

ГИПОКСИЧЕСКОЕ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ДОНОРСКОЙ ОБЛАСТИ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТА КОЖИ

DOI: 10.17691/stm2018.10.3.13

УДК 616.5–089.844

Поступила 10.02.2018 г.



Н.Ю. Орлинская, д.м.н., профессор, руководитель отделения патологической анатомии с консервацией тканей Института травматологии и ортопедии¹;

Д.В. Давыденко, к.б.н., научный сотрудник отделения патологической анатомии с консервацией тканей Института травматологии и ортопедии¹;

М.В. Багрянцев, врач-хирург²;

М.Г. Рябков, д.м.н., хирург-консультант²;

В.В. Кичин, врач-хирург²;

И.В. Павленко, врач-хирург²;

В.В. Бесчастнов, д.м.н., хирург-консультант²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Городская клиническая больница №30, Н. Новгород, 603157, ул. Березовская, 85а

Цель исследования — оценить эффективность метода гипоксического preconditionирования донорской области путем клинико-морфологического изучения свойств сформированного аутодермотрансплантата.

Материалы и методы. Аутодермотрансплантаты формировали из области гипоксического preconditionирования донорской зоны. Исследовали процессы репаративной регенерации, ангиогенез в кожном трансплантате и косметический эффект при заживлении донорской раны. С этой целью пяти пациентам с хроническими ранами мягких тканей на фоне сахарного диабета выполняли свободную кожную пластику традиционным способом (контрольная группа), пяти пациентам — с гипоксическим preconditionированием донорской зоны (основная группа). На 5-е сутки после свободной кожной пластики проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследование аутодермотрансплантата, на 14-е сутки после кожной пластики оценивали площадь приживления трансплантата.

Результаты. Площадь приживления аутодермотрансплантата на 14-е сутки в контрольной группе составила 56 [52; 64]%, в основной группе — 91 [84; 95]% ($p=0,007$). Заживление донорских ран у больных в контрольной группе отмечено на 18 [16; 21]-е сутки, в основной группе — на 14 [12; 17]-е ($p=0,002$). По данным прижизненного гистологического исследования биоптата в основной группе отмечался богатоклеточный фрагмент кожи в сравнении с бедноклеточным фрагментом кожи в контрольной. При двойном последовательном иммуногистохимическом окрашивании препаратов с использованием антител к антигенам Ki-67 и CD31 в основной группе отмечалась повышенная пролиферация эндотелиальных клеток дермы: индекс пролиферации в контрольной группе составил 17 [13; 24]%, в основной — 29 [22; 33]% ($p=0,011$). Повышение антител к VEGF и Flt-1 в основной группе также указывало на интенсивность процессов ангиогенеза у этих пациентов.

Заключение. Результаты прижизненного гистологического и иммуногистохимического исследования свидетельствуют об эффективности гипоксического preconditionирования донорской области с целью повышения интенсивности процессов репаративной регенерации и ангиогенеза в трансплантате.

Ключевые слова: свободная кожная пластика; аутодермотрансплантат; гипоксическое preconditionирование; ангиогенез; репаративная регенерация.

Как цитировать: Orlynskaya N.Yu., Davydenko D.V., Bagryantsev M.V., Ryabkov M.G., Kichin V.V., Pavlenko I.V., Beschastnov V.V. Hypoxic preconditioning of the skin graft donor area: clinical and morphological assessment. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 110–117, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.13>

Для контактов: Багрянцев Максим Владимирович, e-mail: maks-bagryantsev@mail.ru

English

Hypoxic Preconditioning of the Skin Graft Donor Area: Clinical and Morphological Assessment

N.Yu. Orlinskaya, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathology and Tissue Preservation, Institute of Traumatology and Orthopedics¹;

D.V. Davydenko, PhD, Researcher, Department of Pathology and Tissue Preservation, Institute of Traumatology and Orthopedics¹;

M.V. Bagryantsev, MD, Surgeon²;

M.G. Ryabkov, MD, DSc, Surgeon-Consultant²;

V.V. Kichin, MD, Surgeon²;

I.V. Pavlenko, MD, Surgeon²;

V.V. Beschastnov, MD, DSc, Surgeon-Consultant²

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²Municipal Clinical Hospital No.30, 85a Berezovskaya St., Nizhny Novgorod, 603157, Russia

The aim of the study was to evaluate the method of hypoxic preconditioning of the donor area using clinical and morphological assessment of the autologous dermal transplant (skin graft).

