

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-135-144

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГОРТАНОГЛОТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ЭПИТЕЛИЗИРОВАННЫХ ЛОСКУТОВ

И.В. Ребрикова^{1, 2}, Е.А. Воротеяк³, О.С. Роговая³, А.П. Поляков^{1, 2}, А.В. Мордовский¹, М.В. Ратушный¹, А.Д. Каприн¹, А.В. Васильев³

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

После удаления распространенных злокачественных опухолей гортаноглотки и гортани образуются дефекты верхних пищеварительных путей, для устранения которых необходимы слизистая оболочка и мышечный компонент. **Целью** данного исследования является разработка методики реконструкции гортаноглотки с использованием преламинированных пекторальных лоскутов с аналогом эпителия слизистой оболочки из аутологичных эпителиальных пластов. **Материалы и методы.** Девяти пациентам выполнена реконструкция гортаноглотки биоинженерными преламинированными пекторальными лоскутами с восстановлением слизистой оболочки тканеинженерными аутологичными эпителиальными клеточными пластами, которые были получены путем культивирования *in vitro* клеток, выделенных из предварительно полученных у пациентов биоптатов кожи. **Результаты.** Во всех случаях было восстановлено пероральное питание. У одного (11%) пациента был выявлен стеноз глотки. Многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута выявлен в 67% случаев через 2 недели после преламинации, в 89% случаев – через 4 недели после реконструкции и в 100% случаев – через 3, 6, 12, 24 месяца после реконструкции. **Заключение.** Реконструкция с использованием преламинированных биоинженерных лоскутов позволяет воссоздать анатомическую целостность и функцию гортаноглотки.

Ключевые слова: дефекты гортаноглотки, реконструкция, преламинированный пекторальный лоскут, тканевая инженерия, эпителиальные пласты, кератиноциты.

HYPHARYNGEAL RECONSTRUCTION USING PRELAMINATED AUTOLOGOUS BIO-ENGINEERED PECTORALIS MAJOR FLAPS

I.V. Rebrikova^{1, 2}, E.A. Vorotelyak³, O.S. Rogovaya³, A.P. Polyakov^{1, 2}, A.V. Mordovskiy¹, M.V. Ratushnyy¹, A.D. Kaprin¹, A.V. Vasiliev³

¹ National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

² RUDN University, Moscow, Russian Federation

³ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russian Federation

After removal of metastatic malignant tumors of the hypopharynx and larynx, hypopharyngeal defects are formed. To restore the hypopharynx, a mucosa and a muscular component are needed. The **objective** of this study is to develop a hypopharyngeal reconstruction technique using prelaminated pectoralis major flap with mucosal epithelium analogue from autologous epithelial layers. **Materials and methods.** Nine patients underwent reconstruction of the hypopharynx using bioengineered prelaminated pectoralis major flaps. The mucosa was restored by tissue-engineered autologous epithelial cell layers that were obtained by culturing *in vitro* cells isolated from skin biopsies that were previously obtained from patients. **Results.** Oral nutrition was restored in all cases.

Для корреспонденции: Роговая Ольга Сергеевна. Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 26. Тел. (499) 135-40-81. E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Corresponding author: Olga Rogovaya. Address: 26, Vavilova str., Moscow, 119334, Russian Federation. Phone: (499) 135-40-81. E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Pharyngeal stenosis was detected in one (11%) patient. A stratified squamous epithelium on the pectoral fascia was revealed in 67% of cases at week 2 after prelamination, in 89% of cases at week 4 after reconstruction and in 100% of cases at month 3, 6, 12 and 24 after reconstruction. **Conclusion.** Reconstruction using prelaminated bioengineered flaps allows recreating the anatomical integrity and function of the hypopharynx.

Keywords: hypopharyngeal defects, reconstruction, prelaminated pectoralis major flap, tissue engineering, epithelial layers, keratinocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Пациенты с запущенными стадиями рака гортаноглотки и гортани (III и IV стадии) чаще всего являются кандидатами на комбинированное онкологическое лечение, сочетающее обширную хирургическую резекцию и реконструкцию с адьювантной лучевой или химиолучевой терапией. Иногда операция ограничивается удалением опухоли без реконструктивного этапа в связи с наличием выраженных сопутствующих заболеваний или лечением в неспециализированных клиниках.

Для реконструкции гортаноглотки применяют различные варианты лоскутов, в том числе местные с области шеи, перемещенные регионарные с области грудной клетки, перемещенные висцеральные, свободные микрохирургические кожно-фасциальные, кожно-мышечные, висцеральные и др. [1, 2]. Основным недостатком кожных лоскутов является рост волос в просвет глотки. Висцеральные лоскуты неприменимы у соматически ослабленных пациентов; их применение ограничено сопутствующей патологией органов брюшной полости и ранее выполненными вмешательствами на органах брюшной полости.

Идеальным материалом для реконструкции является аутологичная идентичная ткань, формирование которой включает минимально инвазивные процедуры на донорском участке. Известны попытки решить эти вопросы методами тканевой инженерии. Фрагменты эпителия слизистой оболочки были культивированы для использования в качестве биоматериалов [1]. Описано использование культивированных эпителиальных клеток для восстановления слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта. После резекции опухоли ротовой полости и эндоскопической резекции пищевода хирурги имплантировали тканеинженерные эпителиальные клеточные пласты на подлежащую ткань [3–5]. Важно отметить, что эпителиально-стромальное взаимодействие является ключевой детерминантой фенотипической динамики эпителия при гомеостазе и при повреждении. На эпителий и на направление дифференцировки эпителиальных стволовых клеток влияют подлежащие стромальные клетки, продуцирующие комплекс сигнальных молекул [6, 7].

Преламинация превращает нативный аксиальный лоскут в многослойный путем добавления соответствующих структур для композитной реконструк-

ции [8]. Это процесс, включающий имплантацию тканей или конструкторов в кровоснабжающее микроокружение до их переноса непосредственно в область дефекта [8–10].

