

Бацаленко Николай Петрович

Методика микрохирургической невротизации мышцы

14.01.17 – Хирургия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Решетов Игорь Владимирович

Официальные оппоненты:

Шельгин Юрий Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научный руководитель

Ануров Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, научно-исследовательский институт клинической хирургии, заведующий отделом экспериментальной хирургии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «13» декабря 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.001.03
доктор медицинских наук, профессор



Семиков Василий Иванович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Функциональные расстройства, полученные в результате повреждения диафрагмы таза, приводят к снижению уровня социальной адаптации и ухудшению психоэмоционального состояния пациентов. Проблема каловой инконтиненции, возникшей на фоне повреждения диафрагмы таза оказывает негативное влияние на качество жизни, помещая больных в рамки социальных ограничений.

Охватывая все слои населения, встречаясь с одинаковой частотой, как у мужчин, так и у женщин, среди лиц взрослого и детского возраста, каломазание и недержание кишечного содержимого приводит к нарушению социальной адаптации пациентов, ухудшению взаимоотношений с окружающими, исключению из активной социальной деятельности в связи с возникшими ограничениями.

В настоящее время существует множество реконструктивно-пластических операций, направленных на восстановление диафрагмы таза, но ни одна из них в полном объеме не отвечает клиническим требованиям и ожиданиям пациента, и данная проблема по сегодняшний день остается актуальной.

С началом применения микрохирургической техники при выполнении реконструктивных операций отмечается рост качества отдаленных результатов восстановления двигательной и чувствительной иннервации.

В данной работе проведена оценка эффективности прямой невротизации мышцы при выполнении реконструктивно-пластических операций, направленных на восстановление диафрагмы таза на примере создания управляемого запирающего аппарата прямой кишки.

Создание градиента нейротрофинов является перспективным направлением в стимуляции роста аксонов. В настоящее время создание градиента нейротрофинов активно применяется при повреждении периферических нервов в виде наполнения кондуитов. Наиболее часто встречаются биodeградируемые кондуиты марки NeuroGen. Актуальным остается оценка влияния создания градиента нейротрофинов при выполнении прямой невротизации мышцы. В настоящем исследовании произведена оценка влияния создания градиента нейротрофинов в толще мышцы и влияние его на аксональный рост, и скорость формирования нейромышечных синапсов при выполнении прямой невротизации мышцы

Всё вышеизложенное определяет актуальность изучения особенностей выполнения пластики диафрагмы таза на примере оценки влияния прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами на функциональность сформированного неосфинктера прямой кишки и является условием для постановки целей и задач настоящего исследования.

Цель исследования: Разработать оптимальную методику пластики диафрагмы таза путем создания неосфинктера прямой кишки и дать оценку влияния прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами на его функциональность

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель, позволяющую оценить влияние прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами на восстановление функции диафрагмы таза
2. На экспериментальной модели, изучить основные проблемы в восстановлении нервно-мышечной передачи у пациентов с повреждениями и нарушениям функции диафрагмы таза
3. На экспериментальной модели оценить эффективность разработанной методики пластики диафрагмы таза без прямой невротизации мышцы по функциональным и морфологическим критериям
4. На экспериментальной модели оценить эффективность разработанной методики пластики диафрагмы таза с применением прямой невротизации мышцы по функциональным и морфологическим критериям
5. На экспериментальной модели оценить эффективность разработанной методики пластики диафрагмы таза с применением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами по функциональным и морфологическим критериям
6. Разработать способ оценки функциональных показателей восстановленной диафрагмы таза.
7. Сравнить между собой методики пластики диафрагмы таза (пластика диафрагмы таза без прямой мышечной невротизации, пластика диафрагмы таза с применением прямой мышечной невротизации и пластика диафрагмы таза с применением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами) и выбрать оптимальную с учетом полученных функциональных и морфологических показателей.

Научная новизна работы

Разработана новая методика пластики диафрагмы таза. Впервые охарактеризовано применение прямой мышечной невротизации в комбинации с формированием градиента нейротрофинов при выполнении пластики диафрагмы таза. Разработан, запатентован и испытан в лабораторных условиях аппарат для оценки эффективности работы, сформированного неосфинктера. (заявка на патент № 2020135964).

Практическая значимость работы

По итогам выполненной работы разработана новая методика пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами, позволяющая увеличить эффективность работы сформированного неосфинктера, уменьшить число послеоперационных осложнений и ускорить сроки реабилитации пациентов. Сформулированы практические рекомендации для применения данной методики в клинической практике.

С целью оценки эффективности проводимой методики разработан и применен в лабораторных условиях аппарат, оценивающий импульсную работу сформированного неосфинктера.

Разработанный аппарат для оценки эффективности сформированного неосфинктера запатентован (заявка на патент № 2020135964).

Основные положения, выносимые на защиту

1. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки без проведения прямой мышечной невротизации по сравнению со здоровыми животными выявлено: нарушение функционального состояния сформированного неосфинктера, изменение физиологии акта дефекации с формированием компенсаторного механизма, наличие морфологических нарушений в области сформированного неосфинктера
2. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации без применения нейротрофинов по сравнению со здоровыми животными выявлено: состоятельность сформированного неосфинктера, минимальное количество морфологических изменений в области сформированного неосфинктера, формирование механизма акта дефекации близкому к нормальной физиологии.
3. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами по сравнению со здоровыми животными выявлено: полное соответствие морфофункциональных показателей контрольной группе, формирование нормальной физиологии акта дефекации, сокращение сроков формирования нейромышечных синапсов.
4. Наиболее оптимальной является методика пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами, которая позволяет добиться полной состоятельности сформированного неосфинктера в короткий срок, восстановления

нормального физиологического акта дефекации, отсутствия морфофункциональных нарушений со стороны сформированного неосфинктера и имеет преимущества перед методиками, применяемыми у животных первой и второй группы.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации были освещены на VII международном междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи (2019 год, Москва).