Materials and Methods. The transplants were prepared from the skin donor area after hypoxic preconditioning. Reparative regeneration, skin graft angiogenesis and the cosmetic status of the donor area wound upon healing were studied. To this end, five patients with diabetes-associated soft tissue wounds underwent classic free skin plastic surgery (control group), and five patients underwent the similar operation preceded by hypoxic preconditioning of the donor zone (study group). On day 5 after the surgery, morphological and immunohistochemical examination of the skin transplant was performed; on day 14, the area of engraftment was evaluated.

Results. On day 14, the area of engraftment of the autologous transplant in the control group was 56 [52; 64]%, and in the study group — 91 [84; 95]% ($p=0.007$). The healing of the donor area wounds in the control group was detected on day 18 [16; 21], in the study group — on day 14 [12; 17] ($p=0.002$). In the intravital histological staining of the biopsy specimen, cell-enriched skin fragments were found in the study group, whereas only cell-depleted skin fragments were observed in the control group. Upon the double sequential immunohistochemical staining with antibodies to Ki-67 and CD31 antigens, increased proliferation of endothelial cells of the dermis was noted in the study group, with the proliferation index of 29 [22; 33] versus 17 [13; 24]% in the control group ($p=0.011$). The increased levels of antibodies to VEGF and Fli-1 in the study group also pointed to the active angiogenesis in these patients.

Conclusion. The results of the intravital histological and immunohistochemical study indicate that hypoxic preconditioning of the donor area can serve an effective tool of increasing the reparative regeneration and angiogenesis in the skin graft.

Key words: free skin plastic surgery; autologous skin graft; hypoxic preconditioning; angiogenesis; reparative regeneration.

Введение

Одной из основных этиологических причин возникновения хронических ран мягких тканей при диабете является тканевая гипоксия на фоне поражения сосудов нижних конечностей [1]. Синдром диабетической стопы развивается у 8–10% таких больных, при этом, по данным ВОЗ, за период с 1980 по 2014 г. количество больных диабетом увеличилось в 4 раза [2]. Современные возможности эндоваскулярной хирургии с большой вероятностью позволяют предотвратить ампутацию конечности при критической ишемии [3], однако при этом сохраняются хронические раны и встает задача закрытия раневого дефекта в условиях тканевой гипоксии. Трудности решения этой задачи обусловлены особенностью раневого процесса на фоне гипергликемии — нарушением микроциркуляции в области раневого дефекта: в базальной мембране артериол накапливаются гликопротеины, утолщается

стенка капилляров, что резко затрудняет диффузию кислорода [4].

Эффективным способом закрытия хронических ран служит свободная кожная пластика расщепленным лоскутом [5]. Известно, что ключевым фактором в процессе приживления аутодермотрансплантата является активность ангиогенеза [6–8]. В нормальных условиях кожный трансплантат, помещенный в реципиентную рану, получает питание путем диффузии, а прорастание сосудов отмечается на 5-е сутки после операции [9]. Для подготовки трансплантата к условиям недостатка кислорода и повышения вероятности его выживания в стрессовых условиях гипоксии предложено несколько методов гипоксического прекондиционирования донорской области перед взятием расщепленного кожного лоскута [10]. Суть любого из методов гипоксического прекондиционирования сводится к снижению уровня микроциркуляции в донорской области и имитации таким образом гипоксиче-

ского состояния тканей в области раневого дефекта, при этом контроль кровоснабжения осуществляют при помощи лазерной доплеровской флоуметрии или тканевой оксиметрии.

Ранее нами [11] по данным иммуноферментного анализа было установлено, что в результате гипоксического прекондиционирования (снижения микроциркуляции в коже донорской области) путем нанесения двух параллельных разрезов кожи и подкожной клетчатки глубиной до поверхностной фасции повышается концентрация специфического цитокина и кислородочувствительного белка — индуцированного гипоксией фактора (HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α). Этот фактор, накапливаясь в тканях в условиях гипоксии, отвечает за экспрессию белков, контролирующих доставку кислорода в клетку, и является ключевым регулятором для основных факторов ангиогенеза. Кроме того, результаты фундаментальных исследований [12] позволяют предположить, что накопление цитокина HIF-1 α в коже донорского участка приведет к активации процессов ангиогенеза и в аутодермотрансплантате, взятом из этой области. Данных, позволяющих объективно оценить изменения активности ангиогенеза и репаративной регенерации в кожном трансплантате после его гипоксической тренировки, в доступной литературе мы не обнаружили.