Цель настоящего исследования – разработка методики реконструкции гортаноглотки преламинированными лоскутами с восстановлением слизистой оболочки тканеинженерными аутологичными эпителиальными клеточными пластами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заявление об этике

Проведено проспективное исследование с января 2018-го по декабрь 2019 года в МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Исследование было рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты подписали информированное согласие.

Пациенты

В исследование включены 9 пациентов с дефектами гортаноглотки после хирургического лечения по поводу злокачественных опухолей гортани. Они не были кандидатами на микрохирургическую реконструкцию из-за сопутствующей патологии. Во всех случаях реконструкция выполнялась отсроченно.

Характеристики пациентов представлены в таблице: восемь мужчин и одна женщина; возраст от 57 до 82 лет (медиана: 69,5). При гистологическом исследовании во всех случаях был плоскоклеточный рак. Шесть пациентов имели первичные опухоли III и IVA стадий. Шести пациентам с первичными опухолями гортани послеоперационная стадия была определена в соответствии с классификацией TNM 8-го пересмотра (разработанной и принятой Американским объединенным комитетом по исследованию рака AJCC и Международным союзом по борьбе с раком UICC). Опухолевый процесс у этих пациентов соответствовал индексам: T4a (n = 4), T3 (n = 2), N0 (n = 5), N2c (n = 1). Три пациента были с рецидивами опухолей после химиолучевой терапии. Всем пациентам выполняли ларингэктомию, резекцию гортаноглотки и одностороннюю и/или двустороннюю лимфаденэктомию в зависимости от состояния шейных узлов. Восемью пациентам проведена лучевая или химиолучевая терапия в соответствии с этапами противоопухолевого лечения до реконструктивного

этапа. Большинство пациентов имели сопутствующую патологию по индексу ACE-27. Дефект гортаноглотки после удаления опухоли был частичным с сохранением фрагмента слизистой оболочки задней стенки глотки во всех случаях (рис. 1, а).

Изготовление пластов аутологических клеток

Для выделения аутологических эпителиальных клеток использовали биоптат кожи с волосистой части головы пациента. Резекцию фрагмента кожи выполняли под местной анестезией, рану ушивали узловыми швами нитью Vicryl® 3,0. После взятия биоптата его помещали в специальный контейнер с транспортной средой (DMEM с 0,4 мг/мл гентамицина) и транспортировали в Институт биологии развития РАН. Процедуру выделения эпителиальных клеток проводили в день взятия биоптата. Все процедуры

выделения, культивирования и переноса клеточных культур на биополимерные матрицы проводили строго в асептических условиях в лаборатории.

Выделение эпидермальных кератиноцитов

Биоптаты кожи, полученные от донора, разрезали на полоски шириной 3 × 10 мм, промывали раствором PBS, помещали в 0,2% раствор диспазы (Sigma) и инкубировали при 4 °С в течение 18 часов. После ферментации эпидермис отделяли от дермы по линии базальной мембраны, промывали раствором PBS и проводили дополнительную ферментацию раствором трипсина в течение 10 минут для получения одноклеточной суспензии. Суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 6 минут, удаляли надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в культуральной среде для кератиноцитов.

Таблица

Демографические данные, методы лечения и периоды наблюдения
Demographic data, treatment modality, and follow-up periods

Пациент	Возраст	Пол	Локализация опухоли	Стадия	TNM	Первичная или рецидив	ЛТ/ХЛТ (Гр)	Предоперационная коморбидность (ACE-27)	Период наблюдения (мес.)
1	65	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (40)	Тяжелая Grade 3	27
2	59	Ж	гортань	IVA	T3N2cM0	Перв.	ЛТ (50)	Тяжелая Grade 3	25
3	57	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (46)	Умеренная Grade 2	24
4	61	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ХЛТ (59, 6)	Тяжелая Grade 3	20
5	60	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (50)	Тяжелая Grade 3	27
6	65	М	гортань	III	T3N0M0	Перв.		Тяжелая Grade 3	22
7	63	М	гортань		rT4aN0M0	Рец.	ХЛТ (66)	Умеренная Grade 2	27
8	70	М	гортань		rT4aN0M0	Рец.	ЛТ (50)	Умеренная Grade 2	24
9	82	М	гортань		rT4aN0M0	Рец.	ХЛТ (70)	Тяжелая Grade 3	10

Примечание. ЛТ – лучевая терапия; ХЛТ – химиолучевая терапия; Гр – Грей.

Note. ЛТ – radiation therapy; ХЛТ – chemoradiotherapy; Гр – Gray.

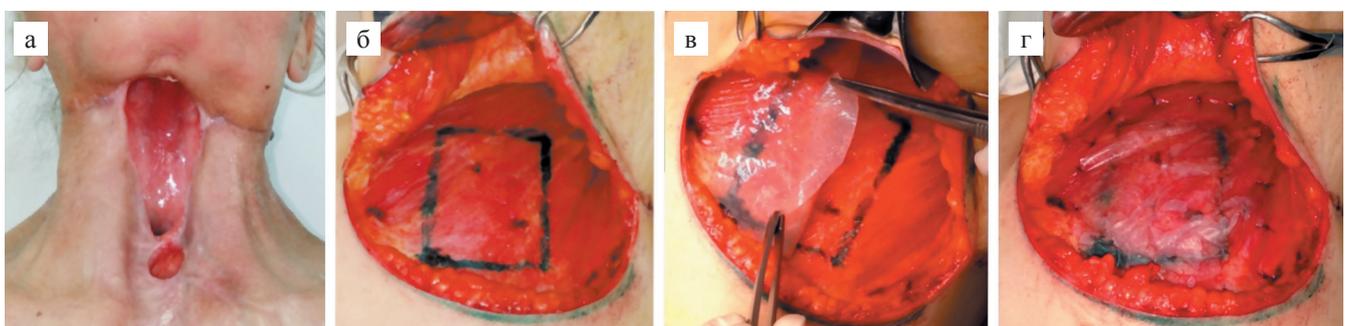


Рис. 1. Первый этап реконструктивной операции: а – пациентка с фарингостомой после комбинированного лечения рака гортани IVA стадии; б – хирургический доступ для преламинации; в – имплантация пласта эпителиальных клеток на фасцию большой грудной мышцы; г – изоляция пласта эпителиальных клеток пленкой