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского федерального государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 25.10.2019 года

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме, обобщены и проанализированы результаты клинических, морфологических, лабораторно-инструментальных исследований. Лично автором разработаны и выполнены все операции, а именно: пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки без выполнения прямой мышечной невротизации, пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации без применения нейротрофинов, пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации в комбинации с нейротрофинами. При участии автора создан аппарат, оценивающий эффективность проводимой методики. Самостоятельно проведена статистическая обработка полученных данных исследования и подготовлены материалы к публикациям.

Публикации

Результаты диссертационного исследования представлены в 3 публикациях, в том числе 3 - в рецензируемом журнале из списка, рекомендованного Высшей аттестационной комиссией.

Объем и структура работы

Материалы диссертации изложены на 114 страницах машинописного текста. Работа включает: введение, 4 главы, заключение, выводы, практические рекомендации.

Библиографический указатель содержит 112 источников литературы (42 отечественных и 70 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 20 рисунками.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует формуле и направлениям исследований, указанных в паспорте научной специальности «Хирургия» (шифр специальности 14.01.17) пункт 4.

Хирургия – область медицинской науки, изучающая заболевания и повреждения, в лечении которых важнейшее значение приобретают методы кровяного и бескровного оперативного вмешательства. Создание новой хирургической техники, разработка новых оперативных вмешательств и новых хирургических технологий, а также совершенствование методов профилактики, ранней диагностики и лечения хирургических болезней будут способствовать сохранению здоровья населения, сокращению сроков временной нетрудоспособности и восстановлению трудоспособности.

Направление исследований пункт 4 паспорта специальности «Хирургия»: экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала и дизайн исследования

Настоящее исследование одобрено Локальным комитетом по этике ГБОУ ВПО Первого МГМУ им И.М. Сеченова (протокол № 03-16 от 02.03.2016).

Эксперимент был проведен в централизованном виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Экспериментальные исследования проводились на животных: 24 самца крыс линии Wistar средним весом 350 г и возрастом 4-6 месяцев. Во время проведения эксперимента было выделено четыре группы животных:

0. Контрольная группа – здоровые животные.
1. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки без прямой невротизации мышцы
2. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с прямой невротизацией мышцы
3. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с прямой мышечной невротизацией и созданием градиента нейротрофинов

Спустя девяносто суток после проведенной операции, производилась визуальная макроскопическая оценка состояния сформированного неосфинктера. При помощи разработанного нами аппарата для выполнения сфинктероманометрии, производилась оценка функции сформированного неосфинктера путем измерения силы сжатия, частоты сокращений, а также последовательность периодов расслабления и напряжения.

Далее животных выводили из эксперимента под наркозом при помощи высоких доз раствора магния сульфата, и проводилось морфологическое исследование на предмет характера процессов заживления, степени воспалительных изменений, исследование зоны сфинктера, а также морфометрическая оценка роста аксонов и формирования нейромышечных синапсов.

Все операции были выполнены согласно заданному дизайну исследования и проведены в рамках выделенных групп животных. Все оперативные вмешательства проводились под общим наркозом препаратом «Золетил-100» (0,1мл на 1 кг тела внутривенно). Антибактериальная терапия проводилась инъекциями препарата «Байтрил» (0,1 мл в течение 5 дней внутримышечно).

1. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки без прямой невротизации мышцы.

Первым этапом, после трехкратной обработки растворами антисептиков, под общей внутрибрюшинной анестезией препаратом Золетил-100 с дорсальной стороны по срединной линии выполнен линейный разрез. Остро и тупо выделена с обеих сторон длинная мышца, отводящая хвост. Контроль гемостаза – сухо. Рана тампонируется салфетками с тёплым физраствором.

Вторым этапом, выполнено тотальное иссечение сфинктера прямой кишки, краевая резекция прямой кишки на уровне 2 сантиметра от уровня кожи. Выполнено низведение прямой кишки в физиологическое положение, кишка фиксирована временными швами-держалками.

Третьим этапом, выполнена ревизия с обеих сторон длинной мышцы, отводящей хвост. Контроль гемостаза – сухо. Выполнено двустороннее отсечение длинной мышцы, отводящей хвост от места крепления её в области хвоста. Мышца фиксирована временными швами-держалками с обеих сторон. При помощи тоннелера сформирован канал в полость малого таза. Через этот канал выполнена транспозиция длинной мышцы, отводящей хвост на швах-держалках в область низведенной в физиологическое положение, прямой кишки. Выполнено формирование неосфинктера по типу манжеты вокруг прямой кишки, предварительно два конца, низведенной мышцы, фиксированы между собой и подшиты к прямой кишке. Контроль гемостаза – сухо. Послойный шов раны.

2. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с прямой невротизацией мышцы

Первым этапом, после трехкратной обработки растворами антисептиков, под общей внутрибрюшинной анестезией препаратом Золетил-100 с дорсальной стороны по срединной линии выполнен линейный разрез. Остро и тупо выделена с обеих сторон длинная мышца, отводящая хвост. Контроль гемостаза – сухо. Рана тампонируется салфетками с тёплым физраствором.

Вторым этапом, выполнено тотальное иссечение сфинктера прямой кишки, краевая резекция прямой кишки на уровне 2 сантиметра от уровня кожи. Выполнено низведение прямой кишки в физиологическое положение, кишка фиксирована временными швами-держалками.

