

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Денисова Анна Валентиновна

**Экспериментальная модель пластики дефекта трахеи
с помощью клеточно-инженерной конструкции**

14.01.17 - Хирургия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Дыдыкин Сергей Сергеевич

Москва - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР РАЗВИТИЯ РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ	12
1.1. Общие положения	12
1.2. Эволюция хирургии нижних дыхательных путей	13
1.3. Достижения регенеративной медицины в хирургии дефектов нижних дыхательных путей	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Дизайн исследования	36
2.2. Этические и правовые аспекты эксперимента	38
2.3. Характеристика лабораторных животных	39
2.4. Условия пребывания и особенности содержания животных на этапах эксперимента	41
2.5. Анестезиологическое обеспечение	43
2.6. Методологические подходы к воспроизведению эксперимента ..	44
2.7. Методы исследования	45
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ НА РЕПАРАЦИЮ СЛИЗИСТОЙ И ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ	46
3.1. Ход оперативного вмешательства в группе I.....	46
3.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе I....	52
3.3. Гистологическое исследование в группе I	58

ГЛАВА 4. МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕФЕКТА СЛИЗИСТО-ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ	61
4.1. Разработка оптимального способа нанесения дефекта слизисто-подслизистой трахеи кроликов	61
4.2. Нанесение дефекта трахеи менее 50% ее окружности	63
4.2.1. Ход оперативного вмешательства в группе II	63
4.2.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе II	67
4.2.3. Гистологическое исследование в группе II	70
4.3. Нанесение дефекта трахеи 50% и более ее окружности	72
4.3.1. Ход оперативного вмешательства в группе III	72
4.3.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе III	73
4.3.3. Гистологическое исследование в группе III	77
4.4. Нанесение критического дефекта на предварительно реваскуляризованную трахею (двухэтапный подход)	79
4.4.1. Ход оперативного вмешательства у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода.....	80
4.4.2. Клиническое течение послеоперационного периода у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода	80
4.4.3. Гистологическое исследование у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода	84
ГЛАВА 5. РЕКОНСТРУКЦИЯ КРИТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА СЛИЗИСТО-ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ	86
5.1. Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной шовным материалом	86
5.1.1. Ход оперативного вмешательства в группе IV	86
5.1.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе IV	89

5.1.3. Гистологическое исследование в группе IV	93
5.2. Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной стентом	96
5.2.1. Ход оперативного вмешательства в группе V	96
5.2.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе V	98
5.2.3. Гистологическое исследование в группе V	103
5.3. Статистический анализ в экспериментальных группах	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	126
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Вопреки стремительному развитию современной медицины, обширные дефекты нижних дыхательных путей долгое время продолжают оставаться нерешенной задачей хирургии. Распознать и вылечить на ранней стадии заболевания, ведущие к формированию стриктур трахеобронхиального дерева, не всегда представляется возможным. Зачастую диагностировать патологию удастся лишь тогда, когда консервативные и малоинвазивные методы лечения уже бессильны, и тактика сводится к поискам радикальных методов замещения дефектов.

Этиологические факторы обширных поражений воздухоносных путей, требующих реконструктивного вмешательства, достаточно variabelны. Причиной могут быть инфекционные заболевания, травмы, ожоги, новообразования собственно дыхательных путей или соседних органов, системные патологические процессы, осложнения хирургических вмешательств, трахеостомия и длительная интубация, ятрогенные повреждения (Юнина А.И., 1972; Feist J.H., 1975; Фоломеев В.Н., Сотников В.Н., 2001; Epstein S.K., 2005; Паршин В.Д., 2006, 2007; Голуб И.Е. и др., 2009; Сангинов и др., 2010; Герасимов С.С. и др., 2014).

Проблема закрытия дефектов нижних дыхательных путей, в частности трахеи, у таких пациентов нередко сводится к радикальному лечению (Петровский Б.В., 1978; Этерия Г.П., 1986; Самохин А.Я., 1992; Паршин В.Д., 2000; Татур А.А., 2010; Den Hondt M. et al., 2017). Хирургические вмешательства, основанные на применении синтетических протезов, биопротезов, аллотрансплантатов, аутоотрансплантатов, были экспериментально оценены в многочисленных исследованиях. И все же ни одна из этих работ не зарекомендовала себя в качестве универсальной техники замещения протяженных дефектов трахеобронхиального дерева (Martinod E. et al., 2013; Ch'ng S. et al., 2014).

Надежды, возлагаемые на трансплантологию, не оправдались в желаемом объеме. Пересадка донорских органов ограничена не только медицинскими показаниями, связанными с несовместимостью в системе донор-реципиент, необходимостью пожизненной иммуносупрессивной терапии, нехваткой кадаверного материала. Практика показывает, что противодействующим фактором становятся религиозные убеждения. Не менее серьезными причинами, замедляющими развитие трансплантологии в России, являются сложности правового регулирования (Серебрякова А.А. и др., 2011; Сергеев и др., 2013) и неготовность населения к посмертному донорству (Левада-Центр, 2014; Готье С.В., 2016).

Все эти трудности создают весомые предпосылки к открытию ранее неизвестных способов замещения повреждений нижних дыхательных путей. Внедрение новых разработок могло бы позволить достичь наибольшей эффективности в пластике дефектов. Сегодня общепризнанным хирургическим техникам достойную конкуренцию вполне обоснованно могут составить передовые методики лечения, базирующиеся на достижениях регенеративной медицины. Оптимистичные результаты испытаний дают абсолютную уверенность в необходимости развития экспериментальных исследований (Fishman J.M. et al., 2014; Zhang H. et al., 2015). Получают все большую популярность в лабораторных и клинических условиях клеточно-инженерные конструкции (КИК). Многообещающие достижения инновационных методов пластики нижних дыхательных путей создают устойчивый плацдарм для дальнейших работ, нацеленных на долгосрочный результат (Orlando G. et al., 2013; Abouarab A.A. et al., 2017).

Разработки эффективного метода реконструкции протяженных дефектов трахеи направлены на повышение радикальности и практической доступности лечения. На сегодняшний день поиски универсального способа пластики обширных повреждений трахеобронхиального дерева являются насущными для всего мирового медицинского сообщества.

Цель работы

Создание нового способа пластики протяженного дефекта слизистой-подслизистой трахеи в эксперименте.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность реваскуляризации трахеи фасциальным лоскутом на питающей ножке в репаративных процессах слизистой-подслизистой трахеи кроликов.
2. Разработать оптимальный способ повреждения слизистой-подслизистой трахеи в эксперименте.
3. Определить размеры критического дефекта трахеи кролика, при которых процесс самозаживления невозможен.
4. Проанализировать перспективность имплантируемой в зону обширного повреждения трахеи клеточно-инженерной конструкции для замещения дефекта.
5. Провести сравнительный анализ различных способов фиксации клеточно-инженерной конструкции в просвете трахеи.
6. Разработать в лабораторных условиях новую методику реконструкции протяженного дефекта слизистой-подслизистой трахеи.

Научная новизна исследования

Впервые проведено сравнение экспериментальных методик создания протяженного дефекта слизистой-подслизистой трахеи и предложен наиболее адекватный способ повреждения.

Впервые определены критические размеры дефекта слизистой и подслизистой трахеи, при которых невозможно ее самовосстановление.

Разработан новый метод пластики протяженного дефекта стенки трахеи при помощи клеточно-инженерной конструкции, фиксированной в просвете органа стентом (Патент РФ № 2017110581).

Практическая значимость

Предложенный в эксперименте способ пластики дефекта слизисто-подслизистой трахеи при помощи клеточно-инженерной конструкции, фиксированной стентом, может служить основой для практического применения метода в клинической практике. Возможно продолжение экспериментального исследования по усовершенствованию методики в направлении замещения циркулярных и мультифокальных дефектов нижних дыхательных путей. Модель пластики трахеи при помощи КИК и стента перспективна в качестве универсального эквивалента инвазивным способам лечения протяженных дефектов нижних дыхательных путей.

Внедрение в практику

Материалы диссертации внедрены в учебный процесс кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Топографическая анатомия и оперативная хирургия», читаемой студентам Международной школы «Медицина будущего».

Основные положения, выносимые на защиту

1. В экспериментальном исследовании установлены размеры критического дефекта стенки трахеи кролика, при которых самозаживление невозможно. Повреждение слизисто-подслизистого слоя более 50% окружности трахеи требует радикального подхода и поэтому может использоваться в качестве модели дефекта для апробации нового способа реконструкции.
2. В эксперименте апробирован новый способ пластики протяженного дефекта слизисто-подслизистой трахеи, который основан на прочной фиксации клеточно-инженерной конструкции в зоне поражения при помощи стента. Предложенный метод реконструкции может стать

эффективной альтернативой инвазивному лечению протяженных эпителиальных дефектов нижних дыхательных путей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.17 – Хирургия, а именно ее четвертому пункту: «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов экспериментального исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений в ходе комплексного моделирования критического дефекта стенки трахеи с последующей его реконструкцией КИК, фиксированной в просвете дыхательной трубки шовным материалом и стентом.

Выдвинутые в научно-квалификационной работе умозаключения подтверждаются доказательной базой, представленной для наглядности схемами, графиками, диаграммами, фотографиями. Достоверность, полученных в эксперименте результатов, подтверждается статистическими расчетами.

Результаты исследовательской деятельности были представлены на следующих научных конференциях, конгрессах, симпозиумах:

1. Научные конференции кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) 2017-2020 гг. (Москва, Россия);
2. 9th ISCAA World Congress from 9th to 12th September 2017. (Innsbruck, Tyrol, Austria);

3. III Российский национальный конгресс "Трансплантация и донорство органов» 2-4 октября 2017 г. (Москва, Россия);
4. XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) from 5th to 7th July 2018. (Prague, Czech);
5. 10th ISCAA World Congress from 13th to 16th September 2018. (Moscow, Russia);
6. International Scientific Conference «Actual issues of morphology» dedicated to the 75th anniversary of the founding of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova from 30th to 31st October 2020. (Chisinau, Moldova).
7. International online-conference «From experience to project» dedicated to the independence Day of the Republic of Kazakhstan from 12th to 13th December 2020. (Almaty, Kazakhstan).

Апробация проведена на научной конференции кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 22 июня 2020 года.

Личный вклад автора в исследование

Диссертантом сформулированы основные положения, разработан дизайн диссертационной работы, осуществлен поиск опубликованных в научном мире материалов по вопросам реконструктивной хирургии нижних дыхательных путей, выполнен анализ последних тенденций в этой области. Диссертантом проведены все типы хирургических вмешательств, описанных в работе, и выполнен скрупулезный анализ полученных клинических, лабораторных, гистологических данных, изложены выводы, даны практические рекомендации.

Публикации

По теме диссертационной работы представлено десять публикаций, одна из них в журнале уровня Q1, три статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Получен Патент РФ № 2017110581.

Объем и структура диссертации

Диссертация представлена на 153 страницах. Работа содержит введение, пять глав, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, который содержит 211 источников, из которых отечественных - 71, зарубежных - 140 публикаций. В работе изображены 7 таблиц и 72 рисунка.

ГЛАВА 1.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

РАЗВИТИЯ РЕКОНСТРУКТИВНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

1.1. Общие положения

Перечень нозологических форм, провоцирующих нарушение проходимости нижних дыхательных путей, достаточно многогранен. На сегодняшний день диагностика этих заболеваний не всегда бывает своевременной, а шансы на благоприятный прогноз обратно пропорциональны степени прогрессирования стеноза трахеи и бронхов. Особое внимание в клинической практике заслуживают протяженные дефекты трахеи, которые являются следствием стриктур. В основе рубцовых стенозов трахеи лежит замещение нормальных структур ее стенки рубцовой тканью. Разрастание грубой соединительной ткани способствует сужению просвета трахеи, поражению хрящевых колец и, как следствие, ведет к повреждению трубчатого каркаса (Паршин В.Д., Порханов В.А., 2010).

Врожденные рубцовые стенозы делят на первичные и вторичные. К первичным относят сужения просвета трахеи, которые обусловлены полным или частичным отсутствием перепончатой части и деформацией хрящевых колец. Формирование вторичных стенозов происходит в результате внешнего давления на трахею при порочном развитии сосудов (двойная дуга аорты), компрессии врожденными кистами средостения и другими аномалиями развития (Hewitt R.J. et al., 2016). Приобретенные рубцовые стенозы трахеи имеют большую частоту распространения. Они так же, как и врожденные, бывают первичными при локализации патологического очага непосредственно в трахее и вторичными на фоне поражения других органов и систем.

Стенозы трахеи могут быть острыми и хроническими. Состояния, возникшие остро, требуют немедленного разрешения и поэтому в первую очередь являются прерогативой неотложной медицины. Сравнительно хронические стенозы позиционируются важнейшей проблемой плановой хирургии. Постепенное сужение просвета трахеи формируется вследствие воспалительных процессов бактериального и вирусного генеза, системных заболеваний, осложнений, связанных с оперативными вмешательствами на щитовидной железе, трахее, крупных сосудах шеи. Немалая роль в развитии рубцовых стенозов трахеи отводится как новообразованиям самой трахеи, так и опухолям соседних органов, оказывающим компрессионное воздействие (Зенгер В.Г. и др., 2007).

Необходимость пластики дефекта трахеи сопряжена с серьезным фактором риска, которым является долгое пребывание эндотрахеальной трубки в дыхательных путях для обеспечения искусственной вентиляции легких (ИВЛ) при отсутствии спонтанного дыхания (Паршин и др., 2002; Kim S.S. et al., 2017; Ezemba N., 2019). Формирование стеноза трахеи у пациентов, длительно находившихся на ИВЛ, по разным данным происходит в диапазоне от 0,1 до 20% (Паршин, 2003; Parla V. et al., 2003; Тришкин Д.В. и др., 2007).

1.2. Эволюция хирургии нижних дыхательных путей

Первые оперативные вмешательства на нижних дыхательных путях берут свое начало до нашей эры в древних цивилизациях. Старейшей хирургической техникой по праву признана трахеостомия. Хронология этой операции ведет свой отсчет настолько давно, что даже при самом скрупулезном подходе невозможно установить, когда и кем были выполнены самые ранние трахеостомии. Первым письменным источником, в котором описана оперативная методика, представляющая собой подобие трахеостомии, стала индийская книга «Ригведа». Если полагаться на этот

древнейший памятник литературы, то трахеостомии выполнялись уже в бронзовом веке (Colice G.L., 1994). Спустя пять веков древнеегипетский мудрец Имхотеп, позднее почитаемый как бог медицины, на папирусе осветил прототип современной трахеостомии (Musso C.G., 2005). Древнегреческий целитель и основоположник медицины Гиппократ также не оставил без внимания данный вопрос, описав интубацию трахеи. Выдающийся полководец Александр Македонский с помощью меча вскрыл просвет трахеи в связи с развитием острого стеноза дыхательных путей у солдата, подавившегося костью (Szmuk P. et al., 2008).

В Средние века исследований в области дыхательных путей не зарегистрировано. Более того, в редких упоминаниях, датированных XIII веком, прослеживается пагубное восприятие трахеостомии, что в свою очередь объясняет отказ от её выполнения вплоть до XIX столетия. Негативные последствия операции, ограничившие ее применение, можно аргументировать неудовлетворительными знаниями анатомии (Watkinson J.J. et al., 2000).

Дальнейшее развитие трахеостомия получила в эпоху Ренессанса и связана с именем такого ученого как Везалий (Gillespie N.A., 1948). Пожалуй, с тех пор и до сегодняшнего дня трахеостомия прочно вошла в медицину и стала одним из самых востребованных хирургических вмешательств на трахее в мировой практике.

В настоящее время трахеостомия может проводиться в амбулаторных условиях по жизненным показаниям либо в стационаре в срочном или плановом порядке. Достаточно подробно разработан ход операции с учетом анатомических особенностей пациентов (рисунок 1) (Литтман И., 1982; Паршин В.Д., 2008).

Теперь, когда необходимость выполнения трахеостомии при наличии соответствующих показаний не вызывает никаких споров, и техника операции отработана досконально, все больше вопросов вызывают осложнения, к которым приводят трахеостомия и интубация у пациентов,

длительно нуждающихся в ИВЛ. Дефект, формирующийся в зоне установки трахеостомической трубки, требует реконструктивного вмешательства.

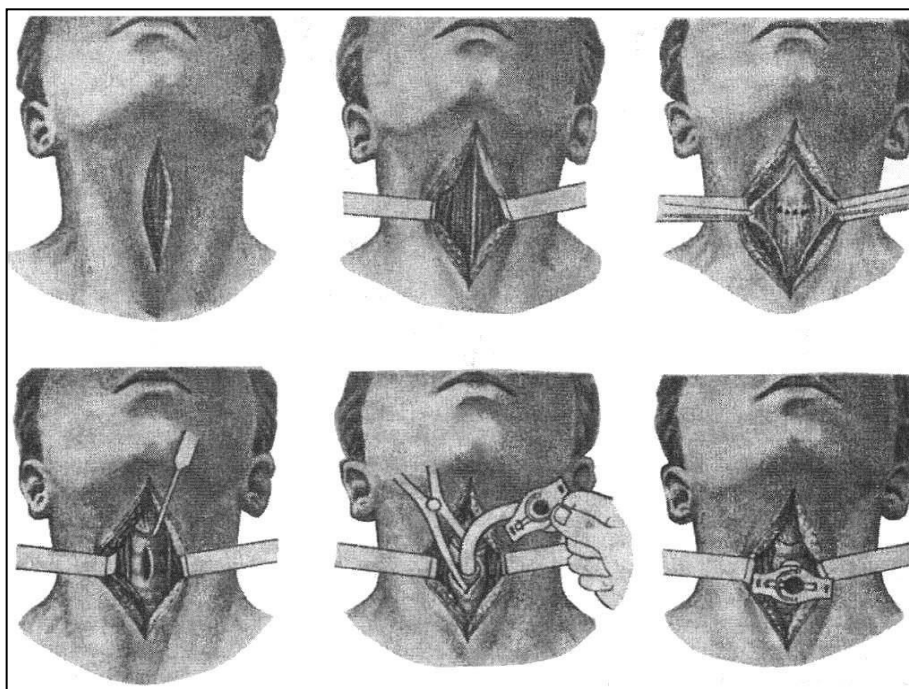


Рисунок 1. Трахеостомия (ход операции)

Однако восстановительная хирургия трахеобронхиального дерева получила развитие значительно позже. Представления Belsey R. о важности успешной реконструкции трахеи после перенесенной обширной резекции уже 70 лет являются предметом цитирования ученых (Belsey R., 1950).

Амировым Ф.Ф. в монографии выделено два этапа развития реконструктивной хирургии воздухоносных путей. Первый берет начало со второй половины XIX века и продолжается до 1940 года. Этот период отмечен трудами оториноларингологов в области реконструктивно-пластической хирургии гортани и шейного отдела трахеи. Ведущие представители данного направления Glick T., Konig F., Hacker E., Иванов А.Ф., Ильяшенко Н.А., Бокштейн Я.С., Рауэр А.Э., Усольцев Н.Н., Хитров Ф.М. и др.

Второй этап автор рассматривает с 1940 года и до момента выхода монографии в 1962 году. В этот период описано множество разработок в

восстановительной хирургии грудного отдела трахеи и бронхов, принадлежащих таким ученым как Daniel R.A., Bucher R.M., Kergin F.G., Sealy W.C., Амиров Ф.Ф. и др. (Амиров Ф.Ф., 1962).

Преемником Амирова Ф.Ф. в столь непростом направлении медицины стал академик Перельман М.И. (рисунок 2), посветивший профилактике, диагностике и лечению стенозов трахеи достаточное количество трудов (Перельман М.И., 1972, 1999).



Рисунок 2. Перельман М.И.

Для лечения рубцовых стриктур трахеи по сегодняшний день торакальными хирургами выполняются циркулярные резекции. Впервые это оперативное вмешательство было проведено Küster E. в 1886 году при локализации патологического очага в шейном отделе трахеи. Операция предполагает удаление сегмента трахеи в зоне поражения с последующим наложением анастомоза (Küster E., 1886).

