pm 0,14$	$28,7 \pm 1,8$	$5,5 \pm 0,87$
2 тижні (без фіксації)	$2,98 \pm 0,2$	$30,8 \pm 3,4$	$3,44 \pm 0,28$
2 тижні (з фіксацією)	$3,24 \pm 0,39$	$31,9 \pm 5,2$	$4,15 \pm 1,0$
2 місяці (без фіксації)	$3,01 \pm 0,14$	$30,14 \pm 0,58$	$5,1 \pm 0,54$
2 місяці (з фіксацією)	$2,59 \pm 0,09$	$29,5 \pm 4,05$	$4,89 \pm 0,44$
6 місяців (без фіксації)	$2,7 \pm 0,54$	$27,3 \pm 2,8$	$5,74 \pm 0,17$
6 місяців (з фіксацією)	$2,61 \pm 0,37$	$29,1 \pm 2,6$	$5,46 \pm 0,59$

Використання хітозану для пластики ТМО призводило до зростання вмісту IgA та IgG через 2 тижні після операції, причому їх рівень у групі з використанням шовного матеріалу зростав на 33,34 % та 11,4 %, що могло свідчити про переваження реакції саме на шовний матеріал. Динаміка зниження їх рівнів була значно більшою у порівнянні з попередніми серіями експерименту. Вміст IgM в крові тварин мав подібну динаміку до попередніх серій тварин.

CD4⁺ та CD8⁺, як основні ефекторні клітини у процесі розпізнавання та реакції на чужорідні продукти, реагували по різному в залежності від матеріалу, який був використаний для пластики ТМО. Перед операцією їх рівень співвідношення становив $32,9 \pm 3,6$ % та $24,7 \pm 4,2$ %. Використання аутологічної фасції призводило до незнач-

ного зростання відсотка Т-клітин до $36,4 \pm 6,4$ % та $31,4 \pm 2,8$ % через 2 тижня після операції. У подальші терміни спостереження їх вміст не відрізнявся від базального рівня.

Застосування колагенової мембрани призводило до зростання кількості CD4⁺ клітин через 2 тижні після операції на 14,6 % та 17,8 % в залежності від відсутності чи наявності фіксації ТМО при нормальному рівні цитотоксичних CD8⁺ клітин (рис. 1).

Проте через 2 місяці дослідження спостерігалося деяке підвищення вмісту обох субпопуляцій Т-лімфоцитів з максимумом у 15,7 % для CD8⁺ клітин у групі з використанням шовного матеріалу. Як видно з графіку, через 6 місяців вміст обох субпопуляцій лімфоцитів наближався до контрольних показників.