Третьим этапом, выполнена ревизия с обеих сторон длинной мышцы, отводящей хвост. Контроль гемостаза – сухо. Выполнено двустороннее отсечение длинной мышцы, отводящей хвост от места крепления её в области хвоста. Мышца фиксирована временными швами-держалками с обеих сторон. При помощи тоннелера сформирован канал в полость малого таза. Через этот канал выполнена транспозиция длинной мышцы, отводящей хвост на швах-держалках в область низведенной в физиологическое положение, прямой кишки. Выполнено формирование неосфинктера по типу манжеты вокруг прямой кишки,

предварительно два конца, низведенной мышцы, фиксированы между собой и подшиты к прямой кишке. Контроль гемостаза – сухо.

Четвертым этапом, при помощи дополнительных разрезов слева выделен седалищный нерв, произведена его ревизия. Выделена и на расстоянии двух сантиметров от места ответвления от седалищного нерва, отсечена ветвь промежностного нерва. Под контролем операционного микроскопа выполнено формирование культи ветви промежностного нерва. Дистальный конец нерва разделен на фасцикулы, концы, которых помещены в предварительно подготовленные каналы в толще низведенной длинной мышцы, отводящей хвост. Выполнена фиксация нерва к мышце Викрилом 10\0. С целью дополнительной фиксации и формирования более широкой площади соприкосновения вокруг неразделенной ветви промежностного нерва, сформирована мышечная манжета. Контроль гемостаза – сухо. Послойный шов раны.

3. Группа крыс, которым выполнялась пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с прямой невротизацией мышцы и созданием градиента нейротрофинов

Первым этапом, после трехкратной обработки растворами антисептиков, под общей внутрибрюшинной анестезией препаратом Золетил-100 с дорсальной стороны по срединной линии выполнен линейный разрез. Остро и тупо выделена с обеих сторон длинная мышца, отводящая хвост. Контроль гемостаза – сухо. Рана тампонируется салфетками с теплым физраствором.

Вторым этапом, выполнено тотальное иссечение сфинктера прямой кишки, краевая резекция прямой кишки на уровне 2 сантиметра от уровня кожи. Выполнено низведение прямой кишки в физиологическое положение, кишка фиксирована временными швами-держалками.

Третьим этапом, выполнена ревизия с обеих сторон длинной мышцы, отводящей хвост. Контроль гемостаза – сухо. Выполнено двустороннее отсечение длинной мышцы, отводящей хвост от места крепления её в области хвоста. Мышца фиксирована временными швами-держалками с обеих сторон. При помощи тоннелера сформирован канал в полость малого таза. Через этот канал выполнена транспозиция длинной мышцы, отводящей хвост на швах-держалках в область низведенной в физиологическое положение, прямой кишки. Выполнено формирование неосфинктера по типу манжеты вокруг прямой кишки, предварительно два конца, низведенной мышцы, фиксированы между собой и подшиты к прямой кишке. Контроль гемостаза – сухо.

Четвертым этапом, при помощи дополнительных разрезов слева выделен седалищный нерв, произведена его ревизия. Выделена и на расстоянии двух сантиметров от места ответвления от седалищного нерва, отсечена ветвь промежностного нерва. Под контролем

операционного микроскопа выполнено формирование культивации ветви промежуточного нерва. Дистальный конец нерва разделен на фасцикулы, концы, которых помещены в предварительно подготовленные каналы в толще низведенной длинной мышцы, отводящей хвост. Выполнена фиксация нерва к мышце Викрилом 10\0. С целью дополнительной фиксации и формирования более широкой площади соприкосновения вокруг неразделенной ветви промежуточного нерва, сформирована мышечная манжета. Контроль гемостаза – сухо. Послойный шов раны.

Шестым этапом, с целью стимуляции аксонального роста, а также с целью снижения рисков осложнений, в толще низведенной, длинной мышцы, отводящей хвост, выполнено формирование градиента нейротрофинов в направлении от места фиксации ветви промежуточного нерва к сформированному сфинктеру.

Для стимуляции аксонального роста непосредственно в толще мышцы, нами был применен раствор нейротрофинов. Раствор обладает уникальными физическими свойствами. При температуре ниже нуля градусов Цельсия он имеет жидкую структуру, при температуре выше нуля - имеет структуру геля. Именно структура геля обеспечивает возможность создания градиента нейротрофинов и его длительное сохранение в толще мышцы.

Раствор готовили следующим образом: стерильную навеску плуроника F-127 (Thermo Fisher) растворяли в физ. растворе в концентрации 27% при +4 °С в течении суток. После чего вносили нейротрофины NGF, NT-3, EGF, BDNF, GDNF, SDF-1a, ILGF-II (Thermo Fisher) и перемешивали еще 2 часа при +4 °С.. Градиент нейротрофинов создали путем разбавления исходного раствора в 5 и 10 раз. Затем раствор отбирали в инсулиновые шприцы и замораживали при -20 °С на срок не более 3 недель.

Непосредственно перед самым введением в толщу длинной мышцы, отводящей хвост, шприцы, содержащие нейротрофины, извлекали из заморозки. В жидком виде, раствор вводился в толщу мышцы от места фиксации ветви промежуточного нерва в направлении сформированного сфинктера по принципу градиента концентрации – от малой концентрации у места невротизации до большой концентрации у сформированного сфинктера. В процессе создания градиента нейротрофинов применялось три концентрации раствора: малая, средняя и большая. Введение в толщу мышцы осуществлялось в объеме 0,1 мл каждого вида. Под действием температуры тела раствор приобретал структуру геля, что обеспечивало ему длительность пребывания в мягких тканях. После введения выполнен туалет раны, контроль гемостаза. Послойный шов раны.

4. Здоровые животные. Использовались в качестве контрольной группы, для сравнения полученных результатов.

Животным были обеспечены стандартные условия содержания в виварии, без ограничения доступа к пище и воде, с режимом день\ночь – 12\12. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Сеченовском университете, рекомендациям местного этического комитета и национальным законам.