Вот только на практике это вмешательство имеет шансы на успех при поражении нескольких колец трахеи (Кузьмичев А.П. и др., 1967; Королева Н.С., 1980; Харченко В.П., 1999). Даже в ситуации, когда объем резекции невелик, и можно рассчитывать на радикальное лечение, возможны осложнения, наиболее грозным из которых является несостоятельность анастомоза. Одной из причин тому может стать присоединение вторичной инфекции. В таких случаях приходится накладывать временную трахеостому с возможной перспективой реконструкции в объеме ререзекции с повторным наложением швов. Но в таком случае необходимо учитывать риски, сопряженные с нарастанием натяжения между сшиваемыми кольцами и вероятностью повторной несостоятельности анастомоза. С увеличением числа поврежденных колец трахеи шансы на успех циркулярной резекции и восстановление целостности органа уверенно снижаются. В случае с обширными дефектами, составляющими более половины длины трахеи, данная техника и вовсе не применима (Аничкин В.В., 1988).

Для предупреждения несостоятельности анастомоза Хорошилов И.А. с соавторами несколько модифицировали технику циркулярной резекции в классическом понимании. Авторы предложили подшивать переднюю стенку дистального конца трахеи при помощи нерассасывающегося шовного материала к надкостнице внутренней поверхности грудины. У пациенток 16 лет и 61 года, в отношении которых описано применение данной методики, в отдаленном периоде не зарегистрировано рестеноза трахеи (Хорошилов И.А. и др., 2006).

Труднее обстоит вопрос замещения дефектов, локализованных в области бифуркации трахеи, когда помимо проблемы восстановления целостности дыхательных путей, возникают еще и сложности в адекватной вентиляции легких. В публикации Харченко В.П. упоминается об уникальности операции, выполненной на рубеже последних десятилетий XX века. У онкологического пациента верхняя лобэктомия слева

сопровождалась циркулярными резекциями левого главного бронха и бифуркации трахеи. Анатомия трахеобронхиального дерева воссоздавалась путем наложения анастомоза между трахеей, правым главным бронхом и левым нижнедолевым бронхом с формированием новой бифуркации трахеи (Харченко В.П., 2004).

Отягощающим фактором в хирургии дефектов нижних дыхательных путей при стенозе трахеи является наличие соустья между трахеей и пищеводом. Для их разобщения Паршин В.Д. предложил транстрахеальный доступ, при котором просвет трахеи циркулярно вскрывали в зоне трахеопищеводного свища. Прецизионный доступ позволял выполнять органосохраняющую операцию (Паршин В.Д., 2013).

В XX веке стали внедряться методики протезирования трахеи Губановым А. Г., Зенгером В.Г., Котельниковой И.В., Перельманом М.И., Sotelo R., Fersini M., Guijarro J.R., Banis J.C. и др. (Амиров Ф.Ф., 1962).

Возрастание интереса к такому варианту лечения стимулировало данное направление, и работы продолжают по настоящее время. На смену солидным протезам пришли пористые и силиконовые. И все же тотальное протезирование трахеи по-прежнему продолжает рассматриваться только в рамках эксперимента, так как ни одно из проведенных наблюдений не продемонстрировало долгосрочного эффекта (Yamamoto S. et al., 2013; Ratnovsky A. et al., 2015; Vearick S.B. et al., 2018).

Еще одной попыткой решения вопроса протяженных дефектов трахеи стало использование аутотрансплантатов. Для замещения дефекта использовались полая вена, аорта, пищевод, желчный пузырь, тонкая кишка, мочевого пузырь, бронх, перикардальный и щитовидно-перикардальный лоскут, грудная мышца, лоскут легочной ткани, лоскут предплечья, задняя большеберцовая артерия, кортико-периостально-кожный лоскут медиального мышечка бедренной кости и др. Эти операции были чреватые отсутствием адекватного кровоснабжения и большой травматичностью. Казалось бы, столь бесперспективная методика должна была стать лишь достоянием

истории, но экспериментальные исследования в этом направлении продолжаются и в наше время (Аничкин В.В. и др., 1996; Yu P. et al., 2006; Wurtz A. et al., 2006, 2010, 2013; Kashiwa K. et al., 2009; Chen Q.K. et al., 2010; Fanous N. et al., 2010; Топольницкий Е.Б. и др., 2012; Fabre D. et al., 2013; Al-Khudari S. et al., 2013; Yazdanbakhsh A.P. et al., 2015; Zhang S., Liu Z., 2015; Ninkovic M. et al., 2016; Chinen T. et al., 2016; Kubo T. et al., 2018; Xie H. et al., 2019; Tran J., Zafereo M., 2019; Liu J. et al., 2019; Peng Q. et al., 2019; Mundi N. et al., 2019).

Существует немало работ, основанных на аллотрансплантации трахеи. Во второй половине XX века проводится достаточное количество экспериментов по пересадке трахеи. Первая такая операция в нашей стране выполнена Левашевым Ю.Н. с единомышленниками в 1990 году взрослому пациенту (Левашев Ю.Н. и др., 2009). При анализе мировой литературы имеется множество публикаций по выполнению аллотрансплантаций у детей и взрослых (Sesterhenn K., Rose K.G., 1977; Амиров Ф.Ф., 1978; Вагнер Е.А. и др., 1980; Elliot M.J. et al., 1996; Backer C.L., 1998, 2000; Herberhold C. et al., 1999).

Учитывая то, что имплантируемый орган представлял собой изолированный каркас, аллотрансплантация не смогла стать панацеей, так как обособленная пересадка такого органа, лишенного адекватного кровоснабжения, была чревата высокими рисками некроза.

Вопрос возможности двухэтапного подхода, включающего реваскуляризацию, набирал все большую популярность (Hardillo J.A. et al., 2000). Предпринималось множество попыток реваскуляризации трахеи. Хирургические методы связаны с использованием «проводника», например, артерии или вены, обертыванием салынком, мышцей, фасцией, плеврой или перикардиальной жировой тканью (Nakanishi R., 2007; Xu L., et al., 2014; Nemska S. et al., 2016).

Гудовским Л.М. с соавторами в 1999 году запатентована методика замещения дефекта трахеи и гортани, где реваскуляризация осуществлялась

посредством микрохирургической техники. В соответствии с объемом поражения трахеи и гортани на предплечье формировали кожно-костный лоскут с сосудистой ножкой, включающей лучевую артерию и комитантные вены. Прежде чем погрузить трансплантат в ранее сформированное ложе в области повреждения его прошивали так, что отдельные узловыые швы с одной стороны проводили над костью, с другой – интрадермально. Лоскут фиксировали в зоне дефекта таким образом, чтобы кожа была обращена в просвет трахеи, а костный компонент перекрывал по длине дефект. Питающую ножку погружали в тоннель, который предварительно формировали подкожно между зоной дефекта нижних дыхательных путей и реципиентными сосудами. С целью реваскуляризации лоскута между сопровождающими его сосудами и ветвями сонной артерии и яремной вены накладывали анастомозы. В качестве примера из клинической практики приведены данные об успешно проведенной операции у пациентки 20 лет с обширным дефектом нижних дыхательных путей (Гудовский Л.М. и др., 1999).

Klepetko W. и соавторы опубликовали успешные результаты клинического наблюдения. Пациенту 57 лет с хронической обструктивной болезнью легких и со стенозом дистального отдела трахеи выполнена трансплантация легких и двухэтапная аллотрансплантация трахеи. Двусторонняя пересадка легких сопровождалась погружением трахеи донора в большой сальник реципиента и ушиванием в брюшную стенку подобно стоме. Через шестьдесят дней трахеальный аллотрансплантат сохранял свою функциональную и структурную целостность. Через шесть месяцев после трансплантации легкого пациентка перенесла крикотрахеальную резекцию. Реконструкция с наложением анастомоза конец в конец была вполне достижима, аллотрансплантат трахеи был подвергнут полному исследованию. Спустя тридцать один месяц после трансплантации пациент находился в состоянии облитерирующего бронхиолита 0 стадии. Для

двухстадийной аллотрансплантации может быть использована трахея человека, обернутая в сальник (Klepetko W. et al., 2004).

В 2011 году Delaere P. сообщает об успешной аллотрансплантации трахеи. Выполнялась реваскуляризация трансплантата в гетеротопическом положении. Перед операцией была проведена иммуносупрессивная терапия. Аллотрансплантат заворачивали в фасцию предплечья реципиента. Как только реваскуляризация была достигнута, слизистая оболочка постепенно заменялась слизистой оболочкой щеки реципиента. Через четыре месяца трахея была полностью покрыта слизистой оболочкой, которая состояла из дыхательного эпителия донора и слизистой оболочки щеки реципиента. После отмены иммуносупрессивной терапии аллотрансплантат трахеи был перемещен в правильное анатомическое положение с интактным кровоснабжением. Побочных эффектов не наблюдалось (Delaere P. et al., 2011). Вопросу реконструкции трахеи Delaere P. с единомышленниками посветили и другие работы (Delaere P. et al., 2001, 2003, 2005, 2010, 2014, 2016).

В 2017 году опубликовали материалы исследований Kim W.S. с соавторами. На доклиническом этапе свиньям выполнена реконструкция трахеи свободным васкуляризованным миофасциальным лоскутом. Через двенадцать недель после оперативного вмешательства ни у одного животного не было признаков респираторного дистресса, а на внутренней поверхности имплантата наблюдался плоский эпителий с редкими ресничками. Методику апробировали в клинической практике. За двухлетний период наблюдения, у пациента не наблюдалось нарушений со стороны дыхательной системы (Kim W.S. et al., 2017).

Трансплантация изолированной трахеи даже при удовлетворительной реваскуляризации не обеспечивала необходимого эффекта.

Дыдыкиным С.С. предложено пересаживать не просто изолированную трахею, а подключать донорский орган к питающим его сосудам реципиента. Это позволяло восстановить кровоснабжение трансплантата. В работе

изложен подробный алгоритм забора кадаверного материала. У донора *in situ* выполнялось препарирование трахеи вместе со щитовидной железой, щитовидными артериями и венами, бронхиальными артериями, фрагментом плечеголовной вены. Аллотрансплантация трахеи в составе органокомплекса представлена схематически (рисунок 3) (Дыдыкин С.С., 1998, 2001).

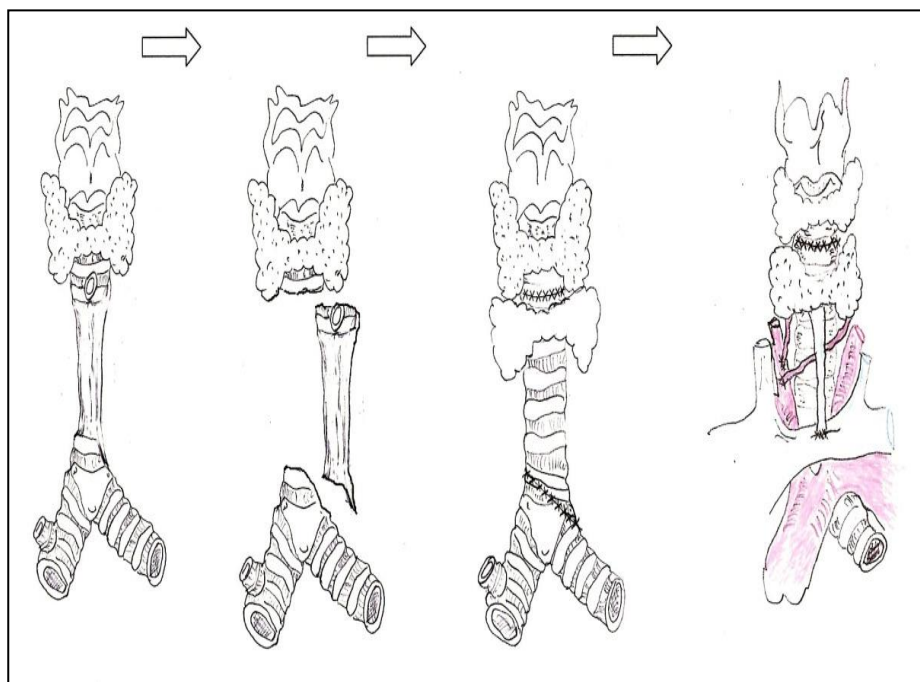


Рисунок 3. Схема аллотрансплантации трахеи в составе органокомплекса

Ранее трансплантация тиреотрахеального комплекса рассматривалась только на животной модели (Lenot V., 1995; Delaere P.R., 1995). Кровоснабжение трахеи человека более сложное и требовало серьезного анатомического обоснования. На доклиническом этапе выполнены серии экспериментов на трупном материале по отработке анатомических аспектов забора и трансплантации тиреотрахеального комплекса (Паршин В.Д. и др., 2008).

Такой вариант аллотрансплантации применялся трижды. Впервые в 2006 году методика апробирована в клинической практике на базе ВНЦХ имени Б.В. Петровского у пациента с рубцовым поражением трахеи. На сегодняшний день пациент жив и преподает в школе физкультуры. Судьбу

двух других пациентов отследить не представляется возможным, так как связь с ними после выписки была утрачена (Дыдыкин С.С., 2006).

Предложенная хирургическая техника, безусловно, имеет все перспективы для дальнейшего развития в клинической практике, невзирая на то, что сталкивается со всеми сложностями сегодняшней трансплантологии.

1.3. Достижения регенеративной медицины в хирургии дефектов нижних дыхательных путей

Ключевую роль в становлении реконструктивного направления хирургии обширных повреждений нижних дыхательных путей отводят клеточной и тканевой инженерии. Передовые разработки регенеративной медицины создают уверенный плацдарм для абсолютно нового направления в хирургии, когда заместить пораженную зону и целый орган можно выращенным искусственным путем материалом (Omori K. et al., 2008; Ott L.M. et al., 2011; Jungebluth P. et al., 2012; Elliot M. J. et al., 2012; Luo X. et al., 2013; Kojima K. et al., 2014; Brouwer K.M. et al., 2013; Gonfiotti A. et al., 2014; Weiss D.J. et al., 2014; Севастьянов В.И., 2014, 2015; Law J.X. et al., 2016; Александров и др., 2017; Dennis J.E. et al., 2017; Gao B. et al., 2019; Hamilton N.J.I., et al., 2019; Dhasmana A. et al., 2020).

В рамках настоящего диссертационного исследования рассматривается потенциал регенеративной медицины в восстановлении целостности воздухоносных путей, в частности трахеи. Однако столь передовое направление медицины может стать востребованным не только в реконструкции трахеи, но и получить развитие в других направлениях хирургии (Fulco I. et al., 2014; Mumme M. et al., 2016; Wiggenhauser P.S. et al., 2017; Cabiati M. et al. 2018).

В литературе встречается все больше работ, основанных на имплантации созданного в искусственных условиях клеточного компонента.

Клеточно-инженерные конструкции являются биомедицинским продуктом и представляет собой матрикс, заселенный клеточной суспензией.

КИК получают двумя способами. В первом случае они выращиваются в биореакторе *in vitro*, во втором - непосредственно в живом организме *in vivo*.

Клетки, как неотъемлемый элемент биоинженерных структур, могут использоваться на разных стадиях дифференцировки. Возможность применения в клинической практике недифференцированных клеток стала предметом внимания ученых всего мира, так как ознаменовала новую эру в медицине. Термин «стволовая клетка» был предложен в 1909 году, но вопрос допустимости ее использования по-прежнему вызывает полемику (Максимов А., 1909). Так применение эмбриональных и фетальных стволовых клеток ограничено законодательством. Этическая экспертиза по внедрению в практику постнатальных стволовых клеток не вызывает серьезных споров. Но гемопоэтические стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки и тканеспецифичные прогениторные клетки обладают меньшей потентностью (Акопян А.С. и др., 2010). Идея применения стволовых клеток обретает все большую популярность, так как является перспективным направлением не только в клинической практике, но и в фармацевтике. Немало публикаций рассматривают преимущества и недостатки применения стволовых клеток (Еремеева М.В., 2010; Семченко В.В., 2012; Гумеров Т.А., 2014.; Wang L. et al., 2017; Lynch T.J. et al., 2018; Zhong Y. et al., 2019; Nakamura R. et al., 2020).

Другим компонентом клеточно-инженерной конструкции является скаффолд. Это своего рода подложка, на которую наносят клеточную культуру. На первый взгляд каркасная роль графта в системе может показаться лишь вспомогательной, но это заключение ошибочно. От свойств скаффолда зависит пролиферация клеток и степень их прикрепления на поверхности матрикса.

Первоначально на роль подложки рассматривались искусственные материалы, но они не были способны к абсолютной биодеградации, а

некоторые в процессе резорбции выделяли токсичные продукты распада. Природная составляющая скаффолда гораздо больше отвечала требованиям безопасности. Описаны КИК на основе коллагена, эластина, фибронектина, хитозана. Чаще других в литературе фигурируют работы с применением желатина, альгинатов, спидроина, фиброина шелка, гиалуроновой кислоты (Weidenbecher M. et al., 2007; Zang M. et al., 2011; Moisenovich M.M. et al., 2012; Новикова И.С., Сторублевцев С.А., 2012; Tani A. et al., 2013; Nakaegawa Y. et al., 2016; Suzuki R. et al., 2016; Cañibano-Hernández A. et al., 2017).

Полученные инженерные эквиваленты тканей и органов должны быть биосовместимы с реципиентом, так как иначе появляется угроза отторжения конструкции. Помимо того КИК не должны провоцировать воспалительный и канцерогенный процесс. Имплантируемая структура должна сохранять исходные физические параметры. Требования к КИК увеличиваются в связи с ростом популярности методики.

НИЦ «Курчатовский институт» опубликовал материалы исследования подкожной имплантации скаффолда лабораторной мыши. При гистологическом исследовании отмечена реваскуляризация скаффолда, так же на его поверхности определяется интенсивная пролиферация клеток реципиента. Подложка на основе хитозана была биосовместима с организмом «хозяина» (Копылов А.Н. и др., 2014).

Наше внимание заслуженно привлекла работа Liu Y. с соавторами. В эксперименте десяти собакам в трахею имплантирован коллаген-конъюгированный протез длиной 5 см. Гистологическая картина продемонстрировала частичное колонизирование внутренней поверхности имплантата псевдомногослойным реснитчатым эпителием (Liu Y. et al., 2016).

Для успешной колонизации подложки эпителиальными клетками с целью эффективной реконструкции трахеи составляющие скаффолда оценивались на основе различных параметров, включая механическую

прочность, объемную деградацию, прикрепление клеток и их распространение, метаболическую активность, образование фокальной адгезии и дифференцировку в реснитчатые и бокаловидные клетки (Varma R. et al., 2018).

В поисках безопасной КИК предложена двухэтапная методика по ее разработке. В основу идеи на первом этапе положено создание скаффолда на базе естественного внеклеточного матрикса. Кадаверный аллогraft проходил процедуру децеллюляризации. Посредством различных факторов аллотрансплантат освобождался от клеточной культуры донора, теряя при этом иммуногенные свойства. По количеству остаточной ДНК в донорском органе можно было оценить эффективность удаления клеток из ткани. Результат децеллюляризации зависел от происхождения ткани и конкретных физических, химических и ферментативных методов, которые использовались (Gilbert T.W. et al., 2006; Guimaraes A.B. et al., 2019).

Необходимость детального подхода к детергенту продиктована высокими рисками утраты функциональности аллогraftа. Структурная целостность и концентрация компонентов внеклеточного матрикса в аллотрансплантате трахеи относительно нативного органа зависела от циклов децеллюляризации (Naikal S. et al., 2012).

Серьезные осложнения могут развиваться с прогрессированием количества циклов децеллюляризации (Baiguera S. et al., 2014).

Представлены результаты исследований, согласно которым существенное снижение уровня гликозаминогликанов может способствовать потере механической целостности биотрахеи. Преодоление структурных изменений, вызывающих дисбаланс в равновесии хрящевого матрикса, необходимо для оптимизации клинического эффекта (Partington L. et al., 2013).

В поисках щадящего метода децеллюляризации трахеи и бронхов было апробировано гамма-излучение. Методика оказывала порочное действие, так

как способствовала необратимым структурным изменениям каркаса (Johnson C.M. et al., 2017).