Цель исследования — оценить эффективность метода гипоксического прекондиционирования донорской области путем клинико-морфологического изучения свойств сформированного аутодермотрансплантата.

Материалы и методы

Клиническое исследование одобрено Этическим комитетом по проведению научных исследований с участием человека в качестве объекта исследования Приволжского федерального исследовательского университета и выполнено в полном соответствии с действующими нормативно-правовыми актами. Критериями включения в исследование явились:

добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании;

нейроишемическая форма синдрома диабетической стопы II стадии по F.M. Wagner;

выполненная не ранее чем за 14 сут до включения пациента в исследование реконструктивная сосудистая операция на артериях нижних конечностей;

наличие магистрального кровотока в артериях нижних конечностей по данным ультразвуковой доплерографии;

состояние реципиентной раневой поверхности, оцениваемое в 16–17 баллов по Шкале готовности реципиентной раны к свободной аутодермопластике НИИ им. Ю.Ю. Джанелидзе.

В настоящее исследование включены результаты лечения 10 больных (7 женщин и 3 мужчин) с хроническими ранами мягких тканей, сформировавшимися в результате гнойно-некротических осложнений синдро-

ма диабетической стопы. Все пациенты находились на лечении в отделении гнойной хирургии Городской клинической больницы №30 Н. Новгорода в 2016–2017 гг. Возраст больных варьировал от 55 до 85 лет, средний возраст составил 63,2 \pm 8,1 года. Все больные страдали сахарным диабетом 2-го типа. Пациенты были разделены на две группы: основная (n=5) — с гипоксическим прекондиционированием донорской зоны и контрольная (n=5) — со свободной кожной пластикой традиционным способом.

Подготовка дефекта мягких тканей (реципиентной раны) к кожной пластике в обеих группах осуществлялась одинаково: ежедневная смена повязок с мазью на полиэтиленоксидной основе; механическое удаление остатков нежизнеспособных тканей и фибрина; за двое суток перед выполнением кожной пластики использовали повязки с протеолитическими ферментами (химотрипсин). У пациентов основной группы донорскую область (переднелатеральная область бедра) предварительно подвергали гипоксическому прекондиционированию по методике В.В. Бесчастнова и соавт. [11]: под местной анестезией наносили два параллельных разреза кожи глубиной до поверхностной фасции длиной 10 см на расстоянии 5 см друг от друга. Под контролем лазерной доплеровской флоуметрии выполняли мобилизацию лоскута кожи до снижения показателя микроциркуляции на 50% от исходного, после чего на разрезы накладывали внутрикожный косметический шов нитью Пролен 4,0.

Объектом изучения служила хроническая рана мягких тканей, закрытая при помощи свободной кожной пластики. Исследовали также процессы репаративной регенерации и ангиогенеза в кожном трансплантате, сформированном из донорской области, не подвергавшейся и предварительно подвергавшейся гипоксическому прекондиционированию, и косметический эффект при заживлении донорской раны. Научная гипотеза заключалась в том, что трансплантат кожи, сформированный из донорской области с предварительным гипоксическим прекондиционированием, имеет большую площадь приживления ввиду стимуляции выделения проангиогенных факторов. Критериями, позволяющими оценить правильность этого предположения, служили: относительная площадь приживления трансплантата; степень экспрессии белка Ki-67, которая позволяет судить о скорости размножения клеток, поскольку этот протеин экспрессируется во всех фазах клеточного цикла кроме фазы G0 (синтетическая); а также концентрация проангиогенных факторов: CD31, Fli-1, васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF) по данным иммуногистохимического анализа.

У всех больных электродерматомом выполняли забор расщепленного кожного трансплантата, затем его на 2 мин помещали в физиологический раствор, содержащий 4 мг дексаметазона, после чего перфорировали и фиксировали на реципиентной ране. На

донорскую рану пациентам основной группы с целью скорейшего заживления области разрезов накладывали повязку, содержащую гистозквивалент-биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты и коллагена (G-Derm, Россия), пациентам контрольной группы — стерильную марлевую повязку, пропитанную 5% раствором перманганата калия.

На 3-и сутки после свободной аутодермопластики выполняли первую перевязку реципиентной раны. Из дистального края трансплантата сосудистыми ножницами иссекали жизнеспособный участок (биоптат) размерами 5×5 мм. Материал фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина. Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате Excelsior ES (Thermo Scientific, США). После проводки изготовляли парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, США). Срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Двойное последовательное иммуногистохимическое окрашивание проводили в автоматизированном модуле BOND-MAX, используя систему детекции bond polymer refine detection (протокол F) и Bond polymer refine red detection (протокол J) (Leica Biosystems, Великобритания). Были использованы моноклональные антитела к Ki-67 — clon SP6 (Lab Vision Corporation, США), к CD31 антигену — clon JC70A (Lab Vision Corporation, США), к Fli-1 — clon MRQ-1 (Cell Marque, США) и антитела к VEGF — polyclonal (Diagnostic BioSystems, США).