Материалы и методы исследования

Показателями для оценки эффективности проведенной операции являлось:

1. Макроскопические показатели
 - Площадь и состоятельность сформированного неосфинктера
2. Функциональные показатели
 - Оценка силы сжатия неосфинктера
 - Оценка частоты сокращений неосфинктера
 - Оценка импульсной активности неосфинктера
3. Морфологические показатели
 - Оценка воспалительных изменений
 - Оценка толщины длинной мышцы, отводящей хвост с обеих сторон
 - Оценка толщины слизистой прямой кишки
 - Оценка процессов синаптогенеза, роста нервов
4. Статистические показатели

Методика макроскопического и функционального исследования состояния неосфинктера

Непосредственно перед выведением экспериментальных животных, выполнялась фото фиксация изображений области сформированного неосфинктера, с дальнейшей оценкой его площади. Нами был разработан и испытан аппарат для выполнения сфинктероманометрии (СФМББ2), позволяющий в динамике оценить силу сжатия сформированного неосфинктера, оценить его частоту сокращений, а также последовательность и скорость изменения периодов напряжения и расслабления. Измерение импульсов, силы сжатия и частоты сокращений сформированного неосфинктера крыс проводилось с помощью прибора СФМББ2 по принципу помещения преобразователя разницы давлений (PDT) в область измерения сигналов. Через вентель (Pin) подается давление требуемое для создания сопротивления мышечной силе неосфинктера крысы. Давление фиксируется в требуемом диапазоне, используя визуальную оценку расположения датчика PDT и показаний прибора осциллографа DSO 112A.

Электрический сверх точный относительный датчик давления Ips PE преобразует разность давления датчика PDT, мышечной силы неосфинктера и атмосферного давления в электрические сигналы малой мощности, которые подаются на усилитель сигналов. Сигналы, подаваемые датчиком IPS PE, считываются с помощью мощного сверх точного малошумного усилителя электрических сигналов AD820 и преобразуются в пятикратном размере в электрические импульсы в диапазоне требуемых измерений от 0.01 до 0.5 вольта и подаются на осциллограф DSO 112A. Сигналы такой скважности явно заметны на дисплее осциллографа в виде графика, а так же в цифровом отображении. На основании полученных показаний в цифровом отображении оценивали максимальное сжатие и динамику выталкивания датчика.

В лабораторных условиях, под контролем глаза, выполнено введение баллонного катетера, размером 8Fr, в сформированный сфинктер крысы. После введения катетера выполнено его наполнение воздухом до появления мышечного сопротивления. В момент появления мышечного сопротивления производилась оценка силы сжатия, частоты сокращений. Далее в динамике, в процессе эвакуации катетера, производилась оценка силы сжатия и частоты сокращений, частота возникновения и их последовательность.

Методика проведения гистологических исследований. Через 90 дней после операции животных выводили из эксперимента под наркозом при помощи высоких доз раствора магния сульфата. Комплекс тканей для гистологического исследования был забран согласно групповой принадлежности экспериментальных животных. Так у крыс первой группы объектом для гистологического исследования являлся комплекс тканей, включающий в себя длинную мышцу, отводящую хвост с обеих сторон, и сформированный неосфинктер. Полученный комплекс был разделен на три части в соответствии с её анатомическим расположением: длинная мышца, отводящая хвост с левой стороны, сформированный неосфинктер и длинная мышца, отводящая хвост с правой стороны.

У крыс второй группы таким объектом являлся комплекс тканей, включающий в себя длинную мышцу, отводящую хвост с обеих сторон, фрагменты ветви промежуточного нерва слева, сформированный неосфинктер. Полученный комплекс был разделен на три части в соответствии с её анатомическим расположением: длинная мышца, отводящая хвост слева, на стороне выполненной прямой невротизации мышцы, сформированный неосфинктер и длинная мышца, отводящая хвост справа.

У крыс третьей группы таким объектом являлся комплекс тканей, включающий в себя длинную мышцу, отводящую хвост с обеих сторон, фрагменты ветви промежуточного нерва слева, сформированный неосфинктер. Полученный комплекс был разделен на три части в соответствии с её анатомическим расположением: длинная мышца, отводящая хвост с левой

стороны, на стороне выполненной прямой невротизации мышцы и создания градиента нейротрофинов, сформированный неосфинктер и длинная мышца, отводящая хвост справа.

Образцы тканей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов и пропускали через стандартный протокол проводки в гистопроцессоре. Препараты были залиты в парафиновые блоки.

Гистологические препараты окрасили гематоксилином-эозином. Для иммунофлуоресцентного исследования образцы депарафинировали и проводили демаскировку антигена в Трис-ЭДТА буфере рН 10.0 (abcam), блокировали не специфическое связывание антител 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатном солевом буфере (ФБС) с добавлением 0.05% детергента Твин-20. Препараты окрашивали первичными моноклональными мышечными антителами к β 3-тубулину (Thermo Fisher) и кроличьими поликлональными антителами к синаптоагмину (Sigma), отмывали в ФБС буфере и антиген детектировали при помощи конъюгированных вторичных козьих антител против мыши, меченными флуоресцентной меткой Alexa 488 (Thermo Fisher) и козьих антител против кролика меченными Alexa 594 (Thermo Fisher). Стекла отмывали, ядра прокрашивали DAPI (Thermo Fisher) и заключали под покровное стекло в 80% глицерин в ФБС.

Оценка полученных препаратов была произведена и описана в разное время и независимо друг от друга, двумя специалистами-патологоанатомами, без получения дополнительных сведений об отношении полученных препаратов к экспериментальным группам.

Микроскопическое исследование препаратов проводили на универсальном микроскопе LEICA DM4000 В LED с камерой LEICA DFC7000 T, с использованием компьютера с программным обеспечением LAS V4.8 software (Leica Microsystems, Switzerland).