Fig. 1. The first stage of reconstructive surgery: а – patient with pharyngostomy after combined treatment of stage IVA laryngeal cancer; б – surgical access for prelamination; в – implantation of epithelial cell layer on the pectoral fascia; г – isolation of epithelial cell sheet with film

Культивирование эпидермальных кератиноцитов

Суспензию кератиноцитов высевали во флаконы для культивирования площадью 75 см² (Costar) в концентрации 2×10^5 клеток/мл по 15 мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С и влажности насыщения в среде Keratinocyte-SFM (Gibco). Клетки выращивали при регулярной смене среды (каждые 2 дня) в течение 3–6 недель до образования субконфлюентного слоя. Дату фарингопластики назначали в зависимости от скорости роста клеток пациента.

Иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализ

Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 минут, после чего проводили иммунофлуоресцентное определение маркера кератиноцитов с использованием первых антител фирмы Abscam против цитокератина 14 (ck14) (ab181595) и маркера стволовых и ранних прогениторных клеток эпидермиса – p63 (ab124762) по рекомендованной производителем методике. После инкубации препараты промывали PBS, а затем для визуализации добавляли раствор вторых антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 555 и Alexa Fluor 488 (ThermoFisher).

Иммуногистохимическое выявление маркеров кератиноцитов на поверхности мышечного лоскута проводили на гистологических препаратах, которые были окрашены на маркер общих цитокератинов – PanCk (ab7753) и p63 (ab124762). Были использованы первичные антитела фирмы Abscam по рекомендованной производителем методике, для визуализации продуктов реакции был использован пероксиазный метод и вторые антитела с комплексом стрептовидин-DAV, с последующим докрасиванием гематоксилин-эозином.

Посадка и выращивание клеточных культур на матрице

Для формирования клеточного слоя культивируемые кератиноциты высевали на поверхность матрицы, представляющей собой пластину толщиной 0,3–0,5 мм, состоящую из гиалуроновой кислоты и коллагена. Эпидермальные кератиноциты отделяли от культурального флакона с помощью смеси растворов трипсина и Версена (1 : 1). Суспензию эпидермальных кератиноцитов высевали в чашку Петри с помещенной в нее матрицей плотностью 4×10^5 клеток/см². Затем полученный пласт с кератиноцитами инкубировали в стандартных условиях, при 37 °С, 5% CO₂. Биоинженерный аутологичный пласт был готов к использованию примерно через 5–7 дней, в течение которых эпидермальные колонии образывали

вали конфлюентный слой на поверхности матрицы. Количество клеток по истечении этого срока должно быть $80 \pm 20 \times 10^5$ клеток/см². Готовые эпителиальные пласты на матрице упаковывали в стерильную упаковку и использовали в течение 12 часов.

Оценка жизнеспособности клеток на поверхности эпителиальных клеточных пластов

Фрагмент готового клеточного пласта помещали в лунку 48-луночного планшета и добавляли 0,5 мл рабочего раствора Calcein AM (BD Pharmingen). После 30-минутной инкубации клеточный пласт визуализировали под флуоресцентным микроскопом Olympus IX73 (оборудование ЦКП, Институт биологии развития РАН). Полученные микрофотографии позволили оценить морфологию жизнеспособных клеток и их распределение на поверхности матрицы.

Реконструктивные этапы

На первом этапе выполняли преламинацию биоинженерного мышечно-эпителиального лоскута.

Вначале формировали хирургический доступ к большой грудной мышце (рис. 1, б). Трансплантат, выращенный из аутологичных эпителиальных клеток пациента на матрице, имплантировали на фасцию большой грудной мышцы и фиксировали нитью Vicryl 5.0 (рис. 1, в). На него накладывали латексную пленку и фиксировали нитью Prolen 3.0 (рис. 1, г). Пласты эпителиальных клеток оставляли таким образом приживаться на 3 недели.

На втором этапе выполняли реконструкцию гортаноглотки. Вначале проводили мобилизацию краев фарингостомы (рис. 2, а). При формировании преламинированного пекторального мышечно-эпителиального лоскута большая грудная мышца была мобилизована от грудной стенки и перемещена на область дефекта, как при традиционной хирургической технике (рис. 2, б). Размер мышечного фрагмента пекторального лоскута определяли в соответствии с размером дефекта мягких тканей шеи. Поверхность большой грудной мышцы с преламинированным клеточным пластом (биоинженерный мышечно-эпителиальный лоскут) ориентировали так, чтобы она была направлена в просвет гортаноглотки (рис. 2, в). Биоинженерный фрагмент моделировали по размерам дефекта слизистой оболочки гортаноглотки и фиксировали с помощью нити Vicryl 2.0 к мобилизованным краям слизистой оболочки гортаноглотки по периметру фарингостомы (рис. 2, г). Мягкие ткани восстанавливали мышечной частью лоскута.

Послеоперационный период

Перед началом перорального питания всем пациентам выполняли рентгенографию гортаноглотки и шейного отдела пищевода для определения состоятельности, проходимости вновь сформированного органа и оценки функции глотания. При отсутствии признаков выхода контрастного препарата за контуры верхних пищеварительных путей назогастральный зонд удаляли, и пациенты начинали питание через рот. Оценка результатов проводилась через 2, 4 недели и 3, 6, 12, 24 месяца после фарингопластики. Выполнялась рентгенография глотки и пищевода с контрастным препаратом и видеофарингоскопия с биопсией. Биопсию биоинженерного фрагмента преламинированного лоскута с гистологическим исследованием проводили через 3 недели после преламинации, 2, 4 недели и 3, 6, 12, 24 месяца после фарингопластики.