Бесклеточный скаффолд был получен деликатным способом воздействия при помощи лазера. Механическая прочность каркаса отвечала требованиям КИК (Xu Y. et al., 2017).

Вакуумная децеллюляризация оказалась весьма эффективной. Она не вызывала структурных нарушений каркаса и при этом была экономически целесообразна, так как проводилась за девять дней (Butler C.R. et al., 2017). Сравнительно ферментативная децеллюляризация требовала от трех до восьми недель.

В качестве приемлемых условий для полного лишения нативного органа клеточного компонента разработаны биореакторы. С их помощью стало возможным уменьшить потерю аллогraftом механических и биохимических свойств.

В литературе представлены успешные исследования различных децеллюляризованных матриц у животных и пациентов с поражением трахеи (Zhang F. et al., 2013).

На втором этапе создания КИК бесклеточная структура, полученная при децеллюляризации, заселялась клетками реципиента. Таким образом, биоматрикс могли быть персонифицированы и в этом их неоспоримое преимущество.

Hung S.H. с единомышленниками оценили целесообразность трансплантации децеллюляризованного трахеального каркаса для реконструкции сегментарных дефектов трахеи у кроликов. По окончании периода наблюдения установлено, что регенерация дыхательного эпителия уже через две недели после операции оказалась удовлетворительной, а вот трубчатые структуры были скомпрометированы, что в конечном итоге привело к гибели животных на 7-24 день эксперимента. Возможно, такой исход был предопределен неудачным выбором способа децеллюляризации (Hung S.H. et al., 2016).

Учитывая, что плотный хрящевой каркас трахеи может препятствовать миграции клеток и провоцировать неадекватную регенерацию хряща, был предложен метод лазерных микропор, который делал образец трахеи пористым, чтобы облегчить колонизацию клеток (Xu Y. et al., 2019).

Имеется работа по внедрению в зону дефектов трахеи и бронхов КИК на основе сополимера молочной и гликолевой кислот - политриметиленкарбоната. На пористый скаффолд заселялись хондроциты. Степень механической прочности матрикса превышала ранее апробированные варианты, поэтому была менее подвержена хондромалиции (Yan B. et al., 2017).

В настоящее время существует достаточное количество работ по теме клеточной и тканевой инженерии, в которых представлена внушительная доказательная база о целесообразности использования разных вариантов гидрогелей (Vadalà G. et al., 2017; Weinstein-Oppenheimer C.R. et al., 2017; Tan Q.W. et al., 2017).

Risbud M. с соавторами в качестве одной из причин несостоятельности трахеальных протезов называют отсутствие на их поверхности эпителиальной выстилки. Клетки респираторного эпителия человека, культивированные при помощи гидрогеля, продемонстрировали нормальную морфологию и рост. Гидрогель обеспечивал рост смешанной популяции дифференцированных эпителиальных клеток и мог быть использован для покрытия протезов трахеи (Risbud M. et al., 2001).

Гидрогели являются одним из наиболее привлекательных биоматериалов для регенеративной инженерии, поскольку могут быть преобразованы в тканевые миметические 3D-каркасы для поддержания роста клеток. Это обусловлено их сходством с нативным внеклеточным матриксом. Передовые нано- и микротехнологии значительно повысили способность контролировать свойства и функциональные возможности гидрогелевых материалов. Выделяют физическую, химическую и функциональную

модуляцию гидрогелей для проектирования и конструирования биомиметических тканей (Guan X. et. al., 2017).

В 2011 году «Lancet» опубликовал данные об успешной трахеобронхиальной трансплантации, выполненной Jungebluth P. с соавторами. У мужчины 36 лет, перенесшего оперативное лечение и лучевую терапию по поводу онкологического поражения нижних дыхательных путей, выявлен рецидив заболевания с локализацией опухолевого процесса в дистальном отделе трахеи и главных бронхах. Удаление новообразования способствовало возникновению обширного дефекта нижних дыхательных путей. Эту область заместили биоартифицированным нанокомпозитом, заселенным аутологичными моноклеарными клетками костного мозга. Жизнеугрожающих осложнений в послеоперационном периоде не было зарегистрировано. При контроле через пять месяцев после операции данных за прогрессирование не наблюдалось (Jungebluth P. et. al., 2011).

В патенте RU 2453291, опубликованном в 2012 году, Давыдов М.И. с соавторами для замещения повреждения трахеи предлагают биоинженерную конструкцию, содержащую аллогенные хондроциты (Давыдов и др., 2012).

В 2013 году опубликован патент RU 125464. Батухтиной Е.В. с соавторами предложена КИК, которая представляет собой двуслойную пластину из клеточных элементов без помощи чужеродного каркаса или матрикса. Прочность между элементами конструкции обеспечивалась посредством межклеточных контактов. Для фиксации пластины предлагается ее подшивание (Батухтина Е.В. и др., 2013). Данная методика, безусловно, перспективна, однако применение шовного материала для фиксации клеточно-инженерной конструкции в зоне дефекта, не достаточно надежно.

Bolton W.D. опубликованы успешные результаты замещения протяженного дефекта трахеи аллогенным бесклеточным дермальным матриксом в клинической практике. У пациентки 38 лет через несколько месяцев после перенесенного оперативного вмешательства в объеме

гемитиреоидэктомии в 2001 году появились жалобы на нарушение глотания. Выявлен пищеводно-трахеальный свищ. В ходе диагностического поиска заподозрен онкологический процесс. С целью верификации заболевания, выполнена резекция пищевода и трахеи в зоне поражения для гистологического исследования. Протяженность удаленного сегмента пищевода составила 7 см, трахеи в области ее задней и правой стенки - соответственно 8 см и 5 см. Объем резецированных тканей был адекватен для патологоанатомического исследования. Диагностирована лимфома Ходжкина. Размеры образовавшихся дефектов не позволяли выполнить реконструкцию пищевода и определили радикальную тактику лечения. В случае протяженного дефекта трахеи успешно использован AlloDerm размерами 6x10 см. В публикации отмечено, что спустя четыре года с момента операции пациентка жива и адаптирована к нормальной жизни (Bolton W.D. et al., 2017).

Анализируя достижения и неудачи регенеративной медицины, невозможно обойти стороной научный скандал, разгоревшийся в мировом сообществе в 2014 году и связанный с именем профессора Каролинского Университета. В 2008 году группа ученых под руководством Macchiarini P. осуществила пересадку инженерной трахеи. Донорскую трахею лишали клеточного компонента, а полученный каркас заселяли собственными стволовыми клетками реципиента. Трахея создавалась *in vitro*. В 2009 году выполнена исключительная операция – трахея выращена *in vivo*. В дальнейшем в плане усовершенствования методики предполагалось использование нанокompозитных материалов. Пересадка синтезированного органа проведена была и в России. В 2014 году миф об уникальности и универсальности методики был развенчан. Реальная картина продемонстрировала чрезвычайно высокую летальность, включая и у пациентки из России. На наш взгляд, предлагаемый способ реконструкции не имел достаточной доклинической экспериментальной базы, что стало одной из причин неудач. Масштаб конфликта был огромен, о деятельности

Macchiarini P. выпущены документальные фильмы: «Experimenten» (2015г.), «Heliedabouteverything» (2018г.) (Macchiarini P. et al., 2008; Колпаков Г., 2012; Corbascio M., et al., 2014; Abbot A., 2016; Vogel G. et al., 2016; Teixeira da Silva J.A., 2017).

В 2014 году в научном журнале «Annals of Biomedical Engineering» представлены результаты экспериментального исследования группы ученых во главе с Shin Y.S. У шести кроликов формировали дефект стенки трахеи размерами 5x10 мм. Зону дефекта замещали КИК. Формировали каркас размерами 5x12 мм из измельченного и децеллюляризованного свиного суставного хряща, который заселяли мезенхимальными стволовыми клетками. Оценка жизнеспособности имплантата проводилась через 6 и 10 недель после операции. Ни у одной особи не наблюдалось признаков нарушения дыхания. КТ-картина, эндоскопическое исследование, результаты гистологии подтверждали эффективность метода (Shin Y.S. et al., 2015).

Барановским Д.С. с соавторами культивирован *in vitro* мерцательный эпителий человека. Клеточная субстанция, подлежащая исследованию, получена из биоптата трахеи пациентов 18-55 лет. Функциональные свойства выращенного эпителия аналогичны здоровой слизистой трахеи (Барановский Д.С. и др., 2015).

В публикации 2016 года предлагается ткане-инженерная трахея, запатентованная в Китае (Patent CN 105853022A) (Fu Wei, 2016). Преимущество настоящего изобретения продиктовано тем, что каркас трахеи обладал превосходной опорной способностью, мог быть сформирован за две недели. Но данная модель ориентирована только на построение хрящевого каркаса. В работе не рассматривались регенерация слизисто-подслизистой основы.

В работе Гилевич И.В. для лечения стенозов трахеи предложена ткане-инженерная конструкция, представляющая собой синтетический каркас, заселенный мононуклеарными клетками костного мозга. В условиях *in vitro* осуществлялось прикрепление и пролиферация недифференцированных

клеток на поверхности матрикса, а дифференцировка продолжена после имплантации скаффолда обезьянам. Таким образом, в представленном исследовании в качестве биореактора успешно использовался живой организм. Применение для стимуляции регенерации гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста и эритропоэтина имело положительный эффект (Гилевич И.В., 2017).

«Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery» в 2018 году представил материалы работы Hirsch T. с коллегами. Результаты исследования говорили о целесообразности использования имплантатов, представляющих собой альгинатные каркасы, колонизированные стволовыми клетками жирового происхождения. Этот метод предложен для аутологичной реконструкции мягких тканей (Hirsch T. et al., 2018).

В октябре 2018 года опубликованы результаты реконструкции трахеи у овец композитным биоматериалом. Для создания цилиндрических трахеальных имплантатов длиной 3 см и диаметром 2,5 см использовался полимер, содержащий различные формы углеродных волокон, пропитанных полисульфоном. Внутренняя поверхность пяти имплантатов была дополнительно покрыта полиуретаном, чтобы способствовать миграции респираторного эпителия. В конце периода наблюдения наружные поверхности имплантатов покрывались тканью, которая в различной степени напоминала гистологическую структуру нормальной стенки трахеи. Внутренние поверхности протезов были покрыты только васкуляризованной соединительной тканью. Внутреннее полиуретановое покрытие не улучшало исходов реконструкции трахеи и способствовало избыточной грануляции, что способствовало умеренному и тяжелому стенозу на трахеальных анастомозах (Ścierański W. et al., 2018).

Разработанные в промышленных интересах в конце XX столетия 3D-принтеры (рисунок 4) обрели устойчивую позицию в медицине.

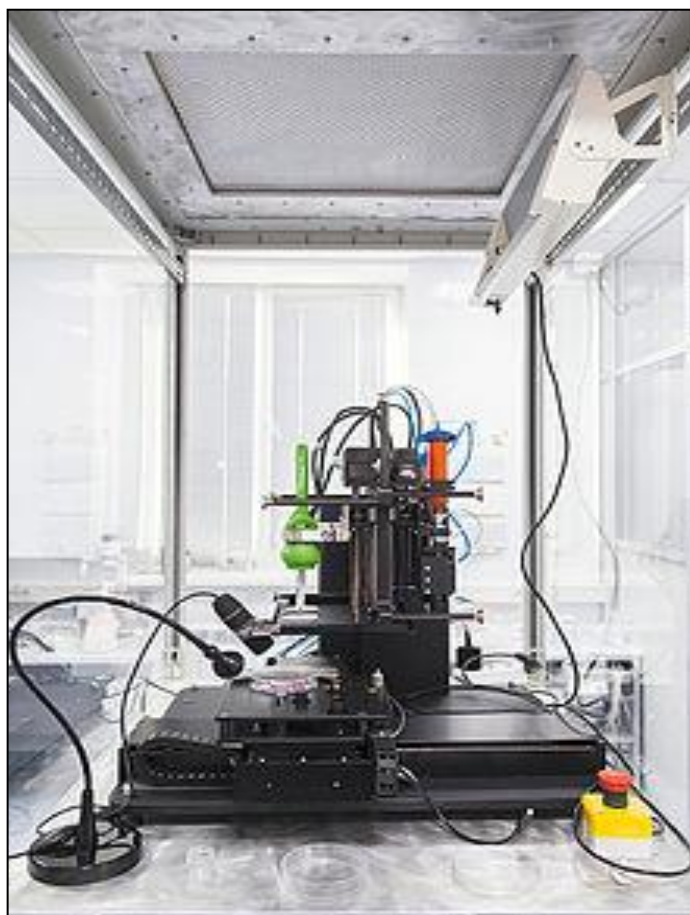


Рисунок 4. 3D-принтер

Стремительное развитие данного направления позволило сегодняшней науке иметь в арсенале напечатанные медицинские инструменты, протезы, импланты и, конечно же, живые ткани и органы - продукт биопринтинга (Лазаренко В.А. и др., 2018).

Трехмерная печать зарекомендовала себя в челюстно-лицевой хирургии, травматологии и ортопедии, реконструктивной и пластической хирургии.

Биопечать стала преимущественным направлением в реконструктивной хирургии органов и тканей дыхательной системы последнее десятилетие (Целуйко С.С. и др., 2016).

Существует множество разработок по имплантации созданных на трехмерных принтерах синтетических эквивалентов тканей и органов,

применяемых при тяжелой трахеобронхомаляции (David A. et al., 2013; Jung S.Y. et al., 2016).

В литературе описана реконструкция дефектов трахеи длиной 2 см с помощью 3D-напечатанного имплантата поликапролактона у кроликов с краткосрочной перспективой. Значительное образование грануляционной ткани снижало выживаемость, поэтому возникла необходимость совершенствования метода, направленная на ограничение избыточного роста грануляций (Chan D.S. et al., 2019).

В журнале «Biomaterials» опубликованы оптимистичные результаты эксперимента *in vivo*, в основу которого положено замещение дефекта трахеи кролика при помощи гидрогеля, полученного с помощью 3D-принтера. Гидрогель представлял собой природный полимер-фиброин шелка, изготовленный с использованием глицидилметакрилата (Hong, H. et al., 2020).

Опубликованы материалы об изготовленной искусственной трахее с механическими свойствами аналогичными нативной трахее. Описана возможность стимулировать регенерацию слизистой оболочки трахеи и хряща за счет оптимального сочетания двухслойного трубчатого каркаса и клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Каркас искусственной трахеи был изготовлен изнутри из нановолокон поликапролактона и снаружи из 3D-печатных микроволокон поликапролактона. Кроме того бронхиальные эпителиальные клетки человека, мезенхимальные стволовые клетки и хондроциты использовались для максимальной регенерации слизистой оболочки трахеи и хряща *in vivo* (Kim I.G. et al., 2020).

Биоинженерные протезы трахеи являются биосовместимыми, нетоксичными, пористыми и имеют 3D-биомиметическую ультраструктуру с хорошей механической прочностью, что обеспечивает эффективную регенерацию тканей (Dhasmana A. et al., 2020).

Сегодня трахея и бронхи, напечатанные на 3D-принтерах (рисунок 5), уже не воспринимаются как некое экзотичное веяние медицины.



Рисунок 5. 3D-напечатанные трахея и бронхи

Повышенный интерес к реконструктивно-восстановительной хирургии трахеи, базирующийся на разработках в области клеточной и тканевой инженерии, имеет серьезную научно-практическую аргументацию.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Экспериментальное исследование выполнено на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

Первый этап посвящен анализу мировых разработок в реконструктивной и восстановительной хирургии нижних дыхательных путей. Выявлены наиболее перспективные направления в замещении протяженных дефектов трахеи. Сформулированы требования к имплантируемым биоматриксам. Подвергнуты тщательному анализу различные способы фиксации клеточно-инженерной конструкции. На первом этапе проанализированы варианты анестезиологического пособия. Определены параметры контроля: частота дыхательных движений (ЧДД), частота сердечных сокращений (ЧСС), температура тела (Т), уровень лейкоцитов. Сформулированные в границах диссертации протоколы представлены на рассмотрение в Локальный этический комитет ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

На втором этапе эксперимента был сформирован последовательный алгоритм выполнения хирургических вмешательств, представленный схематически (рисунок 6).

Операции осуществлены в три последующих этапа с учетом поставленных задач. Точнее, на третьем этапе дана оценка роли реваскуляризации в репарации слизисто-подслизистой трахеи.

На четвертом этапе разработан оптимальный способ повреждения стенки трахеи кролика и смоделирован ее критический дефект.

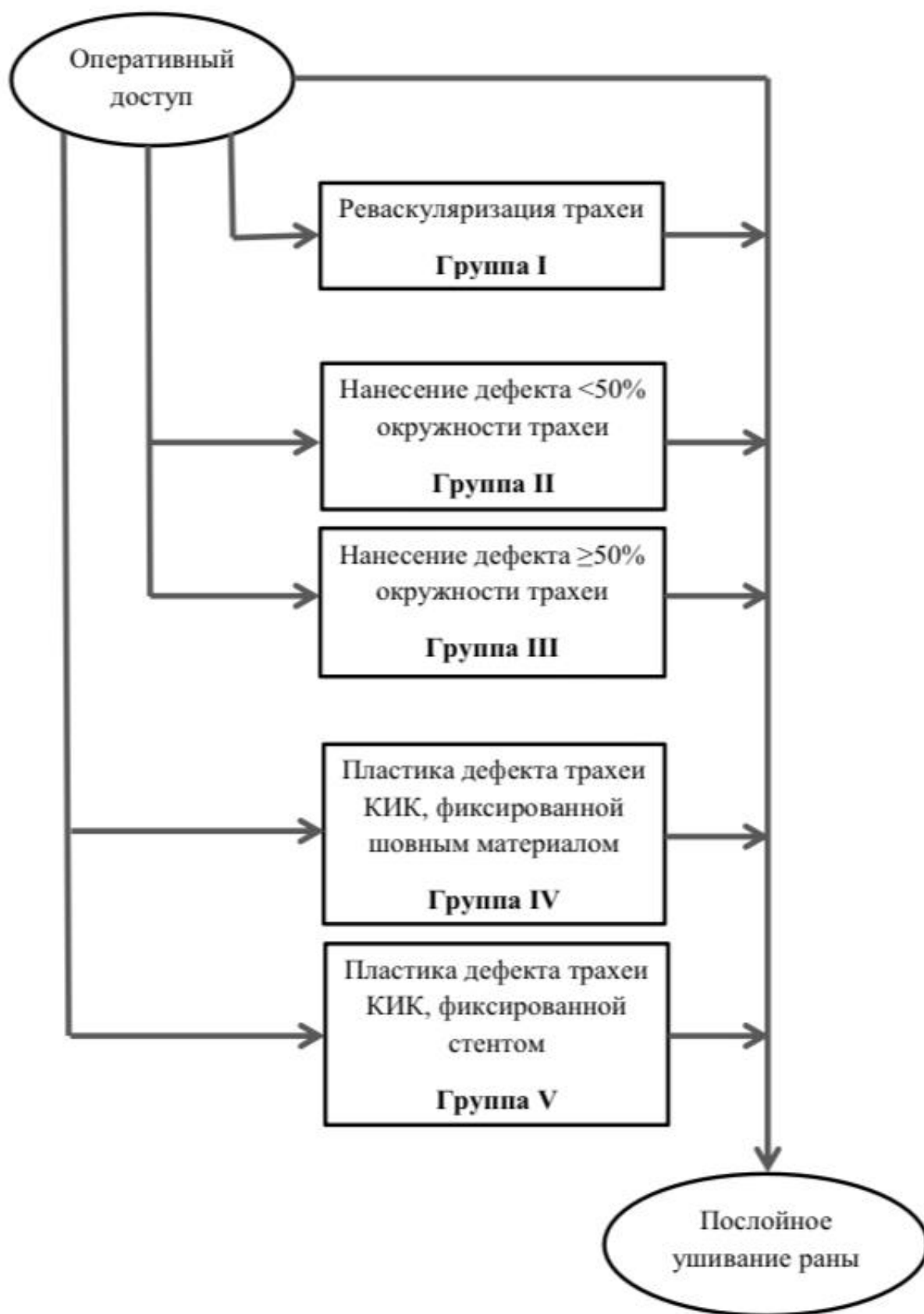


Рисунок 6. Алгоритм выполнения хирургических вмешательств

Пятый этап эксперимента связан с оценкой перспективности КИК в пластике дефекта слизисто-подслизистой трахеи с учетом применения двух разных методов фиксации биоматрикса в зоне повреждения.