Методика проведения морфометрических исследований. Морфометрическое исследование гистологических препаратов проводили на увеличении $\times 200$ с помощью описанного выше микроскопа с программным обеспечением. Для получения статистически достоверных результатов каждый препарат фотографировали в 10 случайно отобранных участках (размер поля зрения 623×467 мкм). На каждом изображении сформированного неосфинктера измеряли толщину слизистой оболочки толстой кишки и толщину прилежащего эпидермиса и степень воспалительной инфильтрации (оценивали по 4-х балльной шкале от 0 до 3), в мышцах измеряли суммарную площадь их пучков в процентах от площади поля зрения, а также – их минимальный и максимальный диаметры и количество нервных стволов.

Методика статистических исследований. Статистическое исследование было выполнено опытным статистиком, который не имел сведений о принадлежности изучаемых данных к определенным экспериментальным группам.

Статистически значимые различия площади неосфинктера в исследуемых группах считали однофакторным дисперсионным анализом с поправкой Тьюки. Данные представлены графиком средних значений и SEM. Значения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ экспериментальных данных функциональных показателей был проведен на GraphPad Prism версии 7.00 для MacOS (GraphPad Software, Inc.). Для оценки максимального напряжения сфинктера максимальные значения вокруг пика, характеризующего сжатие датчика, сравнивали однофакторным дисперсионным анализом с поправкой Тьюки. Результаты представлены как столбиковые графики и SD. Значения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ экспериментальных данных морфологических исследований был проведен на GraphPad Prism версии 8.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.). Межгрупповые различия были оценены однофакторным дисперсионным анализом с поправкой Тьюки (исследование толщин, степень воспалительной инфильтрации) и двухфакторным дисперсионным анализом с поправкой Сидака (исследование площади мышечной ткани, количество нервных стволиков). Результаты будут представлены в виде столбиковых графиков со средними значениями и SEM. Уровень статистической значимости p был принят за $< 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика экспериментальных животных

Эксперимент был проведен в централизованном виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Экспериментальные исследования проводились на животных: 24 самца крыс линии Wistar средним весом 350 г и возрастом 4-6 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария с режимом день/ночь 12/12, со свободным доступом к воде и пище.

Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Сеченовском университете, рекомендациям местного этического комитета и национальным законам.

Пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки без выполнения прямой мышечной невротизации. В ходе исследования, у первой экспериментальной группы животных было выполнено формирование неосфинктера путем двусторонней транспозиции в положение низведенной толстой кишки длинной мышцы, отводящей хвост, концы которой были фиксированы между собой и кишкой в виде манжеты. Установлено, что полученные результаты у первой группы экспериментальных животных не соответствуют клиническим требованиям и стандартам, что получило макроскопическое и морфологическое подтверждение.

Во время проведения макроскопических исследований было установлено, что у животных первой экспериментальной группы обнаружена не сомкнутость сфинктера, зачастую его зияние, наличие хронического воспаления в области сформированного неосфинктера, неоформленность стула.

При помощи аппарата СФМББ2 нами было установлено, что у крыс первой группы максимальное напряжение неосфинктера составило $0,02 \pm 0,01$ В. У группы контроля максимальное значение напряжения неосфинктера составило $0,066 \pm 0,005$ В. Достоверное различие между контрольной группой и первой группой составило $p=0,0002$. Было установлено, что у первой экспериментальной группы животных нарушена нормальная физиология акта дефекации. В то время, как акт дефекации у контрольной группы животных происходит за счет чередования периодов расслабления и напряжения мышц сфинктера, у крыс первой группы дефекация происходит исключительно за счет напряжения мышц неосфинктера, с тенденцией к росту и отсутствием периодов расслабления.

В ходе выполнения морфологического исследования у первой экспериментальной группы животных были выявлены признаки хронического воспаления в виде воспалительной инфильтрации, участков эрозий и язв, незрелости эпидермиса и слизистой толстой кишки, что, в свою очередь, может быть следствием нарушения акта дефекации, нарушения функции сфинктера и, как следствие, постоянного раздражения каловыми массами.

Результат, полученный у первой экспериментальной группы животных, обусловлен несколькими моментами. В виду отсутствия иннервации, длительного периода естественного «переобучения», быстротекущие процессы дистрофии и снижения массы, сформированный неосфинктер, не выполняла свою функцию, должным образом, что послужило причиной формирования компенсаторного механизма дефекации, несостоятельности сфинктера, его зияния и формирования зон хронического воспаления.

Пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации без создания градиентов нейротрофинов. В ходе исследования, у второй экспериментальной группы животных было выполнено формирование неосфинктера путем двусторонней транспозиции в положение низведенной толстой кишки длинной мышцы, отводящей хвост, концы которой были фиксированы между собой и кишкой в виде манжеты, после чего была выполнена прямая мышечная невротизация выделенной ветвью промежностного нерва. Достоверно установлено, что полученные результаты у второй экспериментальной группы животных частично соответствуют клиническим требованиям и стандартам, что получило макроскопическое и морфологическое подтверждение.

Во время макроскопических исследований было установлено, что площадь сформированного неосфинктера у второй экспериментальной группы животных была значительно меньшего размера, чем у первой группы. Несостоятельность сформированного неосфинктера в виде зияния ануса была выявлена в десяти процентах случаев. Стул был сформирован полностью, проблемы каломазания не наблюдалось.

При помощи аппарата СФМББ2 было установлено, что у второй экспериментальной группы животных, которым выполнялось формирование неосфинктера прямой кишки в комбинации с прямой мышечной невротизацией без нейротрофинов, через девяносто суток от момента проведенной операции максимальное значение силы сокращения сформированного неосфинктера составило $0,026 \pm 0,0057$ В. Между контрольной и второй группой наблюдалось достоверное различие ($p=0,0006$).