Статистический анализ

Для анализа лечения и результатов использовалась только описательная статистика. Автор и соавторы имели доступ к данным, рассмотрели и одобрили окончательный вариант рукописи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всем пациентам была выполнена реконструкция гортаноглотки с использованием биоинженерного преламинированного мышечно-эпителиального пекторального лоскута, как описано выше.

Клетки, полученные от пациентов, проходящих курс противоопухолевой терапии, в первые несколько суток после выделения показывают низкую скорость роста и высокую чувствительность к условиям куль-

тивирования, поэтому для наращивания необходимой клеточной массы их выращивали в культуральных флаконах на специальной низкокальциевой, стимулирующей пролиферацию среде культивирования (рис. 3, а, б). Иммунофлуоресцентное исследование на этапе формирования клетками стабильной монослойной культуры выявило наличие типичных клеток эпителия, экспрессирующих маркер кератиноцитов – sk14 и большого количества клеток, положительных по маркеру стволовых и ранних прогениторных клеток эпидермиса р63 (рис. 3, б). После того как клетки формировали нормальный эпителиальный пласт, их переносили на биосовместимую матрицу. Основа используемой матрицы – коллагены и гиалуроновая кислота, толщина 0,5 мм. Таким образом, для каждого пациента создавали аутотрансплантат эпителиальной ткани площадью от 60 до 80 см² (рис. 3, в). Контроль наличия живых клеток в составе трансплантата осуществляли на флуоресцентном микроскопе, предварительно окрашивая небольшой участок трансплантата витальным красителем Calcein AM (рис. 3, г).

При гистологическом исследовании через 3 недели после преламинации выявлены участки с колониями кератиноцитов на поверхности мышечного лоскута (рис. 4). Положительная экспрессия цитокератинов (рис. 4, б) и специфического белка р63, характерная для кератиноцитов базального слоя кожи (рис. 4, г), указывает на принадлежность этих клеток к клеткам эпителиальной ткани. Это подтверждает то, что кератиноциты присутствовали на большой грудной мышце в течение 3 недель после трансплантации. Таким образом, через 3 недели предварительной подготовки мышечно-эпителиального лоскута

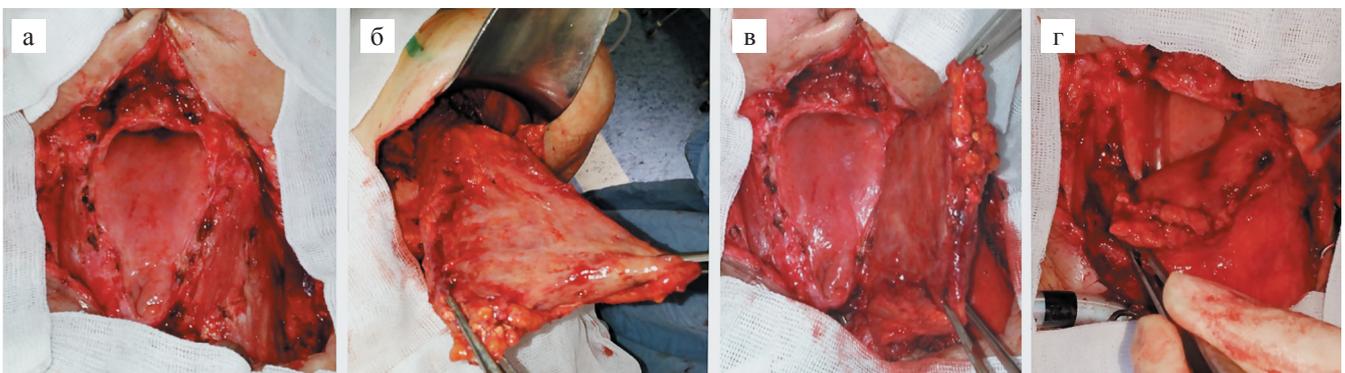


Рис. 2. Реконструкция глотки с использованием преламинированного биоинженерного пекторального лоскута: а – мобилизованные края фарингостомы; б – преламинированный биоинженерный пекторальный лоскут; в – перемещение на шею биоинженерного пекторального лоскута; г – фиксация преламинированного участка лоскута к мобилизованным краям слизистой оболочки по периметру фарингостомы

Fig. 2. Pharyngeal reconstruction using a prelaminated bioengineered pectoral flap: а – mobilized edges of the pharyngostoma; б – prelaminated bioengineered pectoral flap; в – movement of the bioengineered pectoral flap to the neck; г – fixation of the prelaminated flap section to the mobilized mucosa edges along the perimeter of the pharyngostoma

мы считали его готовым к реконструктивному этапу операции.

Средний период послеоперационного наблюдения составил 23,1 месяца (диапазон 10–27 месяцев). Видеофарингоскопия глотки и пищевода больных показала, что область имплантации эпителиально-клеточных пластов через 3, 6, 12, 24 месяца макроскопически неотличима от окружающей слизистой оболочки (рис. 5, а, в).

При гистологических исследованиях мы наблюдали многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута через 2 недели после фарингопластики в 78% случаев, через 4 недели после фарингопластики – в 89% случаев (рис. 5, б), через 3,

6, 12, 24 месяца после фарингопластики – в 100% случаев (рис. 5, г).

Питание через рот было восстановлено во всех случаях. Общее среднее время до возобновления питания составило 18 дней после операции (диапазон 14–22 дня). Средняя продолжительность послеоперационного пребывания в стационаре составила 17,5 дня (от 16 до 19 дней). Голосовая функция была восстановлена за счет имплантации голосового протеза в 78% случаев.