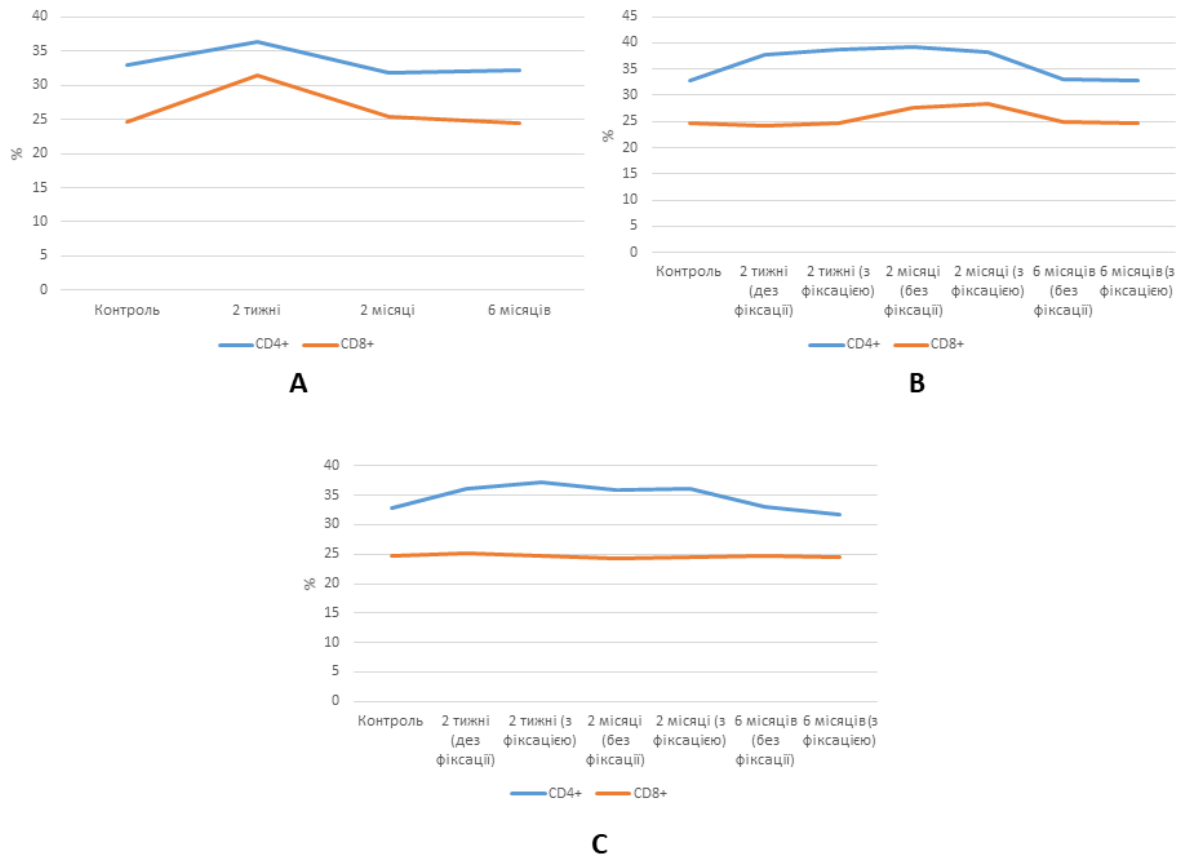


Рисунок 1 – Відсоток субпопуляцій Т-лімфоцитів при використанні для пластики твердої мозкової оболонки аутофасції (А), комерційного засобу на основі колагену (В) та засобу на основі хітозану (С)

При використанні хітозаної мембрани вміст імуореактивних CD4⁺ клітин зростав через 2 тижні відповідно на 8,9 % та 12,5 %. Зважаючи на наявність алогенного шовного матеріалу, переважне зростання вмісту CD4⁺ в даній групі свідчило про реакцію саме на нього. Через

2 місяці після операції вміст даної субпопуляції клітин залишався вищим за контроль на 6,4 % та 11,8 % з подальшою нормалізацією до 6 місяця спостереження. Упродовж усього експерименту ми не спостерігали змін вмісту CD8⁺ субпопуляції Т-лімфоцитів.

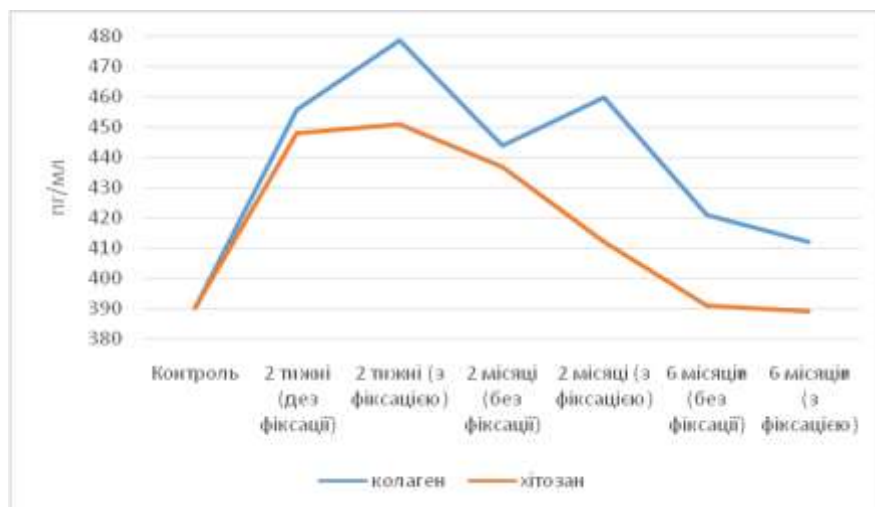


Рисунок 2 – Рівень Інтерлейкіну-2 в крові тварин при використанні для пластики твердої мозкової оболонки комерційного засобу на основі колагену та засобу на основі хітозану