На шестом этапе проведены интерпретация полученных результатов и статистический анализ, которые послужили основой для построения выводов и формирования рекомендаций.

2.2. Этические и правовые аспекты эксперимента

Сформулированные в границах данной научно-квалификационной работы протоколы представлены на рассмотрение в Локальный этический комитет ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Заседание от 5 февраля 2020 года постановило одобрить (выписка из протокола № 02-20).

На протяжении всей исследовательской деятельности мы придерживались принципов гуманного обращения с животными. Руководствовались документами, действующими на территории нашего государства:

1. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 года №51 СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».
2. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание) (Дата введения 2016-07-01)
3. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики (Дата введения 2015-08-01) (Росстандарт).

Исследовательская этика также полагалась на документы, международного значения, Хельсинкскую декларацию, разработанную

Всемирной медицинской ассоциацией в 1964 году (последний пересмотр в 2013 году) (The World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki 1964).

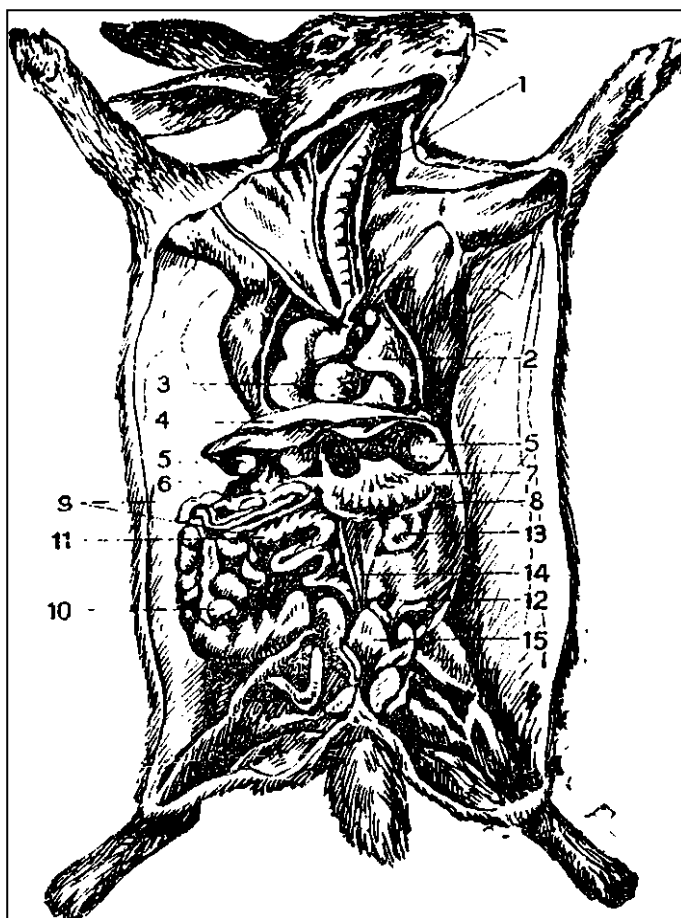
По окончании экспериментального исследования все выжившие животные были выведены из эксперимента. Оптимальным и универсальным методом эвтаназии животных выбрана передозировка наркоза – введение анестетика в летальной дозе или использование CO₂-камеры. Такие способы умерщвления лабораторных животных были признаны надежными и гуманными, легкими и безопасными в исполнении, эстетически приемлемыми для персонала, проводящего процедуру, безболезненными и быстродействующими для кроликов, так как не вызывали беспокойства у животных и требовали минимальной фиксации. Признаками, подтверждающими наступление смерти животного, стали прекращение сердцебиения и дыхания, отсутствие рефлексов, снижение температуры тела (Рыбакова А.В., Макарова М.Н., 2015).

2.3. Характеристика лабораторных животных

В качестве животной модели использовали кроликов породы Шиншилла (*Oryctolagus Chinchilla*) весом около 4 кг в возрасте 12±1мес. Хирургическое вмешательство проведено 41 животному. Различий по полу не проводилось. Такой выбор животных был связан с рядом преимуществ работы с ними. Анатомия трахеи кролика схожа с анатомией человека и доступ к ней не представляет технических сложностей. Кролики филогенетически ближе к приматам и имеют более разнообразный генетический фон по сравнению с мелкими грызунами, но при этом экономичнее более крупных животных (Den Hondt M. et al, 2016).

Кролики были полностью здоровыми, что являлось абсолютным требованием для успешного проведения эксперимента.

Несколько подробнее остановимся на анатомических особенностях дыхательной системы кролика (рисунок 7).



- 1-трахея,
- 2-легкое,
- 3-сердце,
- 4-диафрагма,
- 5-печень,
- 6-желчный пузырь,
- 7-желудок,
- 8-селезенка,
- 9-тонкая кишка,
- 10-слепая кишка,
- 11-толстая кишка,
- 12 - прямая кишка,
- 13 почка,
- 14 - мочеточник,
- 15 - мочевого пузыря

Рисунок 7. Анатомия кролика

Дыхательная система являлась непосредственным предметом нашего исследования. Все хирургические операции проводились на трахее. Трахея кролика обладает выраженными индивидуальными особенностями. Орган относят к нижним дыхательным путям. Это трубчатый орган длиной 9-11 см, диаметром 7-12 мм. Трахея имеет хрящевой каркас, образованный кольцами гиалинового хряща. Хрящи соединяются между собой кольцевидными связками. Изнутри трахея выстлана мерцательным эпителием и содержит серозные, слизистые и смешанные железы. Между хрящами и в дорсальной стенке трахеи определяется подслизистый слой. Слизистая оболочка в этой области более подвижна и собрана в продольные складки. Выделяют краниошейный и грудной отдел трахеи. Трахея является продолжением

гортани, образует бифуркацию, после чего переходит в правый и левый главные бронхи. В верхнем отделе к трахее прилегает щитовидная железа. Трахею окружает рыхлая соединительная ткань. Спереди в грудном отделе к трахее прилежат лимфатические сосуды и узлы средостения, плечеголовной ствол, эпикардальный жир. Правее от трахеи расположены полая вена, ветви правой непарной вены, грудной проток, правый блуждающий нерв. Слева от трахеи проходит пищевод, дуга аорты, левая краниальная полая вена, ветви непарной вены, возвратный гортанный нерв. Вокруг трахеи расположены жировая ткань, мелкие кровеносные сосуды. Кровоснабжение трахеи осуществляется за счет ветвей общей сонной артерии, бронхопищеводной артерии. Лимфатические сосуды и трахеобронхиальные узлы локализованы с обеих сторон от трахеи. Иннервацию обеспечивает блуждающий нерв (Терентьев и др., 1952; Демина М.Ф. и др., 1959; Ткаченко Л.В. и др., 2010).

2.4. Условия пребывания и особенности содержания животных на этапах эксперимента

Животных содержали до и после хирургического вмешательства в виварии (Т - 20°C, относительная влажность - 46%). В неволе животным предоставлялось достаточно пространства с обогащенной средой, необходимого для нормальной двигательной активности. Кролики содержались в больших, чистых, сухих, достаточно освещённых и обогреваемых клетках прямоугольной формы. Площадь клетки для одного кролика была на 33% больше его размеров (рисунок 8).



Рисунок 8. Кролик породы Шиншилла в виварии

Помимо вивария животные пребывали в операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского (рисунок 9). Условия проведения эксперимента максимально приближены к требованиям реального операционного блока.

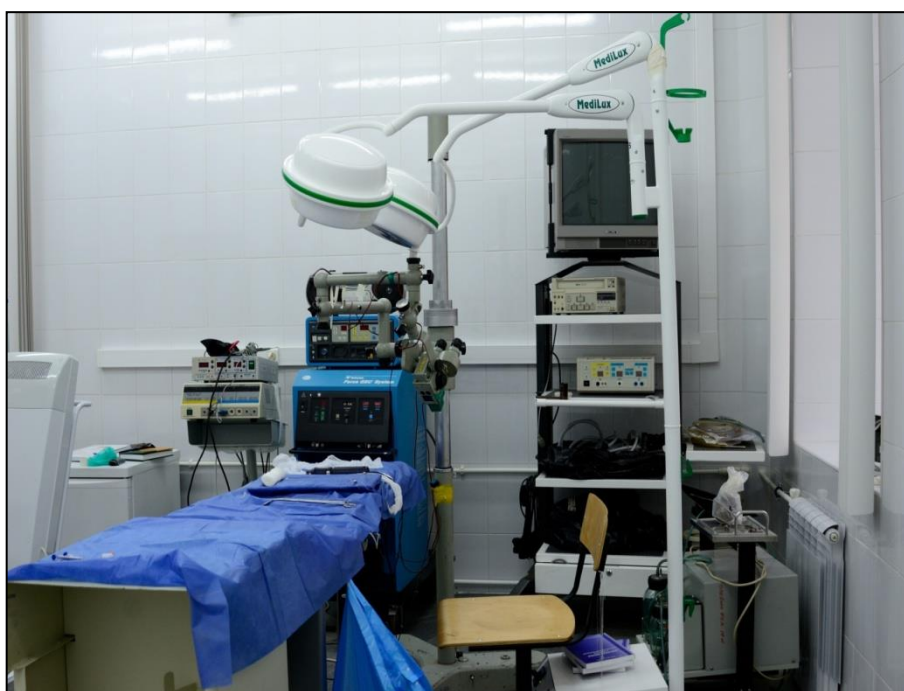


Рисунок 9. Операционная

Правильное кормление зверьков основывалось на принципах рационального и сбалансированного питания. При несоблюдении определенного рациона и отсутствии контроля качества пищи, попадающей к животным, их иммунитет снижается, что способствует развитию у кроликов заболеваний. Это негативно сказывается на проведении эксперимента, искажая его результаты. Кролики получали зерно, овсяные отруби, кукурузу, жмых, морковь, свёклу, репу, картофельные очистки. Летом включали в рацион свежие травы, сельскохозяйственную зелень, а в зимний период специально для этих целей проращивали овес. В систему питания включали сено, а также грубые волокна (ветки липы, берёзы, яблони). Для питья животные получали чистую питьевую воду комнатной температуры.

2.5. Анестезиологическое пособие

В работе рассматриваются проблемы обезболивания экспериментальных животных. Прослежена высокая чувствительность кроликов к общей анестезии. Два кролика погибли на этапе анестезии от передозировки анестетика, поэтому в ходе эксперимента неоднократно проводили редукцию дозы используемых препаратов.

Премедикация проводилась путем введения 0,3 мл атропина и 0,3 мл димедрола внутримышечно из расчета на животное весом 5 кг. Затем внутримышечно вводили 2% раствор ксилазина гидрохлорида 5 мг / 1 кг массы тела кролика. Спустя 5 мин проявлялось седативное действие препарата. Животное переставало активно сопротивляться, и появлялась возможность осуществить венозный доступ через краевую вену уха с использованием канюли размера 24G. Внутривенно вводился золетил 5% в дозе 7 мг / 1 кг. Такая комбинация ксилазина гидрохлорида с золетилом позволяли поддерживать миорелаксацию и отсутствие болевой чувствительности у животных на протяжении 30-35 мин (Разина А.В., 2010).

При хирургических вмешательствах, сопровождавшихся вскрытием просвета трахеи, выполнялась интубация нижних дыхательных путей при помощи детского ларингоскопа. Длительность операции увеличивалась, поэтому анестезия в таких случаях пролонгировалась.

При выведении животных из наркоза с целью стимуляции дыхательного и сосудодвигательного центров вводили 0,2 мл сульфокамфокаина внутривенно. С целью анальгезии назначали 0,25 мл кеторола внутримышечно.

Для профилактики отеков применялись петлевые диуретики. Каждому кролику в конце операции вводили фуросемид. При обнаружении признаков отека легких, как реакции на обширное повреждение трахеи, проводили инфузию маннитола и вводили 0,1 мл преднизолона. Интраоперационно контролировали диурез через мочепузырный катетер.

2.6. Методологические подходы к воспроизведению эксперимента

Предложен оригинальный доступ к трахее кролика с разрезом кожи по средней линии шеи. В случае проведения реваскуляризации трахеи путем подтягивания и окутывания ее лоскутом поверхностной фасции груди разрез на грудной клетке отклонялся влево от средней линии.

Формирование дефекта производилось в начале эксперимента с помощью бранши анатомического пинцета, но позже мы пришли к пониманию, что использование офтальмологического скальпеля наиболее обоснованно.

Смоделировали критический дефект слизисто-подслизистой трахеи, для реконструкции которого использовали КИК.

Отдельное внимание уделено способам фиксации биоматрикса в просвете трахеи. Апробированы две методики, одна из которых основывалась на подшивании, а другая заключалась в фиксации биоматрикса при помощи стента.

2.7. Методы исследования

Клинические

В течение всего эксперимента у каждой особи выполнялась регистрация клинических показателей, термометрия с фиксацией параметров в дневниках наблюдений.

Лабораторные

Забор крови на общий анализ выполнялся в контрольные сутки. Данные запротоколированы.

Фотографирование

Получены цветные фотографии на всех этапах оперативных вмешательств. Запечатлены изображения гистологических препаратов.

Гистологическое исследование

Важной составляющей работы стало гистологическое исследование. По окончании периода наблюдения животные выведены из эксперимента и подвергнуты вскрытию по описанной методологии (Коптяева К.Е. и др., 2019). Полученный при аутопсии материал фиксировали в формалино-солевой смеси Мельникова-Разведенкова (Вахрушева Т.И., 2014). Препараты окрашивали при помощи гематоксилина и эозина (Chan J.K., 2014). Патологоанатомическое исследование проведено специалистами НИЦ «Курчатовский институт».

Статистический анализ

Проведен статистический анализ на основании полученных в эксперименте абсолютных величин. Рассчитаны средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической, корреляционная зависимость, уровень достоверности исследуемых параметров в лабораторных группах. Статистическая обработка результатов эксперимента выполнена в многофункциональной программе статистического анализа «Statistica 10.0».

ГЛАВА 3.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ НА РЕПАРАЦИЮ СЛИЗИСТОЙ И ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ

Прежде чем приступить к апробации нового способа реконструкции дефекта слизисто-подслизистой трахеи мы задались вопросом о том, как дополнительно стимулировать процесс заживления. Существует ряд работ, в которых реваскуляризация рассматривается в аспекте стимуляции регенеративных возможностей организма.

Для оценки эффективности реваскуляризации в пластике дефекта слизисто-подслизистой трахеи модифицирована одна из техник, представленная Hardillo J. с соавторами (Hardillo J. et al., 2001). Принято решение о возможном выполнении реваскуляризации в качестве дополнительного этапа реконструкции повреждения слизисто-подслизистого слоя трахеи при получении удовлетворительных результатов ее внедрения в экспериментальной группе животных. В соответствии с видом планируемого оперативного вмешательства создана одноименная группа I «Реваскуляризация трахеи», в которую включили восемь животных (n=8).

3.1. Ход оперативного вмешательства в группе I

Кролики на операционном столе располагались лежа на спине. Такое положение животных было и во время всех остальных операций, описанных в исследовании. Бритвой удаляли шерстяной покров на передней поверхности шеи и в верхних отделах грудной клетки. Выполнялась трехкратная обработка операционного поля растворами антисептиков. В настоящей диссертационной работе был предложен и реализован оригинальный доступ к трахее кролика по средней линии шеи. Так как в группе I «Реваскуляризация трахеи» на груди предполагалось формирование фасциального лоскута, то при переходе на грудную клетку разрез несколько

отклоняли от средней линии в сторону, противоположную той, на которой выделяли фасцию (рисунок. 10). Это позволяло избежать повреждений питающих лоскут сосудов. Такой щадящий подход положительно сказался на темпах реабилитации животных в послеоперационном периоде.

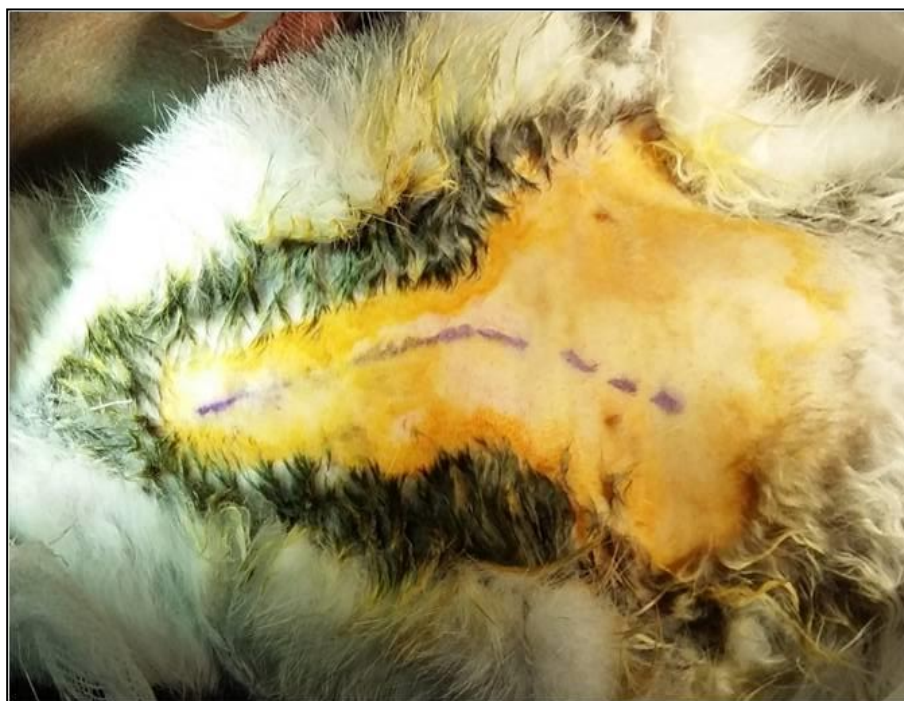


Рисунок 10. Условная разметка разреза в группе I

Далее препарировали превисцеральную клетчатку (рисунок 11).

У кролика щитовидная железа более мобильна по сравнению с человеком. Поэтому при появлении ее в ране чаще всего орган удавалось сместить в сторону, обеспечивая доступ к зоне предполагаемого вмешательства на трахее. В ряде случаев, когда щитовидная железа все же ограничивала доступ к трахее, ее пересекали и осуществляли гемостаз.

После того как трахея была мобилизована (рисунок 12) на ее передне-боковой поверхности участок размерами 20x10 мм лишали внешнего кровоснабжения. На этом этапе допускался электрокоагуляционный гемостаз.



Рисунок 11. Препарирование

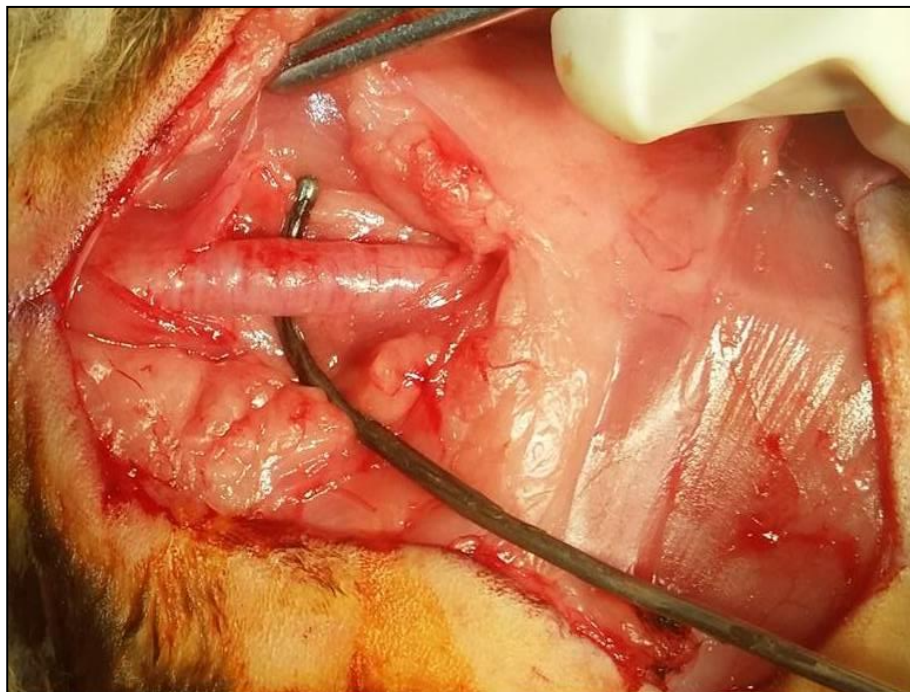


Рисунок 12. Мобилизация трахеи

Далее формировали фасциальный лоскут на сосудистой ножке с обязательным учетом индивидуального хода питающих сосудов (рисунок 13). Было принципиально важным сохранить крупную артерию с сопровождающей ее веной.