Некрозов лоскутов не зарегистрировано. Свищ наблюдали у 4 пациентов (44%). Причиной замедленного заживления ран и формирования несостоятельности швов в области швов глотки могла быть

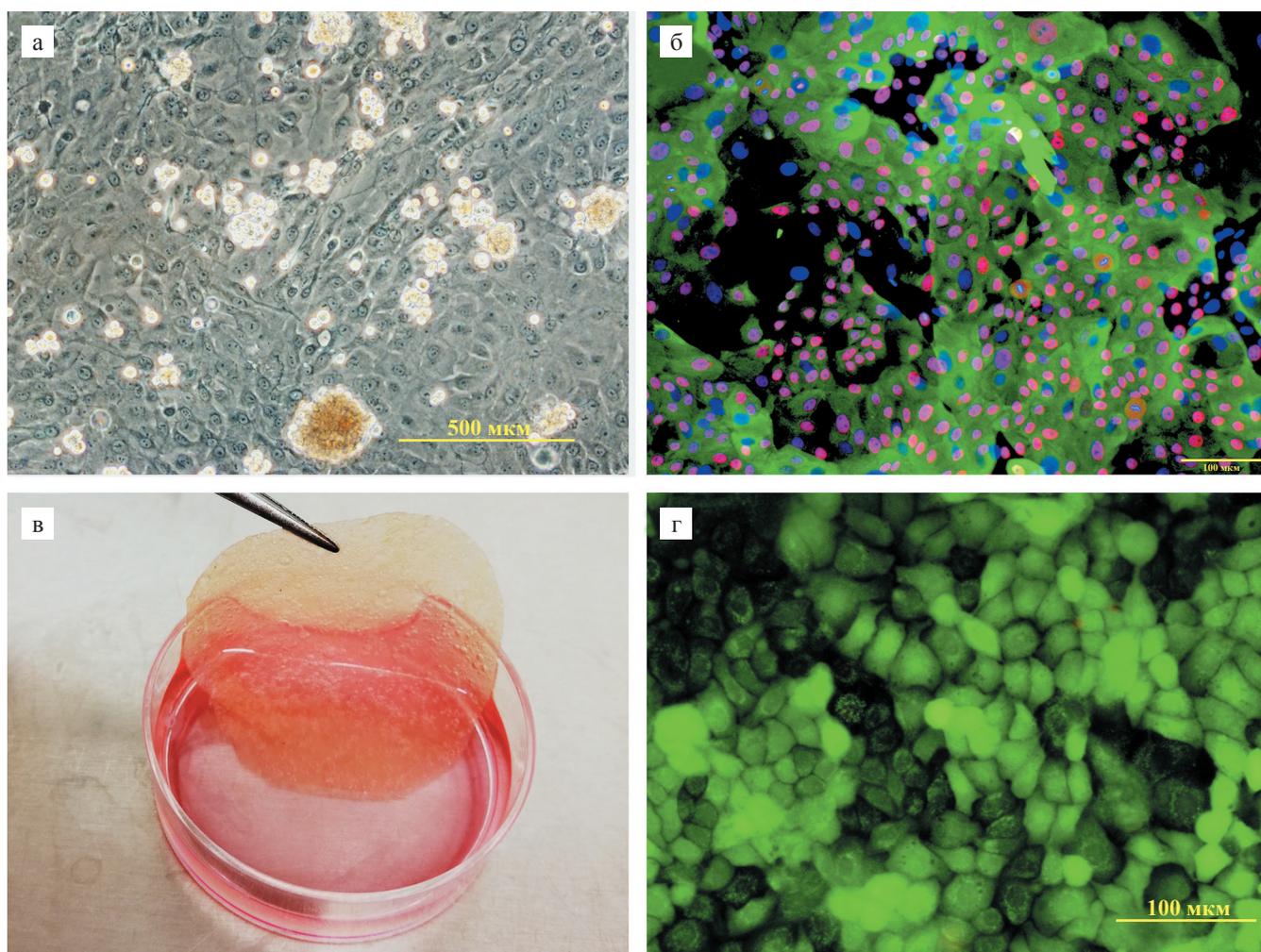


Рис. 3. Подготовка клеточного трансплантата. Культура аутологических кератиноцитов больного через 4 недели культивирования: а – фазовый контраст; б – иммунофлуоресцентное обнаружение специфического маркера кератиноцитов – ck14 (зеленое окрашивание), специфического эпидермального фактора транскрипции p63 (красное окрашивание), ядра окрашены DAPI (синее окрашивание); в – готовый к использованию трансплантат, внешний вид; г – микрофотография кератиноцитов человека, выращенных на поверхности матрицы, выявление жизнеспособных клеток с помощью витального красителя Calcein AM (зеленое окрашивание)

Fig. 3. Cell graft preparation. Culture of patient’s autologous keratinocytes at week 4 of cultivation: а – phase-contrast; б – immunofluorescence identification of keratinocyte-specific marker ck14 (green staining), specific epidermal transcription factor p63 (red staining), nuclei stained with DAPI (blue staining); в – ready-to-use graft, appearance; г – micrograph of human keratinocytes grown on matrix surface, detection of viable cells using viability dye Calcein AM (green staining)

проведенная до фарингопластики лучевая/химиолучевая терапия и алиментарная недостаточность. У всех пациентов свищи формировались в области анастомоза между верхним краем лоскута и основанием языка, закрывались в течение 7–10 дней после проведенной консервативной терапии и перевязок без необходимости дополнительного хирургического вмешательства. У одного пациента был стеноз гортаноглотки в области нижнего края фиксации лоскута. Выполнено бужирование области стеноза, в результате чего просвет гортаноглотки достиг диаметра 1 см. У этого пациента имеются трудности с глотанием только твердой пищи. Нагноение донорской области наблюдали у одного пациента, после проведения консервативной терапии и перевязок рана зажила.