Для оценки пролиферативной активности подсчитывали количество Ki-67-положительных клеток в дермотрансплантате (в 10 полях зрения) при увеличении в 400 раз. Реакция с моноклональными антителами к Ki-67 позволяет определить количество клеток, подвергшихся делению, поскольку белок экспрессируется только в ядрах пролиферирующих клеток и выявляется в G1- (в конце фазы), G2-, S- и M-фазах клеточного цикла с максимальной экспрессией в фазах G2 и M [13]. Индекс пролиферации (ИП) определяли по формуле

$$\text{ИП}=(n/N)\cdot 100\%,$$

где n — количество меченых ядер; N — общее число ядер в поле зрения микроскопа.

Для планиметрической оценки динамики площади приживления трансплантата проводили макрофото-съемку реципиентной раны при помощи цифровой фотокамеры. Площадь аутодермотрансплантата измеряли на фотоснимках, используя программу ImageJ.

Для оценки результатов свободной кожной пластики расщепленным лоскутом использовали показатель P — доля площади приживления аутодермотрансплантата, который рассчитывали по формуле

$$P=S_1/S_2\cdot 100\%,$$

где S_1 — площадь трансплантата непосредственно после пересадки на реципиентную рану, см²; S_2 — площадь трансплантата на 14-е сутки после операции, см².

Для статистической обработки полученных данных использовали компьютерную программу Statistica 6.0. Для оценки статистической значимости различий при сравнении групп по качественному признаку применяли точный метод Фишера, по количественному признаку — U-критерий Манна–Уитни. Выборочные параметры, приводимые далее, имеют следующие обозначения: Me — медиана, Q_1 — верхний квартиль, Q_3 — нижний квартиль, n — объем анализируемой подгруппы, p — величина статистической значимости различий. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5% ($p\leq 0,05$).

Результаты

Оценка эффективности лечения хронической раны мягких тканей показала, что доля площади приживления аутодермотрансплантата кожи в основной группе составила 91 [84; 95]%, в контрольной — 56 [52; 64]% ($p=0,007$).

Заживление донорских ран в контрольной группе отмечено на 18 [16; 21]-е сутки, при этом на перевязках больные чувствовали дискомфорт в связи с высыханием повязок и прилипанием их к ране, наблюдались участки изъязвления, формирование грубого рубца. У всех больных основной группы неосложненное заживление донорских ран зафиксировано на 14 [12; 17]-е ($p=0,002$) сутки, а лечение под повязками G-Derm протекало менее болезненно (рис. 1, а). В основной группе косметический эффект лечения донорской раны все больные оценивали как хороший. В отдаленном послеоперационном периоде формировался мягкий эластичный подвижный участок кожи телесного цвета (рис. 1, б).

Гистологическая картина образцов аутодермотрансплантата основной группы представляла собой богатоклеточный фрагмент кожи с большим количеством сосудов эндотелиального типа (рис. 2, а). В контрольной группе имелись бедноклеточные участки (рис. 2, б).

На поверхности трансплантата, контактирующей с реципиентным ложем, отображаются выраженные явления ангиогенеза с формированием капилляров. При двойном последовательном иммуногистохимическом окрашивании с использованием антител к Ki-67 и CD31 антигенам в основной группе отмечали повышенную пролиферацию эндотелиальных клеток дермы (рис. 3, а) по сравнению с контрольной (рис. 3, б).

Сетчатый слой трансплантата, сформированного традиционным способом, содержал незначительные очаги некроза соединительной ткани, в подкожно-жировой клетчатке преобладали явления отека и воспаления. В ткани трансплантата после гипоксического