При помощи аппарата СФММБ2 было установлено, что у второй экспериментальной группы животных акт дефекации по своим показателям был близок к норме. Во время проведения функциональной оценки в динамике при помощи аппарата СФММБ2 было установлено, что процесс эвакуации кишечного содержимого сопровождается регулярными периодами напряжения и расслабления сформированного неосфинктера с тенденцией к его полному расслаблению. Признаками отличия от группы контроля явились более длительные по времени и большие по силе сжатия периоды напряжения неосфинктера и менее продолжительные периоды его расслабления. Также одним из достоверных признаков отличия

явился более продолжительный по времени процесс полной эвакуации кишечного содержимого.

При проведении морфологического исследования у второй экспериментальной группы животных было установлено, что степень воспалительных изменений была значительно ниже, чем у первой группы, участки с эрозиями и язвами отсутствовали, толщина слизистой оболочки была больше, а зрелость эпидермиса более выражена. Со стороны левой мышцы, где выполнялась прямая мышечная невротизация, было выявлено наличие нервных стволиков, расположенных по периферии мышцы, а также незначительное количество невром.

Результаты, которые были получены у второй экспериментальной группы животных, обусловлены несколькими моментами. Наличие иннервации исключило процессы дистрофических изменений со стороны мышцы, что обеспечило стойкий функциональный результат. Иннервируемый ветвями промежностного нерва, сформированный неосфинктер, воспринимается организмом, как часть системы запирающего аппарата, что нашло своё отражение в виде показателей акта дефекации близкой к норме. Но ограничение по времени естественного роста нерва, привело к частично негативным результатам, в виде минимальных воспалительных изменений.

Пластика диафрагмы таза путем формирования неосфинктера прямой кишки с выполнением прямой мышечной невротизации и созданием градиента нейротрофинов. В ходе исследования, у третьей экспериментальной группы животных было выполнено формирование неосфинктера путем двусторонней транспозиции в положение низведенной толстой кишки длинной мышцы, отводящей хвост, концы которой были фиксированы между собой и кишкой в виде манжеты, после чего была выполнена прямая мышечная невротизация выделенной ветвью промежностного нерва. Вторым этапом, в толще мягких тканей низведенной мышцы слева был создан градиент нейротрофинов в направлении от места фиксации нерва к мышце до сформированного неосфинктера. При создании градиента нейротрофинов использовалось три типа концентрации раствора: малая, средняя и большая, по 0,1 мл каждого типа. Достоверно установлено, что полученные результаты у третьей группы экспериментальных животных полностью соответствуют клиническим требованиям и стандартам, что получило макроскопическое и морфологическое подтверждение.

Во время макроскопических исследований было установлено, что площадь сформированного неосфинктера у третьей экспериментальной группы животных, его сомкнутость соответствует показателям контрольной группы. Несостоятельности сформированного неосфинктера в виде зияния ануса и каломазания выявлено не было. Полученные данные говорят в пользу того, что сформированный неосфинктер состоятелен, способен удерживать каловые массы и по своим показателям соответствует норме.

При помощи аппарата СФМББ2 было установлено, что у третьей экспериментальной группы животных, которым выполнялось формирование неосфинктера прямой кишки в комбинации с прямой мышечной невротизацией и созданием градиента нейротрофинов, через девяносто суток от момента проведенной операции максимальное значение силы сокращения сформированного неосфинктера составило $0,063 \pm 0,0057$ В.

При этом контрольная и третья группа достоверно не отличались ($p=0,1747$). Третья группа также достоверно отличалась от второй группы ($p=0,0076$) и первой группы ($p=0,0019$). При помощи аппарата СФММБ2 было установлено, что у третьей экспериментальной группы животных акт дефекации по своим показателям соответствовал норме. Во время проведения функциональной оценки в динамике при помощи аппарата СФММБ2 было установлено, что процесс эвакуации кишечного содержимого сопровождается регулярными периодами напряжения и расслабления сформированного неосфинктера с тенденцией к его полному расслаблению. По своей продолжительности процесс эвакуации кишечного содержимого полностью соответствовал группе контроля.

При проведении морфологического исследования у третьей экспериментальной группы животных было установлено, что признаки воспалительных изменений отсутствовали, толщина слизистой оболочки была максимальной, а зрелость эпидермиса была выражена в наибольшей степени.

Результатом применения градиента нейротрофинов явилось ускорение процессов формирования нервных стволов и их прорастания в толщу мышцы. При морфологическом исследовании длинной мышцы, отводящей хвост, после её транспозиции в положение прямой кишки и формирования неосфинктера, были установлены незначительные отличия между правой и левой мышцами. Со стороны левой мышцы, где выполнялась прямая мышечная невротизация, было выявлено наличие крупных нервных стволиков, гипертрофированных мышечных волокон. А по результатам проведения реакции иммунофлуоресценции, были получены данные, доказывающие наличие клеток, которые содержат $\beta 3$ -тубулин, способствующие экспрессии синаптоагмина вокруг нервных стволиков

Результат, полученный у третьей экспериментальной группы животных, идентичен контрольной группе. Это может быть обусловлено несколькими моментами. Наличие иннервации исключило процессы дистрофических изменений со стороны мышцы, что обеспечило стойкий функциональный результат. Иннервируемый ветвями промежуточного нерва, сформированный неосфинктер, воспринимается организмом, как часть системы запирающего аппарата, что нашло своё отражение в виде показателей акта дефекации близкой к норме, а созданный в толще мышцы градиент нейротрофинов стимулирует рост нерва, способствуя тем самым более интенсивной иннервации мышцы и формированию

нейромышечных синапсов. Этим объясняется наличие показателей нормальной физиологии акта дефекации, отсутствие воспалительных изменений, состоятельность неосфинктера.