ОБСУЖДЕНИЕ

Реконструкция верхних отделов пищеварительных путей после ларингэктомии с резекцией гортаноглотки остается серьезной проблемой для хирургов, занимающихся опухолями головы и шеи, так как в большинстве случаев выполняется после лучевой/химиолучевой терапии у соматически ослабленных пациентов [11]. Для устранения обширных дефектов после хирургического лечения применяются различные варианты реконструкции [12]. Метод реконструкции зависит от состояния здоровья пациента, возможностей клиники, размера и состава дефекта, лучевого анамнеза, предшествующих операций. Соматически ослабленные пациенты с высоким риском послеоперационных осложнений редко являются

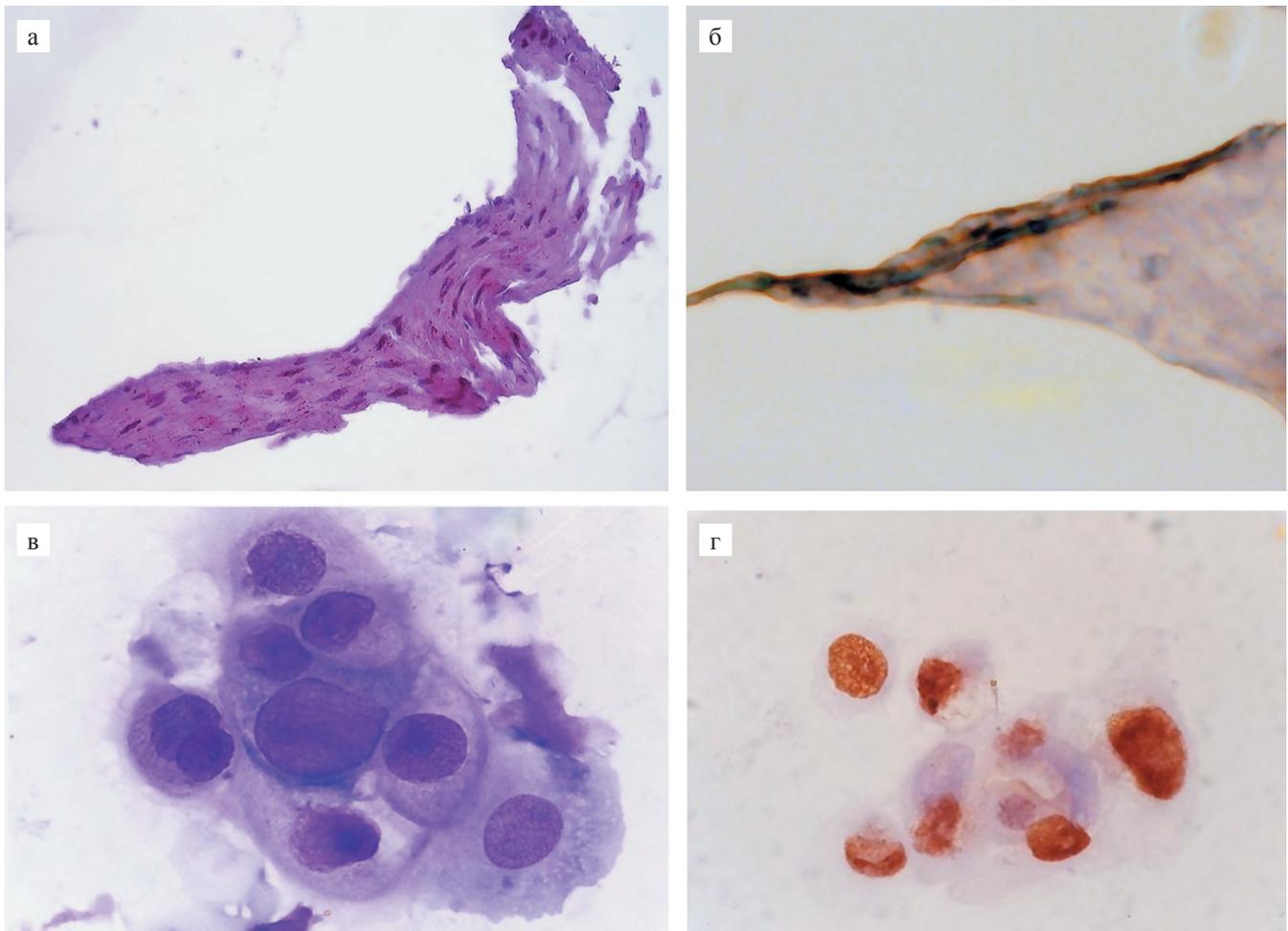


Рис. 4. Биоптат мышечного среза через 3 недели преламинации с эквивалентом эпителиальной ткани: а – фрагмент мышечной ткани из зоны трансплантации, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; б – иммуногистохимическое исследование, экспрессия общих цитокератинов, окрашивание DAB, $\times 100$; в – цитологическое исследование поверхности мышечного лоскута с готовым аналогом, окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$; г – иммуногистохимическое выявление эпидермального фактора транскрипции p63 в ядрах клеток, окрашивание DAB, $\times 1000$

Fig. 4. Biopsy of muscle slice at week 3 of prelamination with epithelial tissue equivalent: a – a fragment of muscle tissue from the transplantation area (H&E staining, $100\times$); б – immunohistochemistry, expression of common cytokeratins (DAB staining, $100\times$); в – cytological study of muscle flap surface with a ready-made analog (H&E staining, $1000\times$); г – immunohistochemical detection of epidermal transcription factor p63 (DAB, $1000\times$) in cell nuclei

приемлемыми кандидатами для микрохирургических операций. Из-за этих ограничивающих факторов перемещенные лоскуты остаются предпочтительным методом [13]. Биоинженерный лоскут в ряде случаев может быть хорошей альтернативой стандартным кожно-мышечным лоскутам. Развитие биоинженерных технологий позволяет создавать тканевые аналоги слизистой оболочки, используемые для восстановления слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта, полости рта, уретры, мочевого пузыря, влагалища и роговицы. Восстановление поврежденной эпителиальной ткани в таком случае происходит за счет того, что в составе трансплантата есть аутологичные низкодифференцированные клетки базального слоя эпидермиса, которые могут

пролиферировать и встраиваться в место дефекта. При этом окружающие биоинженерную конструкцию ткани оказывают влияние на входящие в его состав клетки. В частности, было установлено, что клетки роговицы способны к трансдифференцировке в клетки эпидермиса под действием сигналов из эмбриональной дермы [14]. Пластичность эпидермальных кератиноцитов наблюдали и в опытах по трансплантации клеток в уретру. Показано, что через три недели после трансплантации в уретру аутологичных EGFP-экспрессирующих кератиноцитов кожи кроликов они восстанавливают уротелий, проявляя признаки экспрессии специфического маркера [15]. Недавно была продемонстрирована способность клеток пищевода к дифференцировке в кожном на-