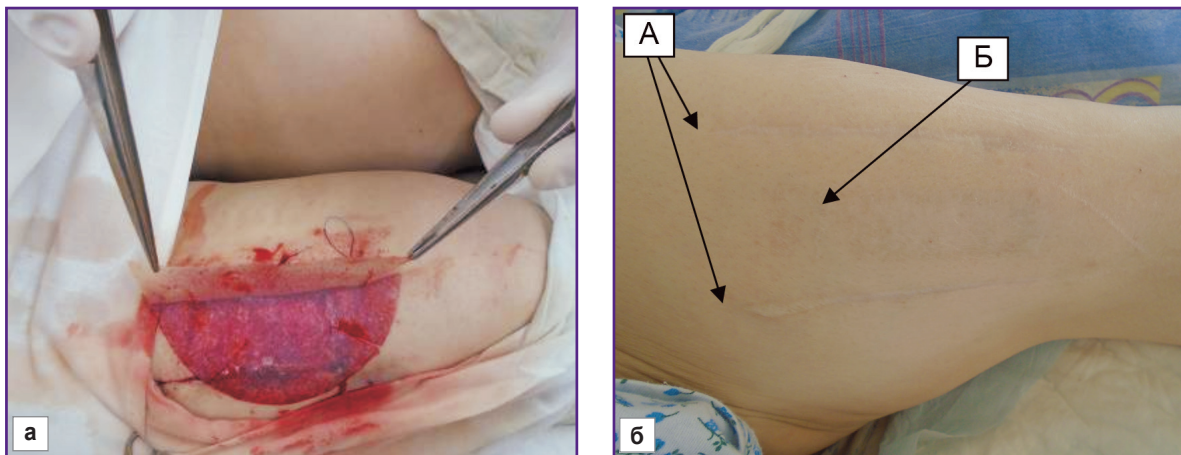


Рис. 1. Заживление донорской раны у пациентки Е.:
 а — покрытие гистоквивалент-биопластическим материалом G-Derm после процедуры гипоксического пре-кондиционирования; б — вид раны через 1 год: А — рубцы после формирования двух параллельных разрезов; Б — участок донорской раны после формирования трансплантата, рубцевание

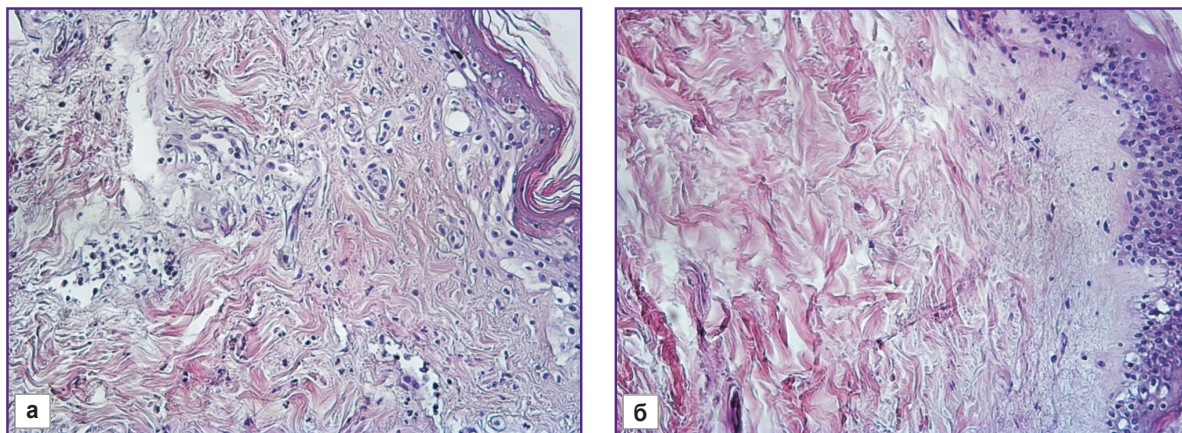


Рис. 2. Микрофото аутодермотрансплантата основной (а) и контрольной (б) группы; окраска гематоксилином и эозином; x200