Выбором нерва-невротизатора для выполнения прямой невротизации длинной мышцы, отводящей хвост, явилось то, что мышцы запирающего аппарата прямой кишки иннервируются конечными ветвями промежностного нерва. Общий ствол промежностного нерва, который является одной из ветвей седалищного нерва, несет в себе двигательные и чувствительные аксоны концевых ветвей и в случае их повреждения или утраты может компенсировать их работу. Таким образом, можно расценивать, что выполнение прямой мышечной невротизации сформированного неосфинктера, ветвями промежностного нерва, является ничем иным, как восстановление нормальной анатомии. Потому что за счет невротизации ветвями промежностного нерва, сформированный неосфинктер, воспринимается организмом, как часть системы запирающего аппарата, и время для естественного переобучения мышцы затрачено не будет. Именно с этим связаны состоятельность неосфинктера, частота и сила сокращений, результаты морфологических исследований у второй и третьей экспериментальных групп животных.

Статистически важным отличием результатов исследования у экспериментальных животных второй и третьей группы являлось применение у крыс третьей группы созданного градиента нейротрофинов. Это может быть связано с природой происхождения нейротрофинов и запускаемых процессов во время регенерации нервов.

Существует три основных семейства нейротрофических факторов — классические нейротрофины, нейротрофины глиальных клеток и семейство инсулиноподобных факторов роста. Классические нейротрофины включают фактор роста нервов, нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и нейротрофины 3–7 (NT3, 4, 5, 6, 7) [27]. Фактор роста нервов NGF продуцируется клетками Меркеля–Ранвье, меланоцитами, гладкомышечными клетками, клетками кровеносных сосудов и др. NGF (nerve growth factor) взаимодействует с высокоаффинным рецептором p140 нейротрофной тирозинкиназы (TrkA), который экспрессируется симпатическими нейронами и нейронами малого диаметра заднего корешка. При повреждении нерва шванновские клетки и фибробласты синтезируют и экспрессируют NGF. NGF усиливает прорастание аксонов и рост нейронов как *in vitro*, так и *in vivo*, участвует в реализации термо-, механо- и болевой чувствительности. BDNF стимулирует рост мононейронов и обеспечивает их выживаемость при аксонотомии. NT3 в основном экспрессируется мышечными волокнами, клетками Меркеля–Ранвье, нервно-сухожильным веретеном (сухожильный орган Гольджи) и специфически связывается с рецептором нейротрофной тирозинкиназы C (TrkC). NT3 стимулируют регенерацию аксонов и образование миелиновой оболочки [20]. Глиальные клетки синтезируют такие факторы, как глиальный

нейротрофический фактор (GDNF; способствует образованию нервно-мышечных связей, индуцирует ремоделирование иннервации мышц, связывается с собственным рецептором и с рецептором нейротрофной тирозинкиназы c-Ret) [21] и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF; стимулирует симпатические и моторные нейроны). Инсулиноподобные факторы роста I и II близки к инсулину по структуре и функции, связываются с рецептором IGF1, который экспрессируется во всей нервной системе, стимулируя пролиферацию всех типов клеток. Также цитокины семейства интерлейкина 6 (IL6) могут стимулировать рост нейронов [22].

Именно этим объясняются полученные результаты у крыс второй и третьей экспериментальных групп. А именно: состоятельность неосфинктера, отсутствие воспалительных изменений, восстановление нормальной физиологии акта дефекации. Отличие результатов второй экспериментальной группы животных от группы контроля связана с тем, с тем, что у крыс второй группы выполнялась невротизация без создания градиента нейротрофинов, и с тем, что у них не проводилась дополнительная стимуляция формирования нейромышечных синапсов.

Благодаря созданному градиенту нейротрофинов у крыс третьей группы отмечается картина полного восстановления сформированного неосфинктера, полное восстановление его функциональности, формирование нормальной физиологии акта дефекации в более короткий срок, по сравнению с экспериментальными животными первой и второй группы. Это может быть обусловлено тем, что введенный градиент нейротрофинов имеет гелеобразную структуру в толще мышцы, и тем самым способствует длительной стимуляции роста нерва, и формирования нейромышечных синапсов до полного его рассасывания. На момент окончания исследования, то есть через девяносто суток от момента проведенной операции, в тканях следов введенных нейротрофинов обнаружено не было.

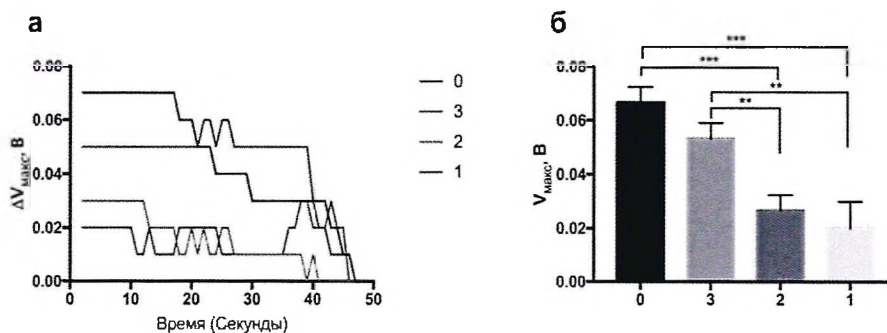


Рисунок 1 - (а) Динамика расслабления сфинктера. (б) Статистический анализ максимального сжатия сфинктера в сравнении с контрольной группой. Однофакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки, Группа 0 – контрольная без проведения операции, группа 1 – операция без невротизации, группа 2 – операция с проведением невротизации, группа 3 – операция с проведением невротизации и созданием градиента нейротрофинов. (б) графики отображают среднее значение \pm SD, * - $p < 0.5$, ** - $p < 0.1$, *** - $p < 0.01$, **** - $p < 0.001$