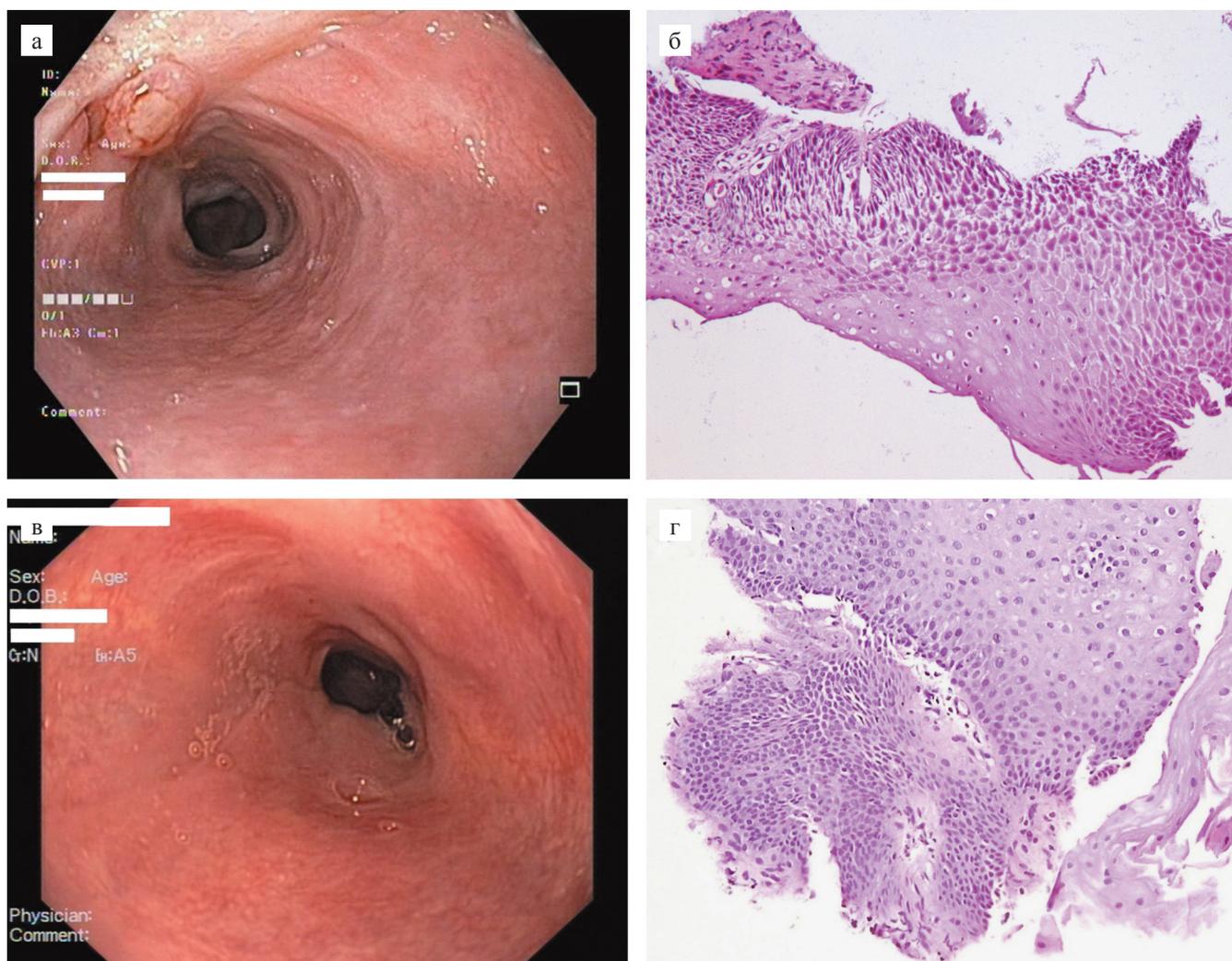


Рис. 5. Данные послеоперационных исследований: а – видеофарингоскопия через 4 недели после фарингопластики; б – при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий, окраска гематоксилином и эозином; в – видеофарингоскопия через 24 месяца после фарингопластики; г – при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий с пролиферацией базальных слоев, окраска гематоксилином и эозином

Fig. 5. Postoperative data: а – videolaryngoscopy at week 4 after pharyngoplasty; б – H&E, at 100× magnification shows stratified squamous epithelium; в – videolaryngoscopy at month 24 after pharyngoplasty; г – H&E, at 100× magnification shows stratified squamous epithelium with basal layer proliferation

правлении под влиянием стромы взрослой кожи [16]. Поскольку собственно гортаноглотка выстлана неороговевающим многослойным плоским эпителием, было резонно предположить, что эпидермис весьма пригоден для его замены. В увлажненной среде эпидермальные кератиноциты теряют способность к ороговению, как это происходит в культуральных условиях. Таким образом, они вполне могут выполнять функции эпителия глотки. Ранее было опубликовано исследование, в котором для реконструкции гортаноглотки использовали перемещенный мышечный трансплантат, состоящий из большой грудной мышцы с предварительно имплантированным тканевым эквивалентом слизистой оболочки, созданным на основе культивированных донорских кератиноцитов. Донорские клетки, используемые в качестве эпителиального слоя в таких конструкциях, способны временно выполнять функцию барьерного эпителия, обеспечивая надежное приживание трансплантата в зоне реципиентных тканей, а также модифицировали раневую поверхность, стимулируя собственную эпителизацию раны [5].