Рисунок 13. Формирование фасциального лоскута на сосудистой ножке

Реваскуляризацию трахеи в зоне, целенаправленно лишенной питания, осуществляли путем подтягивания и окутывания лоскутом поверхностной фасции груди на питающей ножке. Лоскут фиксировали монофиламентным нерассасывающимся полипропиленовым шовным материалом 8/0 к трахее таким образом, что зона лишенная кровоснабжения была полностью укрыта фасцией (рисунок 14). Обеспечивали адекватный гемостаз.

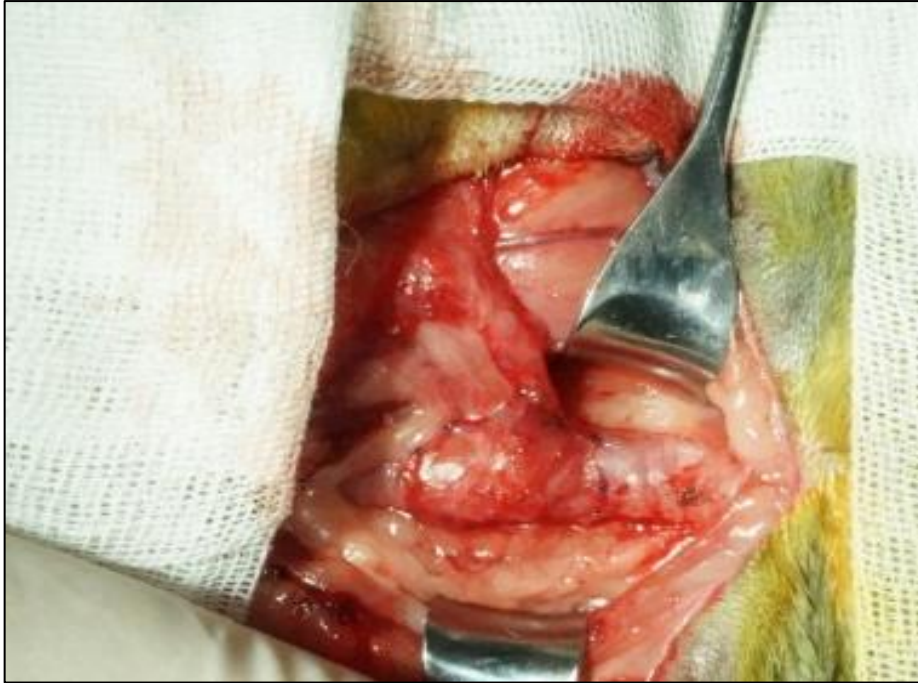


Рисунок 14. Трахея на протяжении выделенного участка полностью укрыта фасциальным лоскутом

Послойно ушивали паратрахеальные мышцы (рисунок 15), фасцию шеи (рисунок 16), кожу (рисунок 17). Накладывали асептическую повязку.



Рисунок 15. Ушивание паратрахеальных мышц



Рисунок 16. Ушивание фасции шеи



Рисунок 17. Ушивание кожи

3.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе I

Послеоперационный период у всех экспериментальных животных протекал в условиях вивария под динамическим наблюдением.

После хирургического вмешательства все животные получали медикаментозное лечение. Проводилась антибактериальная терапия для предупреждения инфекционных осложнений местного и системного характера, противовоспалительное лечение. Нестабильность свертывающей системы крови имела важное значение в интра- и послеоперационном периоде. С целью профилактики тромбоэмболических осложнений назначалась антикоагулянтная терапия. В схему послеоперационного ведения дополнительно включили противоязвенные препараты для предупреждения развития стрессовых язв. Ежедневно проводились перевязки с антисептическими растворами и мазями.

В течение всего эксперимента у каждой особи оценивались клинические данные и лабораторные показатели. Возможность контроля над этими факторами имела прогностическую ценность.

Так как экспериментальная работа проводилась на трахее, то, безусловно, в первую очередь оценивались изменения показателей функционирования дыхательной системы. В качестве критерия оценки проявлений дыхательной недостаточности выбрана частота дыхательных движений (ЧДД). Для объективной оценки ответной реакции организма на инвазивное вмешательство со стороны сердечно-сосудистой системы параметром изучения стала частота сердечных сокращений (ЧСС). Любое хирургическое вмешательство чревато как локальной, так и общей воспалительной реакцией организма. Показателем, характеризующим системный ответ организма на хирургическое вмешательство, стала температура тела (Т). Дополнительно для оценки генерализованного ответа животных в экспериментальных группах на инвазию изучена динамика

лабораторных показателей, если точнее, то преимущественно нас интересовали изменения уровня лейкоцитов в общем анализе крови.

ЧДД, ЧСС, Т определялись ежедневно у каждого объекта исследования с фиксированием параметров в дневниках наблюдения. Забор крови на общий анализ производили у лабораторных животных в контрольные точки, а именно, за сутки до операции и на первые, четырнадцатые, двадцатые сутки послеоперационного периода.

За сутки до оперативного вмешательства состояние кроликов расценивалось как удовлетворительное, а основные показатели функционирования жизненно-важных функций находились в пределах референсных значений.

У двух кроликов №2 и №4 группы I послеоперационный период осложнился развитием динамической кишечной непроходимости. В обоих случаях осложнение купировать не удалось, и это повлекло летальный исход на вторые и третьи сутки. Послеоперационный период у выживших животных №1, №3, №5-8 протекал в соответствии с объемом анестезиологического пособия и перенесенного оперативного вмешательства. По окончании периода наблюдения на двадцатые сутки после операции кролики выведены из эксперимента.

На основании зарегистрированных данных во всех экспериментальных группах для наглядности представлены графические изображения динамики ЧДД, зарегистрированной на этапе предоперационной подготовки и в послеоперационном периоде до момента выведения животных из эксперимента или же наступления летального исхода (рисунок 18).

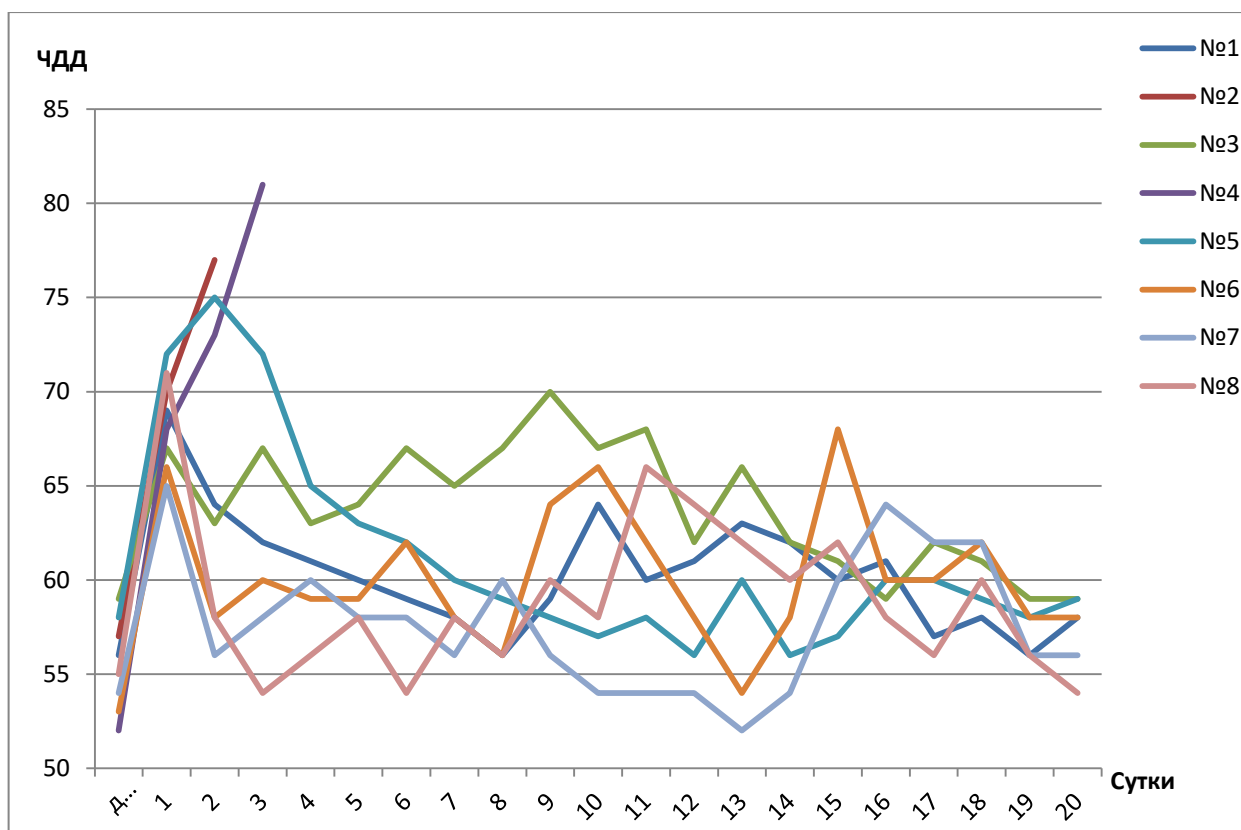


Рисунок 18. Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы I (№1-8)

Абсолютная хаотичность построения кривых с течением времени демонстрирует отсутствие пропорциональной зависимости между ЧДД и сутками динамического наблюдения. У животных группы I диапазон колебания ЧДД варьирует в интервале от 52 до 81 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $55,5 \pm 2,0$, а на двадцатые сутки - $57,3 \pm 1,5$. Максимальное отклонение от верхней границы нормы зарегистрировано у объекта №4 на третьи сутки и составило 35%. Невзирая на то, что эта особь погибла, связывать летальность с декомпенсацией дыхательной системы нецелесообразно, так как данное отклонение от нормы для кролика обратимо.

Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы I представлена на рисунке 19.

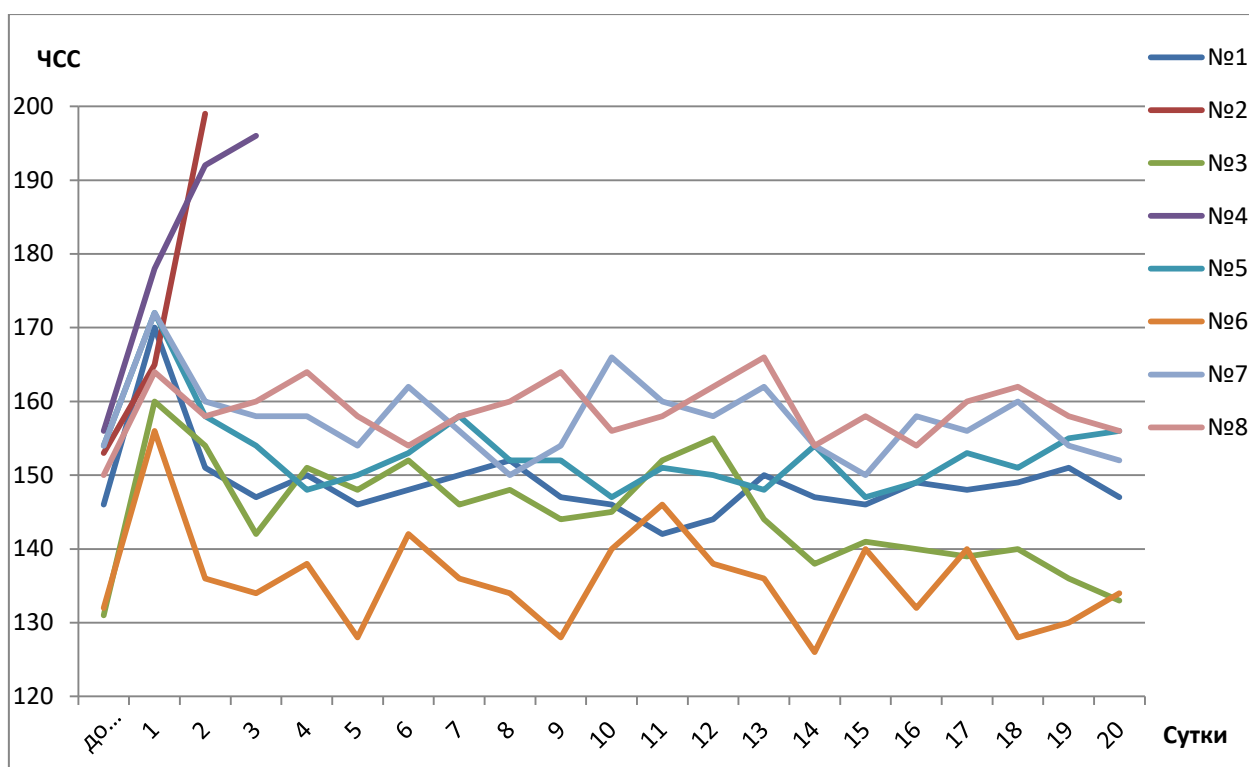


Рисунок 19. Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы I (№1-8)

У всех животных данной группы в первые сутки наблюдения отмечается тахикардия, вероятно, связанная со стрессовым фактором. Диапазон ЧСС в пределах группы колеблется от 52 до 81 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $147,0 \pm 8,0$, на двадцатые сутки - $146,3 \pm 8,5$. На графике динамики ЧСС в группе I привлекают внимание кривые зависимости ЧСС от суток наблюдения у особей №2 и №4. У данных объектов ЧСС превышает верхнюю границу нормы на 24,4% и 22,5% соответственно. Ранее уже описано, что оба кролика погибли в связи с осложнением. Поэтому в этих двух наблюдениях тахикардия обоснована компенсаторными механизмами организма. У остальных шести животных №1, №3, №5-8 группы I гемодинамически значимых отклонений ЧСС не отмечено.

Динамика температуры тела в группе I изображена на рисунке 20.

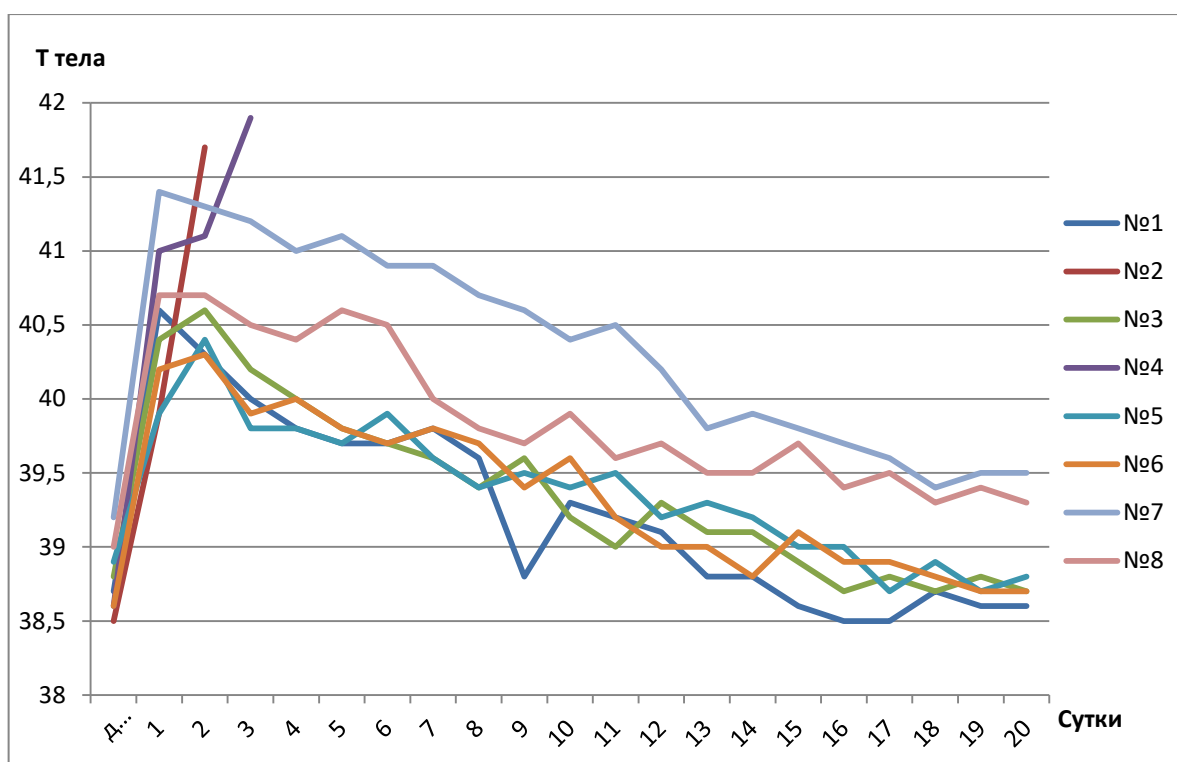


Рисунок 20. Динамика Т от начала до конца эксперимента у животных группы I (№1-8)

Клинический параметр варьирует в интервале от $38,5^{\circ}$ до $41,9^{\circ}\text{C}$. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили $38,7 \pm 0,18$, а на двадцатые сутки - $38,9 \pm 0,31$. У всех животных группы I повышение температуры тела зарегистрировано в первые послеоперационные сутки. У особей №2 и №4 рост температуры продолжился на протяжении последующих суток вплоть до наступления летального исхода на вторые и третьи сутки соответственно. Максимальное повышение температуры тела во всей группе до $41,9^{\circ}\text{C}$ зарегистрировано у особи №4 на третьи сутки. В случае с №1, №3, №5-8 температурные кривые являются убывающими и стремятся к нормальным значениям.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у особей группы I представлена на рисунке 21.