Інтерлейкін-2 є глікопротеїном, який синтезується в основному Т-лімфоцитами, та здатний стимулювати процеси проліферації та диференціації Т-клітин [10]. У тварин до операції його рівень становив 390 ± 45 пг/мл та мав тенденцію до зростання у тварин при використанні аутофасції до 450 ± 69 пг/мл через 2 тижні. У терміни 2 та 6 місяців після пластики його рівень не відрізнявся від контролю (рис. 2).

Використання колагенової мембрани призводило до зростання вмісту ІЛ-2 від 17,5 % до

23 % через 2 тижні та 14,6 % і 18,4 % – через 2 місяці. Навіть через 6 місяців після операції його вміст залишався підвищеним на 9,3 % і 10,6 %. Використання хітозанової мембрани призводило до зростання вмісту ІЛ-2 через 2 тижні та 2 місяці після операції. Динаміка зростання його вмісту відповідала попередній серії. Проте через 6 місяців після пластики ТМО не спостерігалось достовірної різниці з контролем.

Висновки

Таким чином, застосування ауто- та аломатеріалів для пластики твердої мозкової оболонки призводило до реактивних змін в показниках імунної системи у терміни 2 тижні та 2 місяці після операції, що проявлялося дисбалансом

рівнів імуноглобулінів та ефекторних Т-клітин, а також підвищенням вмісту регуляторного ІЛ-2. У тварин з використанням колагенової мембрани вміст останнього залишався підвищеним навіть через 6 місяців після операції.

References (список літератури)

1. Sonig A, Thakur JD, Chittiboina P et al. Is posttraumatic cerebrospinal fluid fistula a predictor of posttraumatic meningitis? A US Nation wide Inpatient Sample data base study. *Neurosurg Focus*. 2012;32:E4.
2. Goldschmidt E, Landriel F, Bendersky D et al. Massive subarachnoid pneumocephalus after a stereotactic brain biopsy. *Neurology India*. 2011;59:640–1.
3. Schlosser RJ, Bolger WE. Nasal cerebrospinal fluid leaks: critical review and surgical considerations. *Laryngoscope*. 2004;114:255–65.
4. Arlt F, Trantakis C, Krupp W et al. Cerebrospinal fluid leak after microsurgical surgery in vestibular schwannomas via retrosigmoidal craniotomy. *Neurol Res*. 2011;33:947–52.
5. Dubey A, Sung W-S, Shaya M. et al. Complication of posterior cranial fossa surgery – an institutional experience of 500 patients. *Surg Neurol*. 2009;72:369–75.
6. Ahn JY, Kim SH. A new technique for dural suturing with fascia graft for cerebrospinal fluid leakage in transsphenoidal surgery. *Neurosurgery*. 2009;65(6 Suppl):65–71.
7. Kurpinski K, Patel S. Duramater regeneration with a novel synthetic, bilayered nanofibrous dural substitute: an experimental study. *Nanomedicine* (London, England). 2011;6:325–37.
8. Zerris VA, James KS, Roberts JB. Repair of the duramater with processed collagen devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83:580–8.
9. Yamada S, Aiba T, Endo Y et al. Creutzfeldt-Jakob disease transmitted by a cadaveric duramater graft. *Neurosurgery*. 1994;34:740–3.
10. Marzec M, Halasa K, Kasprzycka M et al. Differential effects of interleukin-2 and interleukin-15 versus interleukin-21 on CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1083–1091.

(received 17.12.2017, published online 09.01.2018)

(одержано 17.12.2017, опубліковано 09.01.2018)