При устранении дефектов гортаноглотки после удаления местнораспространенных опухолей необходимо комплексное восстановление мягких тканей и слизистой оболочки, а также нормального функционирования пищеварительного тракта и голосовой функции. Преламинация культивированных клеток на хорошо кровоснабженную ткань большой грудной мышцы позволяет создавать лоскуты с требуемыми свойствами: на поверхности мышцы успевает сформироваться слой эпителиальных клеток, которые вместе с мышечной тканью возможно формировать по размерам существующего дефекта. Мы использовали биоинженерные преламинированные лоскуты для реконструкции обширных дефектов гортаноглотки. Использование выращенного из кожи пациента эпителиального пласта вместо полнослойного аутодермолоскута позволяет избежать таких осложнений, как врастание волос в просвет гортани, стенозирование просвета верхних пищеварительных путей в послеоперационном периоде. Осложнения в виде свищей, наблюдаемые у пациентов в нашем исследовании, составляют 44%, что сопоставимо с известной из литературных данных частотой свищей у пациентов, получивших предоперационное облучение, которое колеблется от 13 до 50% [17]. У 56,5% пациентов после реконструктивных операций с использованием кожно-мышечных лоскутов описывают затруднение глотания твердой пищи, а у 21,7% – трудности при глотании как твердой, так и жидкой пищи [17]. В нашем исследовании у 1 (1%) больного был стеноз глотки, который после проведения бужирования стал причиной проблем с глотанием только твердой пищи. На основании проведен-

ных послеоперационных наблюдений можно сделать вывод, что разработанная нами методика позволяет восстановить анатомию и функции гортаноглотки идентичными тканями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование методики реконструкции гортаноглотки преламинированным биоинженерным лоскутом позволило воссоздать анатомическую целостность и функцию гортаноглотки во всех описанных 9 клинических случаях.

Работа завершена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0016 и Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-4667.2018.7.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kim Evans KF, Mardini S, Salgado CJ, Chen HC. Esophagus and hypopharyngeal reconstruction. *Semin Plast Surg.* 2010; 24 (2): 219–226. doi: 10.1055/s-0030-1255339.
2. Rauchenwald T, Dejaco D, Morandi EM et al. The Pectoralis Major Island Flap: Short Scar Modified Muscle-Sparing Harvesting Technique Improves Aesthetic Outcome in Reconstructive Head and Neck Surgery. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2019; 81 (5–6): 327–337. doi: 10.1159/000503008.
3. Jonas E, Sjöqvist S, Elbe P et al. Transplantation of tissue-engineered cell sheets for stricture prevention after endoscopic submucosal dissection of the oesophagus. *United European Gastroenterol J.* 2016; 4 (6): 741–753. doi: 10.1177/20506406166631205.
4. Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N. Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0125391. doi: 10.1371/journal.pone.0125391.
5. Чиссов ВИ, Решетов ИВ, Васильев АВ, Кравцов СА, Терских ВВ, Батухтина ЕВ и др. Клинические аспекты биоинженерной реконструкции глотки у онкологических больных. *Онкохирургия.* 2012; 4 (3): 29–33. Chissov VI, Reshetov IV, Vasil'ev AV, Kravtsov SA, Terskikh VV, Batukhtina EV i dr. Klinicheskie aspekty bioinzhenernoy rekonstruktsii glotki u onkologicheskikh bol'nykh. *Onkokhirurgiya.* 2012; 4 (3): 29–33.
6. Pereira D, Sequeira I. A Scarless Healing Tale: Comparing Homeostasis and Wound Healing of Oral Mucosa With Skin and Oesophagus. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 682143. doi: 10.3389/fcell.2021.682143.
7. Wang J, He J, Zhu M et al. Cellular Heterogeneity and Plasticity of Skin Epithelial Cells in Wound Healing

- and Tumorigenesis. *Stem Cell Rev and Rep.* 2022; doi: 10.1007/s12015-021-10295-8.
8. Pribaz JJ, Fine NA. Prelamination: defining the prefabricated flap – a case report and review. *Microsurgery.* 1994; 15 (9): 618–623. doi: 10.1002/micr.1920150903.
 9. Pribaz JJ, Fine NA. Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction. *Clin Plast Surg.* 2001; 28 (2): 261–272.
 10. Pribaz JJ, Maitz PK, Fine NA. Flap prefabrication using the «vascular crane» principle: an experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg.* 1994; Jun, 47 (4): 250–256. doi: 10.1016/0007-1226(94)90007-8.
 11. Pribaz JJ, Fine N, Orgill DP. Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103 (3): 808–820. doi: 10.1097/00006534-199903000-00006.
 12. Wang Q, Chen R, Zhou S. Successful management of the supraclavicular artery island flap combined with a sternohyoid muscle flap for hypopharyngeal and laryngeal reconstruction. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98 (41): e17499. doi: 10.1097/MD.00000000000017499.
 13. Ki SH, Choi JH, Sim SH. Reconstructive Trends in Post-Ablation Patients with Esophagus and Hypopharynx Defect. *Arch Craniofac Surg.* 2015; 16 (3): 105–113. doi: 10.7181/acfs.2015.16.3.105.
 14. Pearton DJ, Yang Y, Dhouailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 (10): 3714–3719.
 15. Роговая ОС, Файзулин АК, Васильев АВ, Кононов АВ, Терских ВВ. Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи. *Acta Naturae.* 2015; 7 (1): 74–81. Rogovaya OS, Fayzulin AK, Vasiliev AV, Kononov AV, Terskikh VV. Reconstruction of Rabbit Urethral Epithelium with Skin Keratinocytes. *Acta Naturae.* 2015; 7 (1): 70–77.
 16. Bejar MT, Jimenez-gomez P, Moutsopoulos I, Colom B, Han S. Defining the transcriptional signature of esophageal-to-skin lineage conversion. 2021; bioRxiv [Preprint]. doi: 10.1101/2021.02.19.431899.
 17. Somuk BT, Çiftçi O, Aygenç E. Evaluation of Cases Who Underwent Reconstruction Through Pectoralis Major Myocutaneous Flap after Laryngopharyngectomy. *Turk Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 54 (2): 58–62. doi: 10.5152/tao.2016.1603.

Статья поступила в редакцию 05.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 05.07.2022