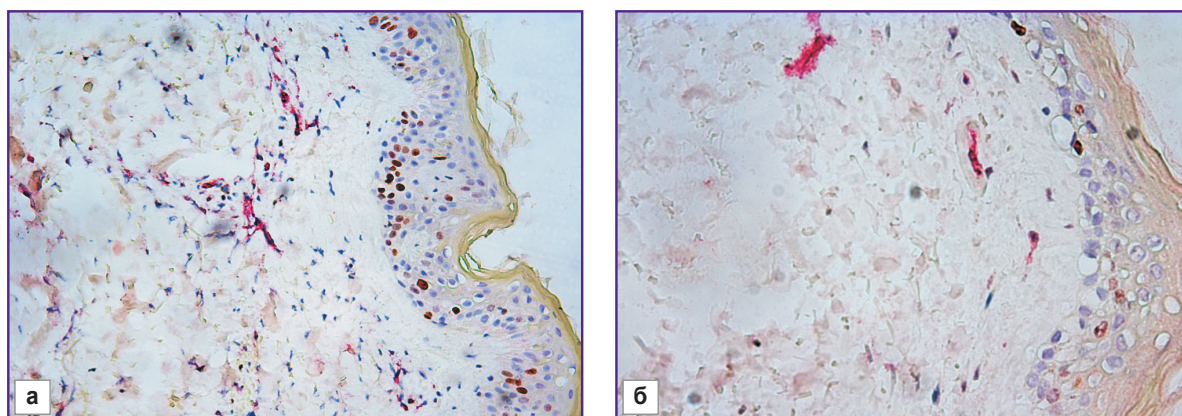


Рис. 3. Гистологическая картина аутодермотрансплантата основной (а) и контрольной (б) группы: пролиферация клеток дермы, Ki-67-позитивные клетки (коричневое окрашивание); мембраны эндотелиальных клеток (красное окрашивание); двойное последовательное иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к Ki-67 и CD31 антигенам; x200

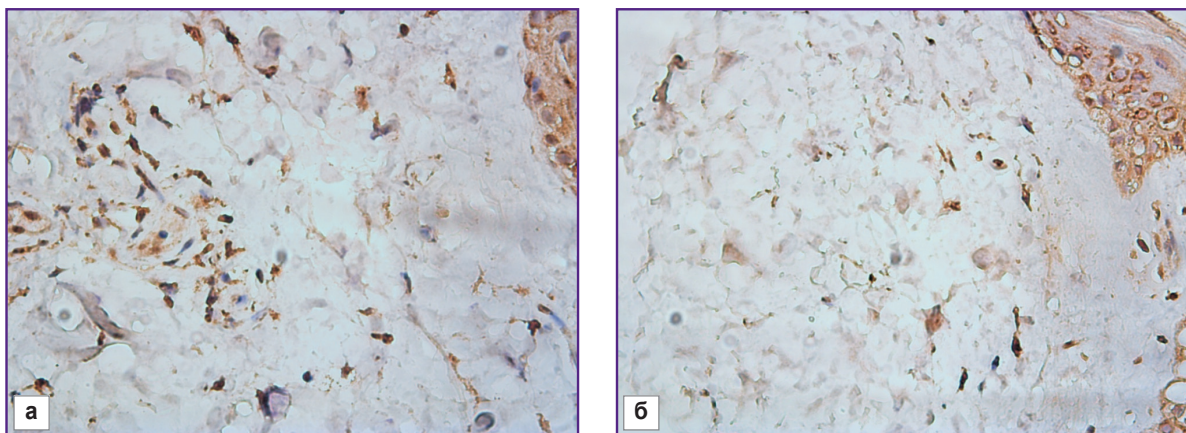


Рис. 4. Микрофото аутодермотрансплантата основной (а) и контрольной (б) группы: клетки, экспрессирующие рецепторы к васкулярному эндотелиальному фактору роста; иммуногистохимическое окрашивание с применением антител к VEGF; x400

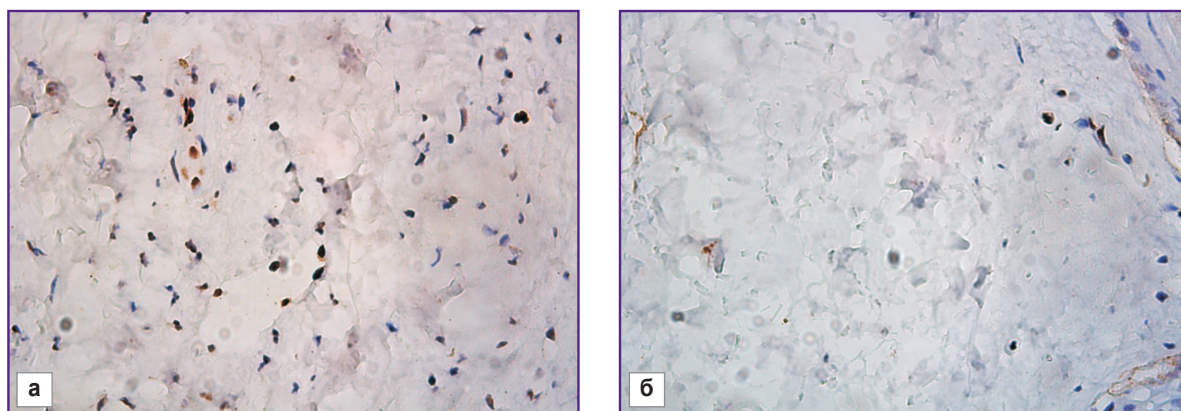


Рис. 5. Микрофото аутодермотрансплантата основной (а) и контрольной (б) группы. Иммуногистохимическое окрашивание с применением антител к Fli-1; x200