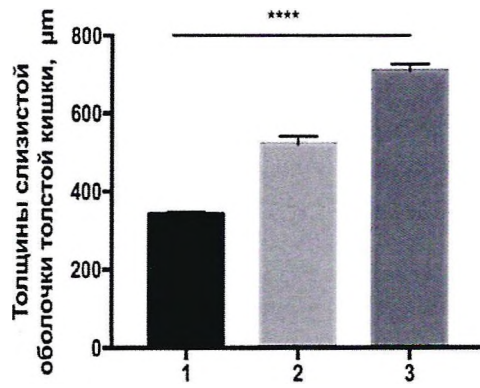


Рисунок 2 - График разницы толщины слизистой оболочки толстой кишки

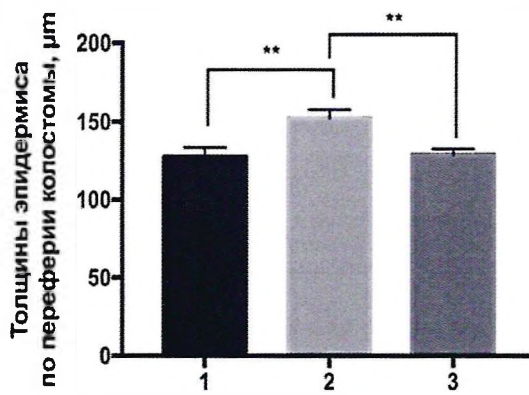


Рисунок 3 - График разницы толщины эпидермиса по периферии неосфинктера

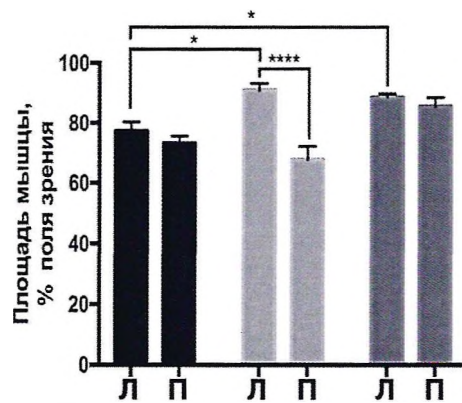


Рисунок 4 - График разницы толщины длинной мышцы, отводящей хвост после транспозиции (группа 1-3)

ВЫВОДЫ

1. На разработанной экспериментальной модели удалось установить причины осложнений и возникновения неудовлетворительных результатов методик, направленных на восстановление запирающей функции прямой кишки.
2. Главной проблемой восстановления запирающей функции прямой кишки в случае ее повреждения или недоразвития является отсутствие прямого нервно-мышечного сигнала к группе мышц, формирующих запирающий аппарат.
3. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера без проведения прямой мышечной невротизации по сравнению со здоровыми животными выявлено: нарушение функционального состояния сформированного неосфинктера, нарушение нормальной физиологии акта дефекации, с формированием компенсаторного механизма, наличие морфологических нарушений в области сформированного неосфинктера.
4. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера с выполнением прямой мышечной невротизации без применения нейротрофинов по сравнению со здоровыми животными выявлено: состоятельность сформированного неосфинктера, минимальное количество морфологических изменений в области сформированного неосфинктера, формирование механизма акта дефекации близкому к нормальной физиологии.
5. После проведения пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера в комбинации с прямой мышечной невротизацией градиентом нейротрофинов по сравнению со здоровыми животными выявлено: полное соответствие морфофункциональных показателей контрольной группе, формирование нормальной физиологии акта дефекации, сокращение сроков формирования нейромышечных синапсов и получения положительных результатов в 100 %.
6. Для оценки функциональных результатов запирающего аппарата прямой кишки был разработан аппарат СФМББ2, позволяющий в режиме реального времени проанализировать работу сформированного неосфинктера, оценить его силу сжатия, частоту сокращений, а также последовательность и скорость изменения периодов напряжения и расслабления.
7. Наиболее оптимальной является методика пластики диафрагмы таза путем формирования неосфинктера в комбинации с прямой мышечной невротизацией и градиентом нейротрофинов, которая позволяет добиться полной функциональной состоятельности в короткий срок, восстановления нормальной физиологии акта дефекации, отсутствие морфофункциональных нарушений со стороны

сформированного неосфинктера и имеет преимущества перед методиками, применяемыми у животных первой и второй группы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам, которым выполняется пластика диафрагмы таза, в виде формирования неосфинктера, рекомендовано выполнение прямой мышечной невротизации в комбинации с созданием градиента нейротрофинов.
2. В случае невозможности выполнения у пациентов пластики диафрагмы таза, в виде формирования неосфинктера с применением прямой мышечной невротизации в комбинации с градиентом нейротрофинов, рекомендовано выполнение прямой мышечной невротизации без применения нейротрофинов.
3. Пациентам с аноректальными пороками развития и пациентам, которые перенесли экстирпацию прямой кишки с удалением запирающего аппарата, не рекомендуется формирование неосфинктера без выполнения прямой мышечной невротизации и создания градиента нейротрофинов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бацаленко Н.П.** Перспективные нервные кондуиты для стимуляции регенерации поврежденных периферических нервов. / Мирошникова П.К., Люндуп А.В., Крашенинников М.Е., Занг Ю., Фельдман Н.Б., Береговых В.В. // **Вестник Российской академии медицинских наук**. 2018. — Т.73. — №6. — С. 388–400.[Scopus].

2. **Бацаленко Н.П.** Прямая невротизация анального неосфинктера как способ улучшения его функциональной морфологии. / Решетов И.В. // **Хирургическая Практика** 2019, №1(37) – 38-44.

3. **Бацаленко Н.П.** Прямая невротизация анального неосфинктера как способ улучшения его функции. / Решетов И.В. // **Московский хирургический журнал** 2019, 1(65) – 50-55.