го прекондиционирования значительно менее были выражены явления стаза эритроцитов в сосудах сосочкового слоя. Кроме того, отмечено существенное уменьшение количества и распространенности кровоизлияний в сосочковом и сетчатом слоях дермы, значительное уменьшение признаков некроза и некробиоза тканей трансплантата, а также практически полное отсутствие признаков нарушений в системе микроциркуляции.

По данным иммуногистохимического исследования гистологических препаратов ИП в контрольной группе составил 17 [13; 24]%, в основной — 29 [22; 33]% ($p=0,011$).

На поперечном срезе дермы в основной группе определяется значительное количество клеток, экспрессирующих рецепторы к VEGF (рис. 4, а), в контрольной же группе их количество было минимальным (рис. 4, б).

В составе тканей аутодермотрансплантата иммуногистохимически было выявлено большое число клеток, экспрессировавших белок Fli-1, при этом

преобладающее количество эндотелиальных клеток также отмечалось в основной группе (рис. 5).

Обсуждение

Большинство современных исследователей сходятся во мнении, что ключевым компонентом морфогенеза хронических ран является гипоксия, при этом адекватным ответом организма служит усиление активности ангиогенеза для обеспечения транспорта кислорода в тканях [14, 15]. Растущий интерес к возможности активного воздействия на процессы ангиогенеза обуславливает необходимость разработки новых методов кожной пластики, в том числе на основе регуляции ангиогенеза путем гипоксического прекондиционирования, а также поиска объективной оценки эффективности новых способов хирургического вмешательства.

В настоящей работе в качестве одного из критериев, позволяющих оценить направленность воздействия на раневой процесс гипоксического прекондици-

онирования, выбрана пролиферативная активность в ткани аутодермотрансплантата. Одним из наиболее достоверных маркеров пролиферативной активности клеток кожи считается экспрессия белка Ki-67 [16]. Полученные в нашем исследовании результаты свидетельствуют о значительном повышении активности процессов пролиферации тканей аутодермотрансплантата, подвергнутого гипоксическому прекондиционированию.

Поскольку пролиферативная активность напрямую зависит от своевременного и полноценного включения трансплантата в общий системный кровоток, то закономерным является и увеличение активности роста новых сосудов, что и было зафиксировано в результате двойного последовательного иммуногистохимического окрашивания препаратов с использованием антител к Ki-67 и CD31 антигенам. В частности, оценка экспрессии эндотелиального маркера CD31 свидетельствует о более активном формировании сосудистого русла в тканях трансплантатов основной группы. Кроме того, в ткани аутодермотрансплантата после гипоксического прекондиционирования зафиксировано увеличение экспрессии VEGF, который считается основным среди всех ангиогенных факторов.

Таким образом, метод предварительного гипоксического прекондиционирования аутодермотрансплантата является перспективным способом повышения эффективности свободной кожной пластики, о чем свидетельствуют данные иммуногистохимических методов.

Заключение

Гипоксическое прекондиционирование донорской области перед свободной пластикой расщепленным кожным лоскутом обеспечивает активацию процессов ангиогенеза и репаративной регенерации в ткани аутодермотрансплантата, а также увеличивает площадь его приживления с 56 [52; 64] до 91 [84; 95]% ($p=0,007$).

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Catrina S.B., Zheng X. Disturbed hypoxic responses as a pathogenic mechanism of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; 32(1): 179–185, <https://doi.org/10.1002/dmrr.2742>.
2. Всемирная организация здравоохранения. Глобальный доклад по диабету: 2016. URL: <http://www.who.int/diabetes/global-report/ru/>. World Health Organization. *Global report on diabetes: 2016*. URL: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en>.
3. Липатов К.В., Пермяков С.В., Асатрян А.Г., Боро-

дин А.В., Гостищев В.К. Рентгеноэндоваскулярная хирургия при критической ишемии нижних конечностей с гнойно-некротическим поражением стоп. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова* 2017; 9: 4–16. Lipatov K.V., Permyakov S.V., Asatryan A.G., Borodin A.V., Gostishchev V.K. Endovascular surgery for critical ischemia of lower extremities with suppurative-necrotic lesion of the feet. *Hirurgia. Zhurnal im. N.I. Pirogova* 2017; 9: 4–16.

4. Рисман Б.В. Дифференцированная тактика закрытия послеоперационных дефектов кожи у пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы. *Новости хирургии* 2011; 19(2): 66–71. Risman B.V. Differentiated tactics of the skin postoperative defects closing in patients with pyo-necrotic complications of diabetic foot. *Novosti khirurgii* 2011; 19(2): 66–71.

5. Kotick J.D., Sandelin R.S., Klein R.D. Deep inferior epigastric perforator free flaps for use in complicated groin wound repair: a case report of severe groin scar contracture and review of pedicled and free flaps in groin wound repair. *J Hand Microsurg* 2017; 9(2): 101–106, <https://doi.org/10.1055/s-0037-1604475>.

6. Capla J.M., Ceradini D.J., Tepper O.M., Callaghan M.J., Bhatt K.A., Galiano R.D., Levine J.P., Gurtner G.C. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(3): 836–844, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000201459.91559.7f>.

7. Мавликеев М.О., Титова А.А., Гудз Д.О., Деев Р.В. Современные методы исследования ангиогенеза в клинической практике. *Наука молодых — Eruditio Juvenium* 2017; 5(1): 110–123. Mavlikeev M.O., Titova A.A., Gudzh D.O., Deev R.V. Modern methods for angiogenesis assessment in clinical practice. *Nauka molodykh — Eruditio Juvenium* 2017; 5(1): 110–123.

8. Ливанова А.А., Деев Р.В., Ризванов А.А. Современные методы исследования ангиогенеза в эксперименте. *Гены и клетки* 2015; 10(1): 115–127. Livanova A.A., Deev R.V., Rizvanov A.A. Current methods in experimental angiogenesis investigation. *Geny i kletki* 2015; 10(1): 115–127.

9. Богданов С.Б., Терман Е.А., Богданова Ю.А. Патоморфологические аспекты современных способов хирургического лечения в комбустиологии. *Медицинский вестник Юга России* 2016; 2: 33–38. Bogdanov S.V., Terman E.A., Bogdanov Y.A. Pathomorphological aspects of modern ways of surgical treatment in combustiology. *Meditinskiy vestnik Yuga Rossii* 2016; 2: 33–38.

10. Ващенко Л.Н., Дашкова И.Р., Кечеджиева Э.Э., Бабиева С.М. Возможности комбинированной аутодермопластики в лечении больных злокачественными новообразованиями кожи конечностей (клиническое наблюдение). *Современная онкология* 2015; 17(4): 45–50. Vaschenko L.N., Dashkova I.R., Kechedzhieva E.E., Babieva S.M. The ability to combine autodermoplasty in the treatment of patients with malignant tumors of the skin extremities (clinical observation). *Sovremennaya onkologiya* 2015; 17(4): 45–50.

11. Бесчастнов В.В., Измайлов С.Г., Рябков М.Г., Багрянцев М.В., Щелчкова Н.А., Перетягин П.В. Способ тренировки аутодермотрансплантата к условиям гипоксии на фоне скомпрометированной микроциркуляции. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии* 2017; 10(1): 72–78. Beschastnov V.V., Izmajlov S.G., Ryabkov M.G., Bagryancev M.V., Shchelchкова N.A., Peretyagi P.V. Training

method of split-thickness skin grafts to hypoxic conditions due to the compromised microcirculation. *Vestnik eksperimentalnoy i klinicheskoy khirurgii* 2017; 10(1): 72–78, <https://doi.org/10.18499/2070-478x-2017-10-1-72-78>.

12. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148(3): 399–408, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.

13. Диагностическая иммуногистохимия опухолей. Под ред. Глузмана Д.Ф. Киев: Морион; 2003; 193 с. *Diagnosticheskaya immunogistokhimiya opukholey* [Diagnostic immunohistochemistry of tumors]. Pod. red. Gluzmana D.F. [Gluzman D.F. (editor)]. Kiev: Morion; 2003; 193 p.

14. Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146(6): 873–887, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>.

15. Zimna A., Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 1–13, <https://doi.org/10.1155/2015/549412>.

16. Кирик О.В., Безнин Г.В., Коржевский Д.Э. Маркеры пролиферации, применяемые в гистологических исследованиях. *Морфология* 2009; 136(6): 95–100. Kirik O.V., Beznin G.V., Korzhevskiy D.E. Proliferation markers used in histological studies. *Morfologiya* 2009; 136(6): 95–100.