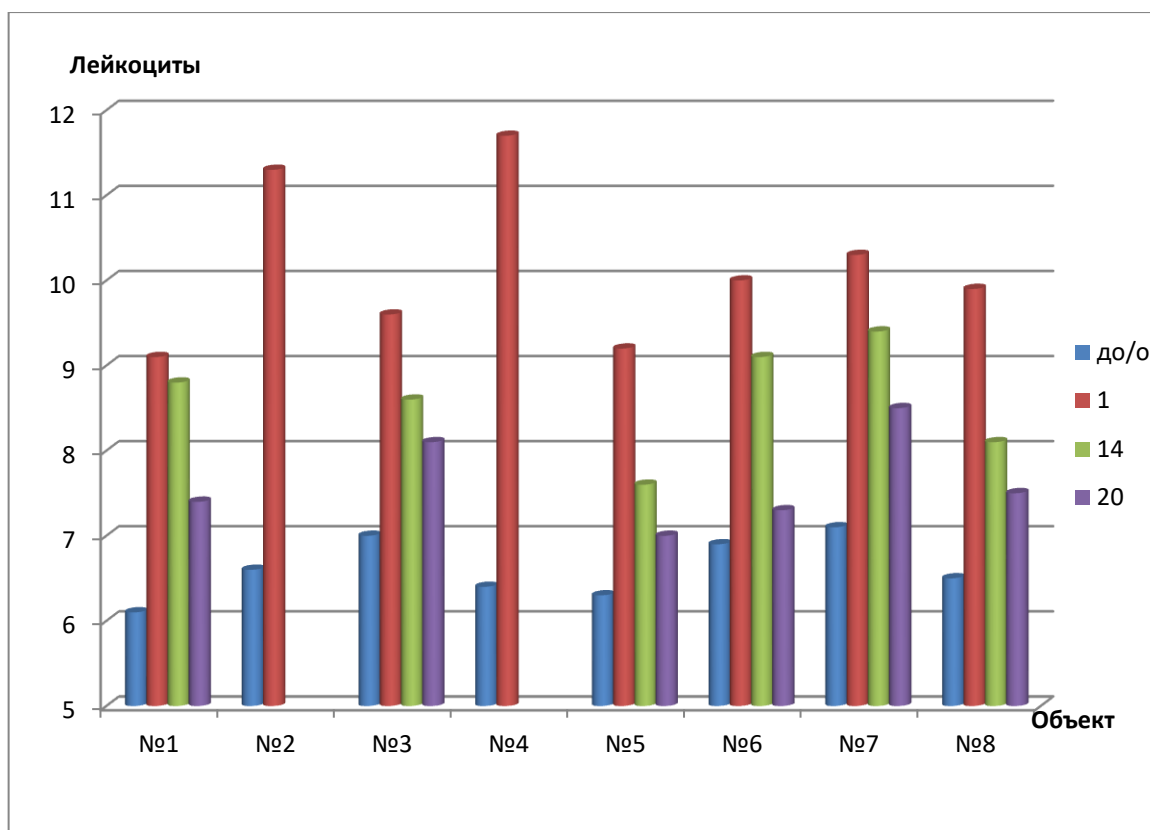


Рисунок 21. Динамика лейкоцитоза от начала до конца эксперимента у животных группы I (№1-8)

Данное изображение наглядно демонстрирует повышение уровня лейкоцитов у всех животных группы на первые сутки после оперативного вмешательства. Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили до операции $6,6 \pm 0,29$, а на двадцатые сутки - $7,6 \pm 0,44$. У всех выживших объектов исследования №1, №3, №5-8 наблюдается синхронный регресс лейкоцитоза к четырнадцатым суткам с продолженным снижением уровня лейкоцитов в общем анализе крови к двадцатым суткам наблюдения. Таким образом, лейкоцитарную реакцию в совокупности с повышением температуры тела следует воспринимать как защитную реакцию на нарушение целостности организма.

3.3. Гистологическое исследование в группе I

Трахеи изучены на макро- и микроскопическом уровне. В препаратах признаков стеноза, воспаления и нагноения нет. На протяжении участка реваскуляризации трахеи визуализируется пятно красного цвета, при микроскопии оказавшееся расширенными сосудами. В зоне реваскуляризации отмечен активный ангиогенез. Сосудов в этой области значительно больше, чем в интактной трахее. Все трахеи кроликов подверглись *in vivo* окрашиванию слабым раствором метиленового синего через сосуды в питающей ножке. Краситель распределился только в пределах сосудов фасциального лоскута, несмотря на гепаринизацию животного (рисунок 22, 23). Сосудистая ножка лоскута во всех случаях функционировала, артерии и вены были проходимы и полнокровны. Однако ни на одном гистологическом срезе не было найдено сосудов между хрящевыми кольцами. Полученные микропрепараты свидетельствовали о независимом от фасциального лоскута кровоснабжении подслизистого слоя трахеи (рисунок 24).



Рисунок 22. Группа I. Макропрепарат. Распределение красителя в пределах сосудов фасциального лоскута (вид наружной стенки трахеи)

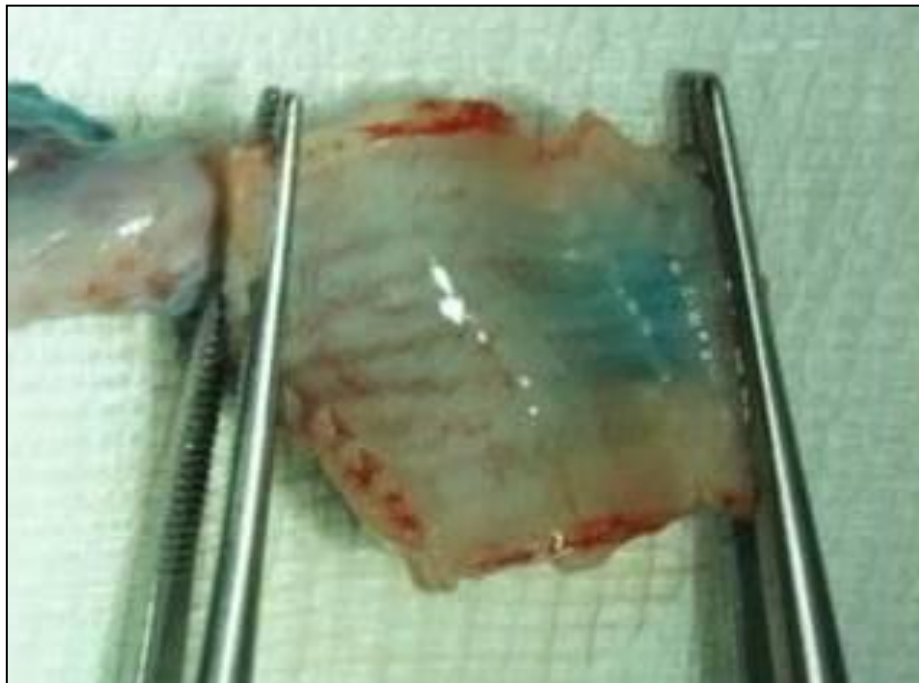


Рисунок 23. Группа I. Макропрепарат. Распределение красителя в пределах сосудов фасциального лоскута (вид внутренней стенки трахеи)

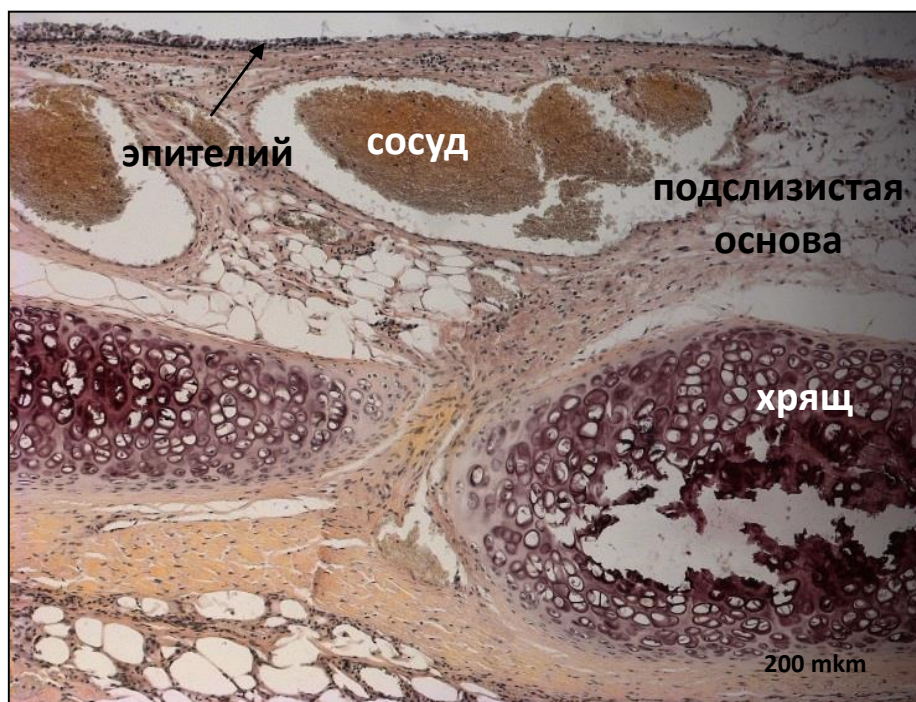


Рисунок 24. Группа I. Микропрепарат.
(Окраска гематоксилином и эозином)

Анализ полученных клинических данных, лабораторных результатов и гистологического исследования позволяет рассуждать о бесперспективности реваскуляризации в качестве дополнительного этапа операции, направленного на улучшение репаративных процессов слизистой и подслизистой трахеи. Отсутствие доказательной базы в рамках нашего эксперимента в отношении эффективности реваскуляризации исключает возможность двухэтапного подхода в реконструкции повреждений внутренней стенки трахеи.

ГЛАВА 4.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕФЕКТА СЛИЗИСТО-ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ

4.1. Разработка оптимального способа нанесения дефекта слизисто-подслизистой трахеи кроликов

При формировании патологии слизисто-подслизистой трахеи кроликов мы впервые столкнулись с проблемой адекватного повреждения нижних дыхательных путей. Сложность заключалась в отсутствии оптимальной модели нанесения дефекта.

Пластике эпителиальных дефектов трахеи посвящено ограниченное количество работ (Wenig V.L. et al., 1987; Hardillo J. et al., 2001.). При этом по вопросу реконструкции всей трахеи опубликовано достаточно трудов. Модели, основанные на замещении целого органа, не позволяют изучать процессы эпителизации, поскольку в них, как правило, отсутствуют элементы сосудистой системы и нормальный хрящевой каркас. Эпителизация трахеи в эксперименте изучалась у мелких лабораторных грызунов (крыс) и не сопровождалась жизнеугрожающими состояниями (Nomoto Y. et al., 2006). Апробация таких методов на более крупных объектах исследования сопровождалась серьезными осложнениями (Grillo H.C., 1970, 2002; Kanzaki M. et al., 2006).

Для создания дефектов эпителия гортани и трахеи в качестве механического повреждающего фактора предлагались к использованию эндоскопические инструменты (Charous S. J. et al., 1996). Такой подход не позволял стандартизировать глубину и размер повреждения.

В качестве еще одного альтернативного способа в литературе описан прямой инвазивный метод, который позволял оценить кровоснабжение раневого поля и точно определить размеры повреждения трахеи (Hardillo et al., 2001.). Такая модель применима для изучения регенерации и разработки

медикаментозных и оперативных методов стимуляции репаративных процессов. Все же от такого способа решено воздержаться из-за высокой травматичности.

В настоящем диссертационном исследовании формирование дефекта слизисто-подслизистого слоя трахеи первоначально производилось с помощью бранши анатомического пинцета. Методика оказалась недостаточно эффективной, так как не позволяла стандартизировать размеры и глубину раневой поверхности. Анализируя все предлагаемые варианты повреждения слизисто-подслизистой трахеи, экспериментальным путем мы пришли к мнению, что адекватным способом является хирургический с использованием офтальмологического скальпеля. Инструмент, предназначенный для оперативного вмешательства на органе, имеющем малые размеры, но сложное строение, отличался легкостью и небольшим размером. Такой метод нанесения повреждения позволял максимально выверить размеры планируемого дефекта слизисто-подслизистой трахеи.

Определившись с наиболее рациональным методом нанесения повреждения нижних дыхательных путей, мы приступили к одному из ключевых моментов эксперимента – формированию дефекта слизистой и подслизистой трахеи.

Поскольку размеры окружности трахеи у кроликов переменны, то одной из главных задач стало определение параметров дефекта с учетом баланса между размерами, при которых повреждение способно к самовосстановлению и размерами, при которых без лечения возникли бы необратимые последствия, повлекшие летальный исход. Так мы приступили к поиску критических размеров раневого поля слизисто-подслизистой трахеи. В зависимости от отношения ширины предполагаемого дефекта к размерам окружности трахеи было принято решение выделить две группы лабораторных животных. В одной из них ширина повреждения слизисто-подслизистой составляла менее половины окружности трахеи, а в другой – половина окружности и более.

4.2. Нанесение дефекта трахеи менее 50% ее окружности

В соответствии с планируемой хирургической техникой создана группа II «Нанесение дефекта трахеи <50% ее окружности», в которую включили восемь животных (n=8).

4.2.1. Ход оперативного вмешательства в группе II

На передней поверхности шеи по средней линии производили разрез длиной 5 см. Доступ к трахее и мобилизация органа выполнялись аналогично с группой I. Дефект формировали на передне-боковой стенке трахеи. Такая локализация повреждения выбрана не случайно. Во-первых, потому что данная зона является достаточно мобильной по сравнению с задней стенкой трахеи. Во-вторых, так как трахея кролика обладает небольшими размерами по сравнению с трахеей более крупного животного (свиньи) и человека, то обеспечить доступ к ее задней стенке технически было бы сложнее для создания дефекта и уж тем более выполнения реконструктивного вмешательства. В-третьих, проецируя проблему в реальную практическую медицину, гораздо чаще встречаются дефекты передней и боковой стенки трахеи, нежели задней. К тому же массивные повреждения задней стенки трахеи часто бывают не совместимы с жизнью.

На передне-боковой стенке трахеи формировали «окно», вскрывая поперечно все слои. Размеры «окна» варьировали в соответствии с предполагаемым объемом деэпителизации (рисунок 25). В границах «окна», наносили дефект с вовлечением слизистой и подслизистой трахеи (рисунок 26).

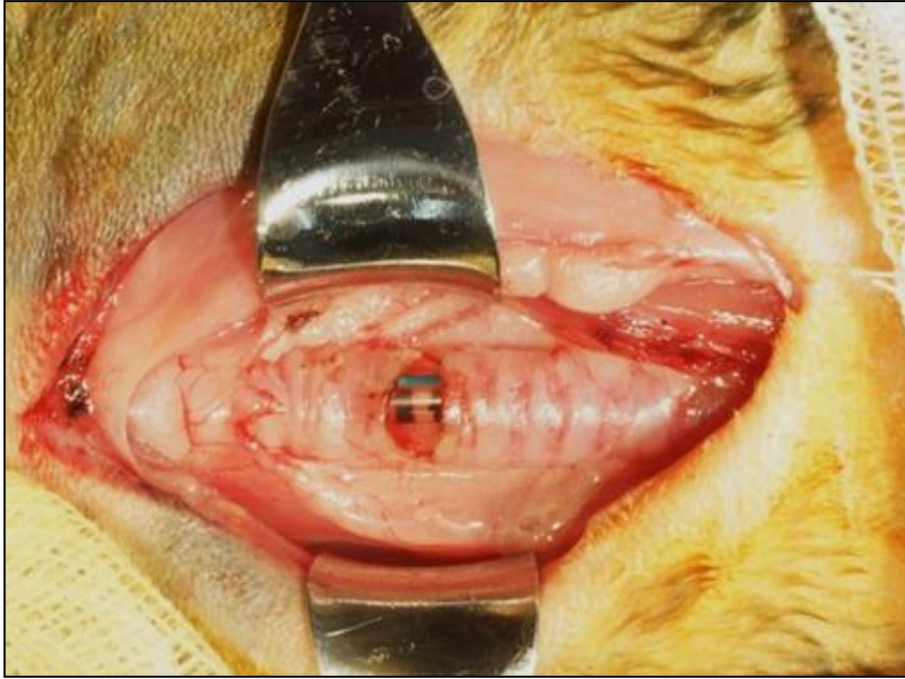


Рисунок 25. Формирование «окна» трахеи



Рисунок 26. Нанесение дефекта слизисто-подслизистой трахеи

Размеры формируемой раневой поверхности рассчитывалась индивидуально для каждой особи. В процентном соотношении ширина дефекта составила у всех объектов этой лабораторной группы менее 50% окружности трахеи. Если быть точнее, то у №1-15%, №2-20%, №3-25%, №4-30%, №5-35%, №6-40%, №7-45%, №8-49%. Ширина повреждения слизисто-подслизистой трахеи варьировала от 10 до 14 мм. Длина поражения оставалась константной и составляла 15 мм. Схематически представлен поперечный срез трахеи с зоной дефекта у всех восьми особей группы II (рисунок 27).

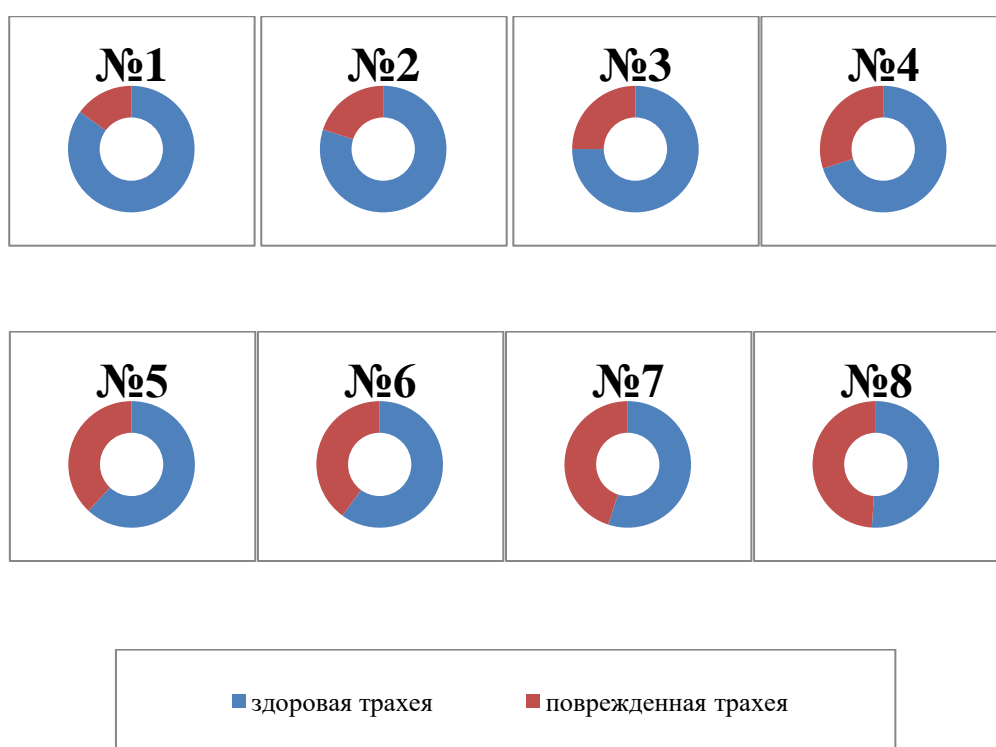


Рисунок 27. Дефекты трахеи у особей в группе II

Гемостаз обеспечивался без помощи электрокоагулятора. Трахею ушивали узловыми П-образными швами с использованием полипропиленового монофиламентного шовного материала 7/0 (рисунок 28). Выполнялись тщательный гемостаз и промывание раны. Послойно ушивались все мягкие ткани и накладывалась стерильная повязка. Описанная техника нанесения дефекта трахеи представлена схематически (рисунок 29).



Рисунок 28. Ушивание дефекта трахеи узловыми П-образными швами

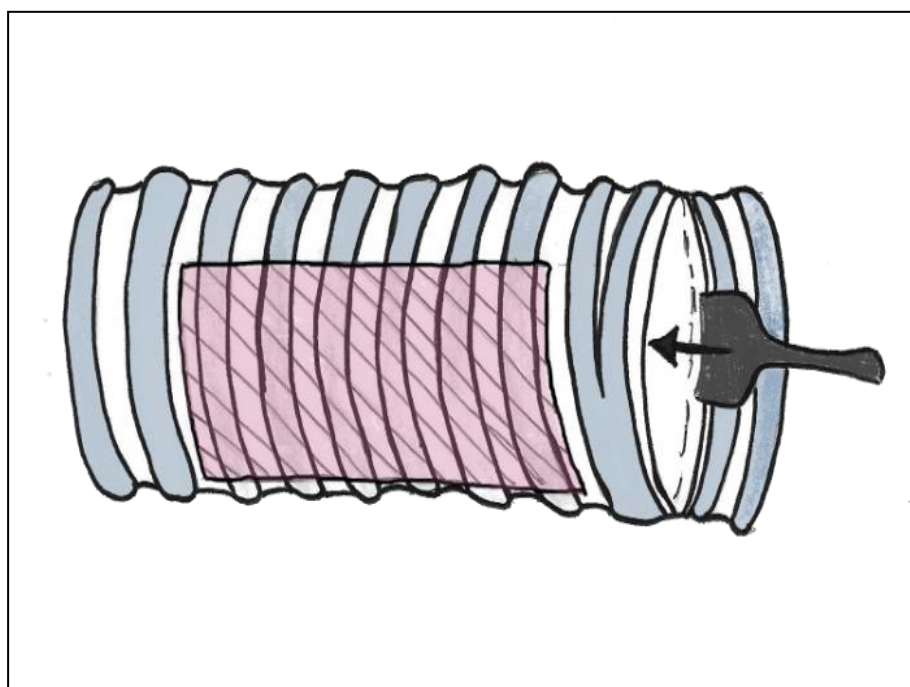


Рисунок 29. Схема нанесения дефекта слизистой-подслизистой трахеи в рамках сформированного «окна» на ее передне-боковой стенке

4.2.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе II

Течение послеоперационного периода у всех особей группы II соответствовало объему перенесенного анестезиологического пособия и оперативного вмешательства. Послеоперационная летальность не зарегистрирована. Никаких жизнеугрожающих осложнений не наблюдалось. Животные №1-8 находилась под наблюдением в течение двадцати суток после хирургического вмешательства. Кроликам в срок выполнена эвтаназия в связи с окончанием периода наблюдения.

Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы II представлена на рисунке 30.

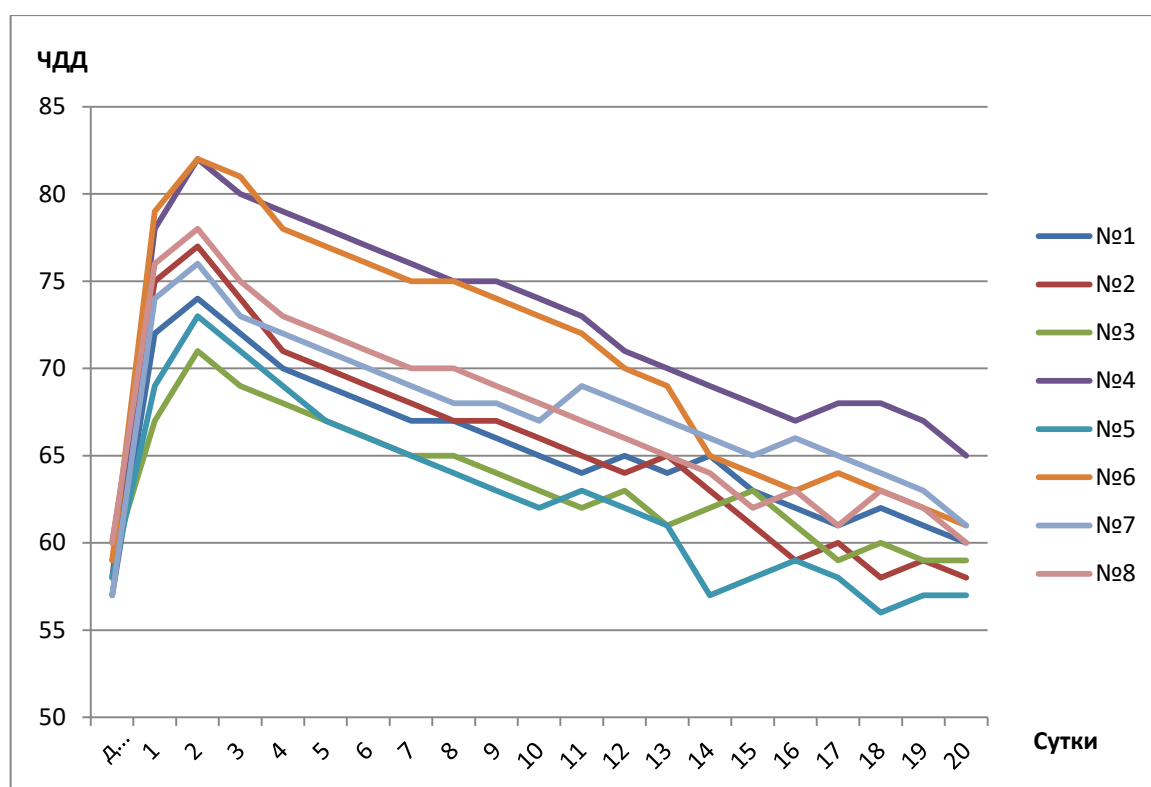


Рисунок 30. Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы II (№1-8)

У животных группы II диапазон колебания ЧДД варьирует в интервале от 57 до 82 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и

стандартная ошибка средней арифметической составляли $58,5 \pm 1,0$, а на двадцатые сутки - $60,1 \pm 1,6$. Максимальное отклонение от верхней границы нормы на 36,7% зарегистрировано у объектов №4 и №6. Наиболее высокие показатели ЧДД по сравнению с исходными данными в предоперационном периоде у всех животных группы зафиксированы преимущественно в первые три дня после операции. Далее к седьмому дню эксперимента отмечается снижение ЧДД ниже 70 в минуту.

Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы II представлена на рисунке 31.

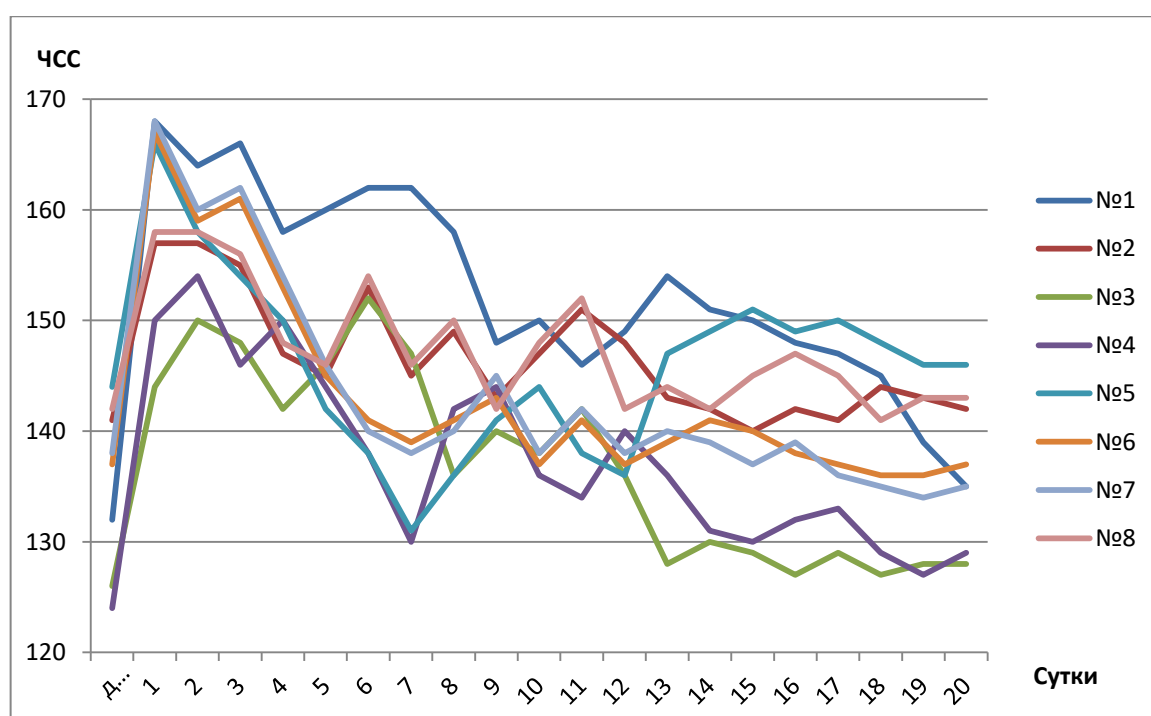


Рисунок 31. Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы II (№1-8)

Диапазон ЧСС в группе II варьирует от 120 до 168 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $135,5 \pm 6,1$, на двадцатые сутки - $136,8 \pm 5,1$. Тахикардия в послеоперационном периоде постепенно регрессировала и уже

на второй неделе эксперимента находилась в диапазоне референсных значений.

Динамика температуры тела от начала до конца эксперимента у животных группы II представлена на рисунке 32.

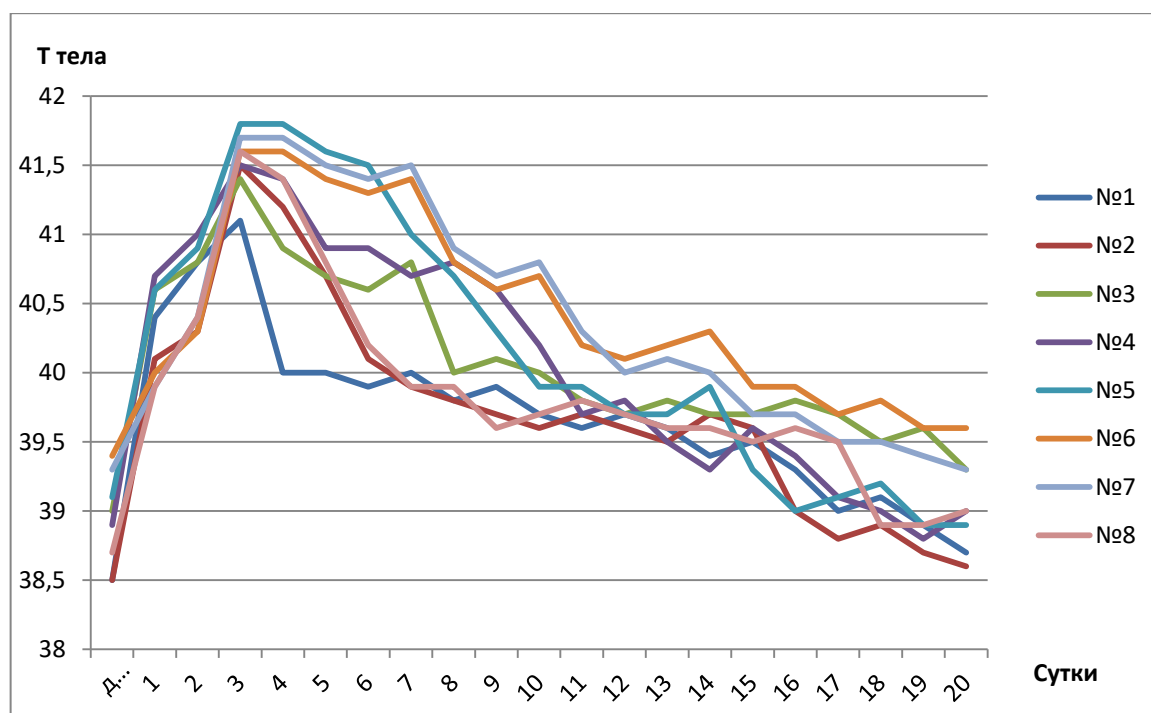


Рисунок 32. Динамика T от начала до конца эксперимента у животных группы II (№1-8)

Температура тела находилась в диапазоне от $38,5^{\circ}$ до $41,9^{\circ}\text{C}$. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили $38,9 \pm 0,27$, а на двадцатые сутки - $39,0 \pm 0,26$. Максимальная точка температурной кривой у всех кроликов зафиксирована на третьей сетки послеоперационного периода. Затем отмечено синхронное снижение температуры тела.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у особей группы II представлена на рисунке 33.

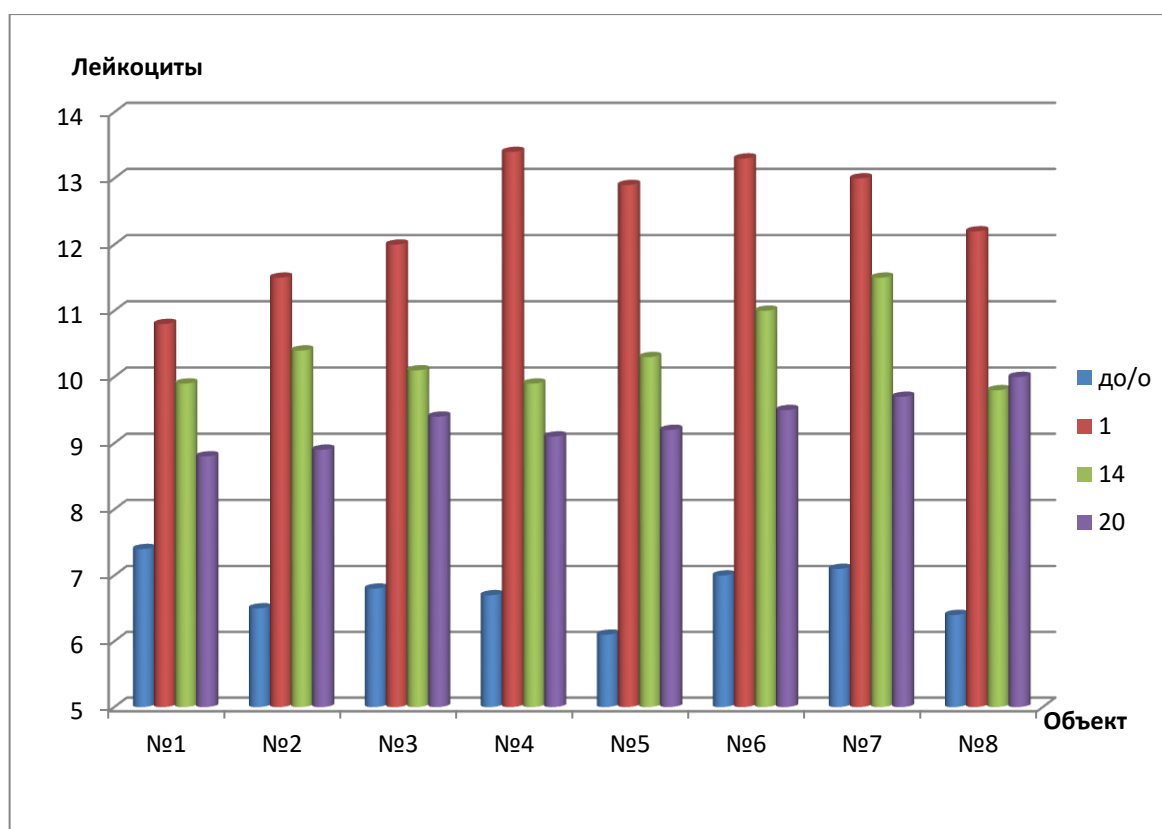


Рисунок 33. Динамика лейкоцитоза от начала до конца эксперимента у животных группы II (№1-8)

У всех особей изображен рост количества лейкоцитов в первые послеоперационные сутки. Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили до операции $6,6 \pm 0,29$, а на двадцатые сутки - $7,6 \pm 0,44$. Нивелирование воспалительных явлений уже к четырнадцатым суткам эксперимента позволяет судить об эффективных компенсаторных механизмах, направленных на заживление дефекта стенки трахеи размерами менее 50% ее окружности.

4.2.3. Гистологическое исследование в группе II

При осмотре макропрепаратов отмечается незначительное сужение трахеи, визуализируется красное сосудистое пятно. Признаков нагноения не обнаружено (рисунок 34). В области дефекта отмечается вновь

сформированный слой подслизистой основы и истонченного трахеального эпителия (рисунок 35).



Рисунок 34. Группа II. Макропрепарат. Незначительное сужение трахеи на месте нанесенного дефекта

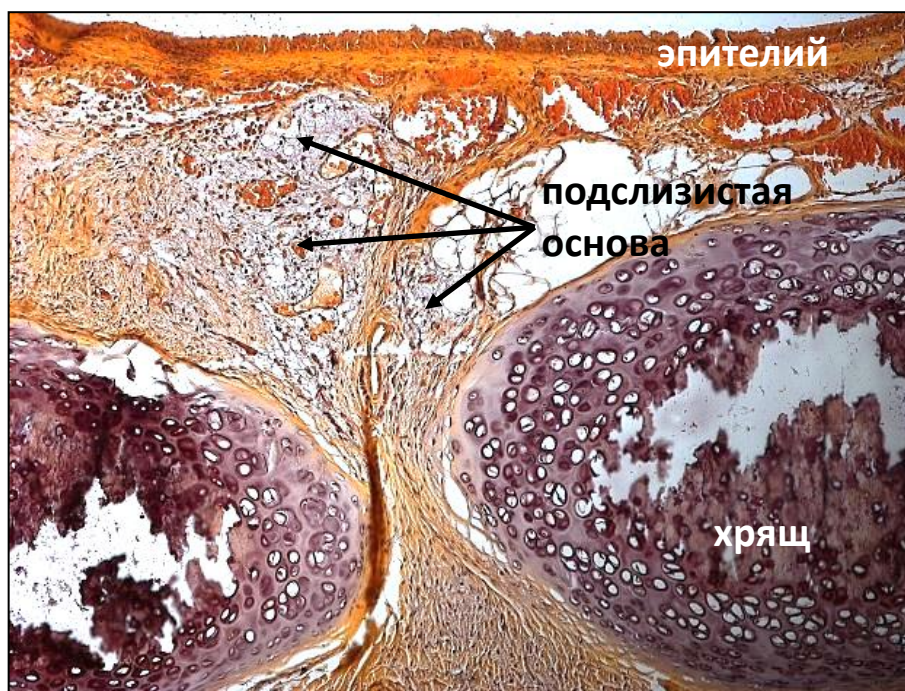


Рисунок 35. Группа II. Микропрепарат
(Окраска гематоксилином и эозином)

Все восемь животных группы II продемонстрировали одинаковую клиническую картину. На двадцатые сутки после операции кролики живы и полностью адаптированы. Исследование в данной группе остановлено, так как стало очевидно, что размеры дефекта, смоделированного в этой группе, не являются критическими. Животные выведены из эксперимента. Отсутствие летальности позволило судить о способности трахеи к самовосстановлению при размерах повреждения менее половины ее окружности. Формирование дефекта слизисто-подслизистой трахеи размерами, не превышающими половину окружности, нецелесообразно для апробации нового метода реконструкции, так как заживление возможно без каких либо дополнительных методов лечения.

4.3. Нанесение дефекта трахеи от 50% ее окружности и более

В ходе работы по моделированию критического дефекта создана группа III «Нанесение дефекта трахеи $\geq 50\%$ ее окружности», в которую включили восемь животных (n=8).

4.3.1. Ход оперативного вмешательства в группе III

Методика создания дефекта в группе III аналогична той, что была воспроизведена ранее в группе II. Различие этих двух групп заключалось только в размерах наносимого повреждения трахеи. Ширина дефекта слизисто-подслизистой трахеи у кроликов группы III составила 50% и более, точнее у №1-50%, №2-55%, №3-60%, №4-65%, №5-70%, №6-75%, №7-80%, №8-90%. Длина дефекта оставалась прежней - 15мм. Схематически представлен поперечный срез трахеи в зоне дефекта у всех особей группы III (рисунок 36).

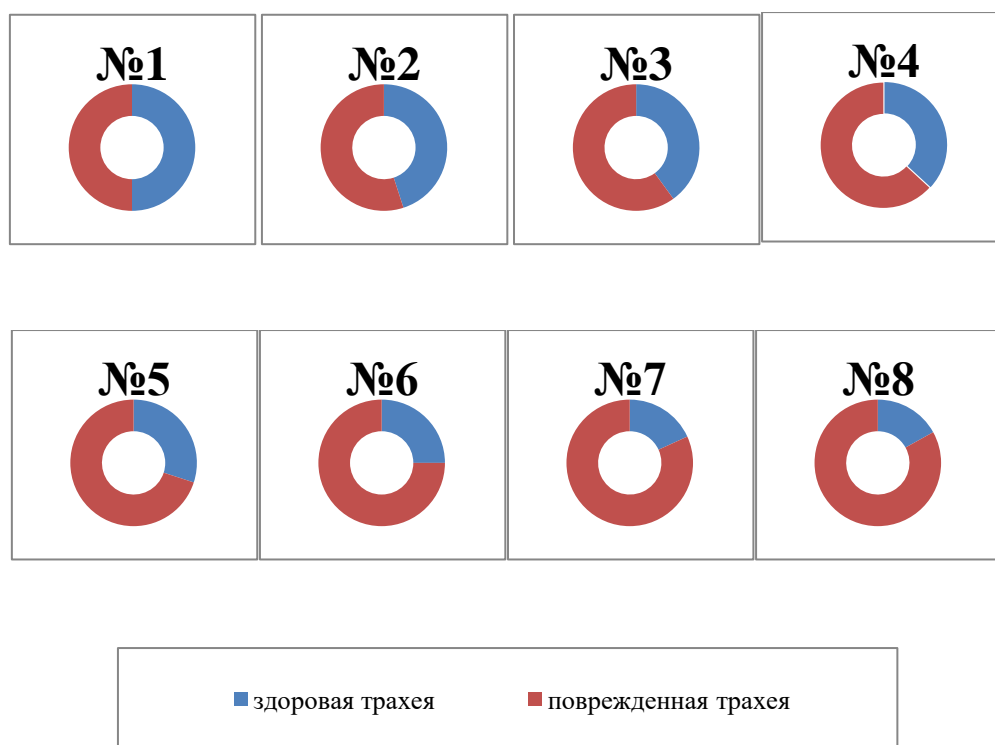


Рисунок 36. Дефекты трахеи у особей в группе III

4.3.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе III

Послеоперационный период у всех кроликов осложнился развитием острой дыхательной недостаточности. Зарегистрирована 100% гибель животных. Чем больше были размеры созданного дефекта, тем ранее наступила летальность. Объекты №5-8 находились под наблюдением в течение трех суток после хирургического вмешательства. Диагностирована смерть кроликов в связи с аспирацией большого количества экссудата, образованного в зоне повреждения трахеи. У кроликов №1-4 послеоперационный период так же осложнился развитием острой дыхательной недостаточности, но на одни сутки позже. Их смерть, вызванная асфиксией, диагностирована на четвертые сутки после операции.

Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы III представлена на рисунке 37.

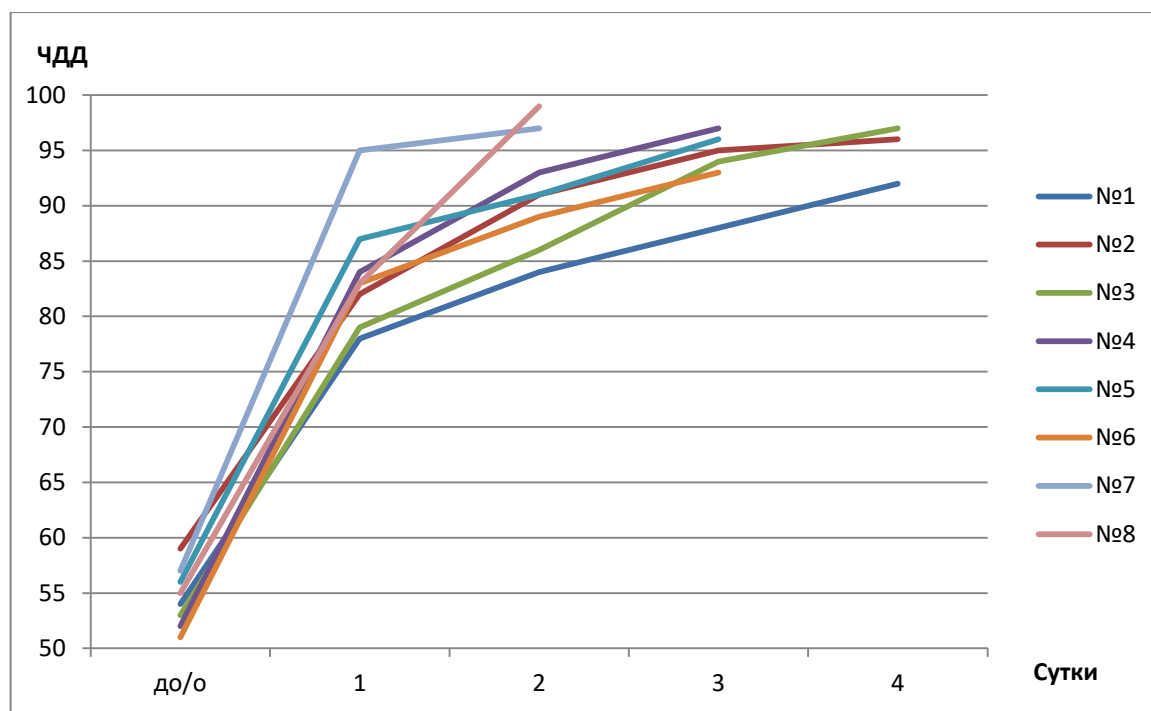


Рисунок 37. Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы III (№1-8)

Интервал ЧДД от 51 до 99 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $54,6 \pm 2,1$, на третьи сутки - $93,8 \pm 2,2$, на четвертые сутки - $95,0 \pm 2,0$. Графики являются возрастающими по оси абсцисс, что доказывает прогрессирование явлений дыхательной недостаточности с течением суток. Кривые №1-4 являются более пологими и характеризуются несколько меньшим ростом одышки по сравнению с №5-8. Однако во всех восьми случаях чрезвычайные отклонения ЧДД от нормальных первоначальных значений составили у №1-70,4%, №2-62,7%, №3-83,0%, №4-86,5%, №5-71,4%, №6-82,4%, №7-70,2%, №8-80,0%.

Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы III представлена на рисунке 38.

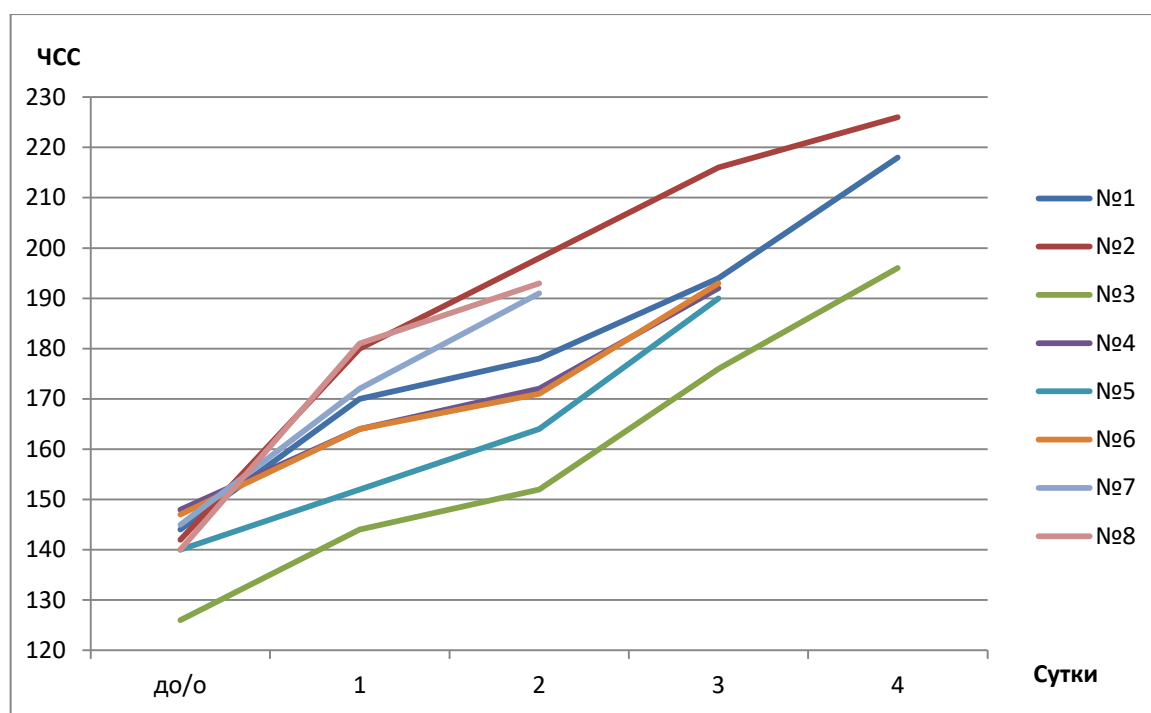


Рисунок 38. Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных III группы (№1-8)

ЧСС колеблется от 126 до 226 в минуту. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $141,5 \pm 4,6$, на третьи сутки - $193,5 \pm 7,6$, на четвертые сутки - $213,3 \pm 11,5$. График иллюстрирует линейное нарастание тахикардии у всех животных в группе III с максимальным показателем ЧСС до 226 в минуту у кролика №2 в сравнении с исходным параметром 142 в минуту в дооперационном периоде. Остальные семь кроликов демонстрируют аналогичную картину.

Динамика температуры тела от начала до конца эксперимента у животных группы III представлена на рисунке 39.

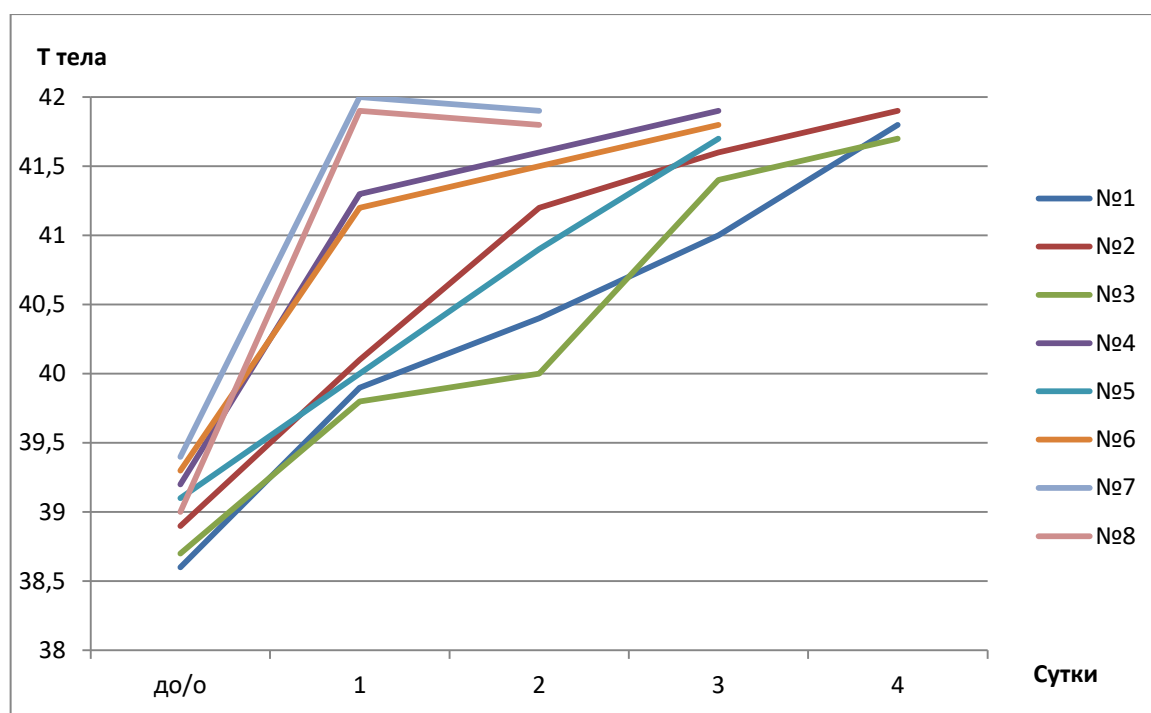


Рисунок 39. Динамика Т от начала до конца эксперимента у животных группы III (№1-8)

Температурная кривая у всех объектов наблюдения является возрастающей с течением суток и достигает максимального предела к последним суткам пребывания животных в эксперименте. Температура тела расположена в интервале от 38,6°С до 41,9°С. За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили $39,0 \pm 0,22$, на третьей сутки - $41,5 \pm 0,24$, на четвертые сутки - $41,8 \pm 0,06$.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у особей группы III представлена на рисунке 40.

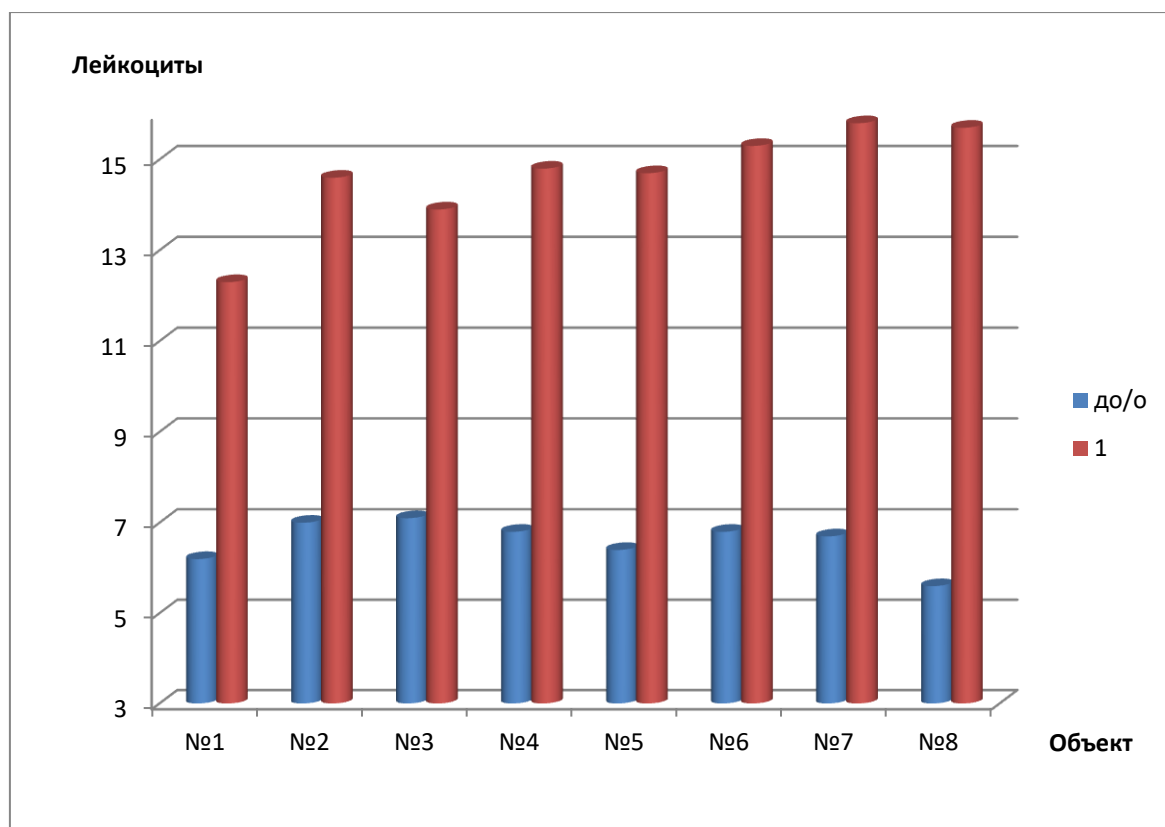


Рисунок 40. Динамика лейкоцитоза от начала до конца эксперимента у животных группы III (№1-8)

Диаграмма визуализирует резкий сдвиг лейкоцитов влево в первые послеоперационные сутки. Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составили до операции $6,7 \pm 0,24$, а в первые сутки после операции - $14,6 \pm 0,77$. Рост уровня лейкоцитов в первые сутки по сравнению с показателем в предоперационном периоде составил у объектов №1-98,4%, №2-108,6%, №3-95,8%, №4-117,6%, №5-129,7%, №6-125%, №7-135,8%, №8-180,4%. Вероятно, максимальная воспалительная реакция у особи №8 обусловлена наибольшими размерами повреждения трахеи.

4.3.3. Гистологическое исследование в группе III

При аутопсии у всех кроликов в этой группе трахеи были стенозированы. Вскрытие показало, что место дефекта слизистой оболочки было отечным, а просвет трахеи и крупных бронхов был почти полностью

закупорен большим количеством густой слизи (рисунок 41). В тканях в области дефекта содержалось большое количество детрита, состоящего из воспалительного инфильтрата и эритроцитов. Не было признаков реэпителизации или образования подслизистой оболочки, что свидетельствовало о невозможности заживления дефекта (рисунок 42).

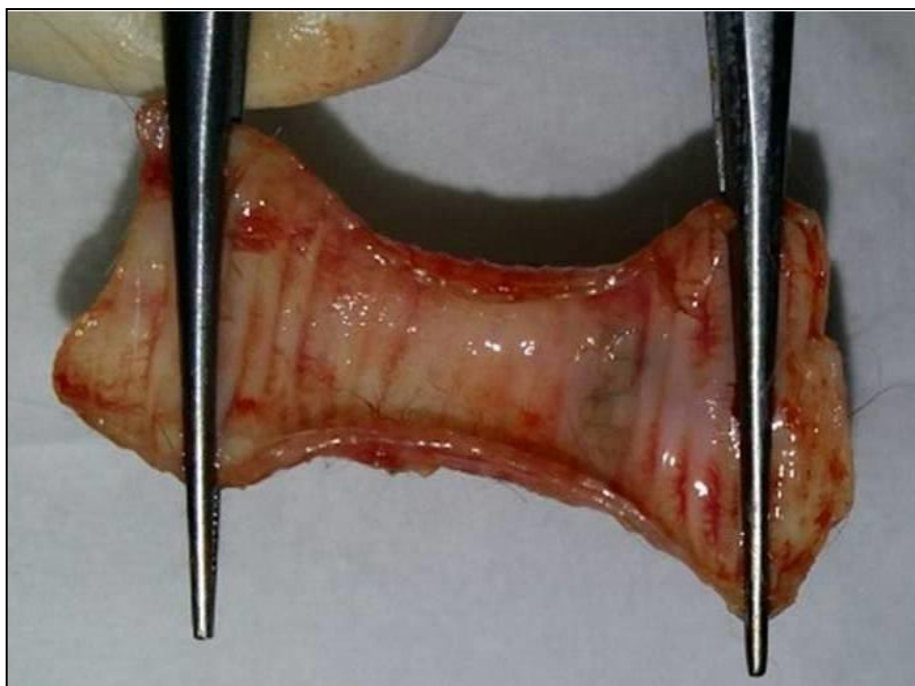


Рисунок 41. Группа III. Макропрепарат. Выраженное сужение трахеи на месте нанесенного дефекта



Рисунок 42. Группа III. Микропрепарат
(Окраска гематоксилином и эозином)

Послеоперационная летальность в группе III составила 100%. Смертельный исход наступил в результате аспирации большим количеством экссудата, продуцированного в зоне повреждения. Следует, что смоделированный в данной группе дефект слизисто-подслизистого слоя трахеи является критическим и не способен к самозаживлению. Эта группа стала контрольной, а размеры дефекта длиной 15 мм и шириной пятьдесят и более процентов окружности трахеи признаны оптимальными для апробации реконструктивно-пластических методов лечения.

4.4. Нанесение критического дефекта на предварительно реваскуляризованную трахею (двухэтапный подход)

Предполагая минимальные шансы на успех двухэтапного подхода, в основу которого положена реваскуляризация трахеи с последующим воспроизведением дефекта слизисто-подслизистой более 50% окружности трахеи, по гуманным соображениям оперативное вмешательство выполнено

только одному животному ($n=1$). Столь малая выборка, ограниченная единичным наблюдением, и отказ от формирования группы обусловлены результатами исследований в группе I, где эффективность реваскуляризации в регенеративных способностях слизистого-подслизистой трахеи не доказана.

4.4.1. Ход оперативного вмешательства у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода

В этом наблюдении предполагался двухэтапный поход, включающий на первом этапе реваскуляризацию трахеи, на втором создание дефекта на предварительно реваскуляризованном участке трахеи.

Реваскуляризация выполнена по ранее описанной методике в группе I, а через две недели был выполнен второй этап – нанесение критического повреждения слизисто-подслизистой трахеи на реваскуляризованном участке. Способ создания дефекта был аналогичен группе III, ставшей контрольной. Ширина раневой поверхности составила 75% окружности трахеи, длина 15мм.

4.4.2. Клиническое течение послеоперационного периода у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода

После первого этапа реваскуляризации трахеи послеоперационный период протекал без особенностей. Динамика клинических и лабораторных показателей соответствовала ранее наблюдаемой в группе I. После второго этапа, связанного с нанесением дефекта, симптоматика в послеоперационном периоде ничем не отличалась от увиденной ранее картины острой дыхательной недостаточности у кроликов группы III, погибших от критического дефекта. Особь №1 находилась под наблюдением всего двое суток после хирургического вмешательства. Летальность на вторые сутки эксперимента, вызванная аспирацией большого количества экссудата образовавшегося в зоне дефекта, подтверждает гипотезу о

бесперспективности оперативной техники, основанной на реваскуляризации трахеи с критическим дефектом.

Динамика ЧДД от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1 представлена на рисунке 43.

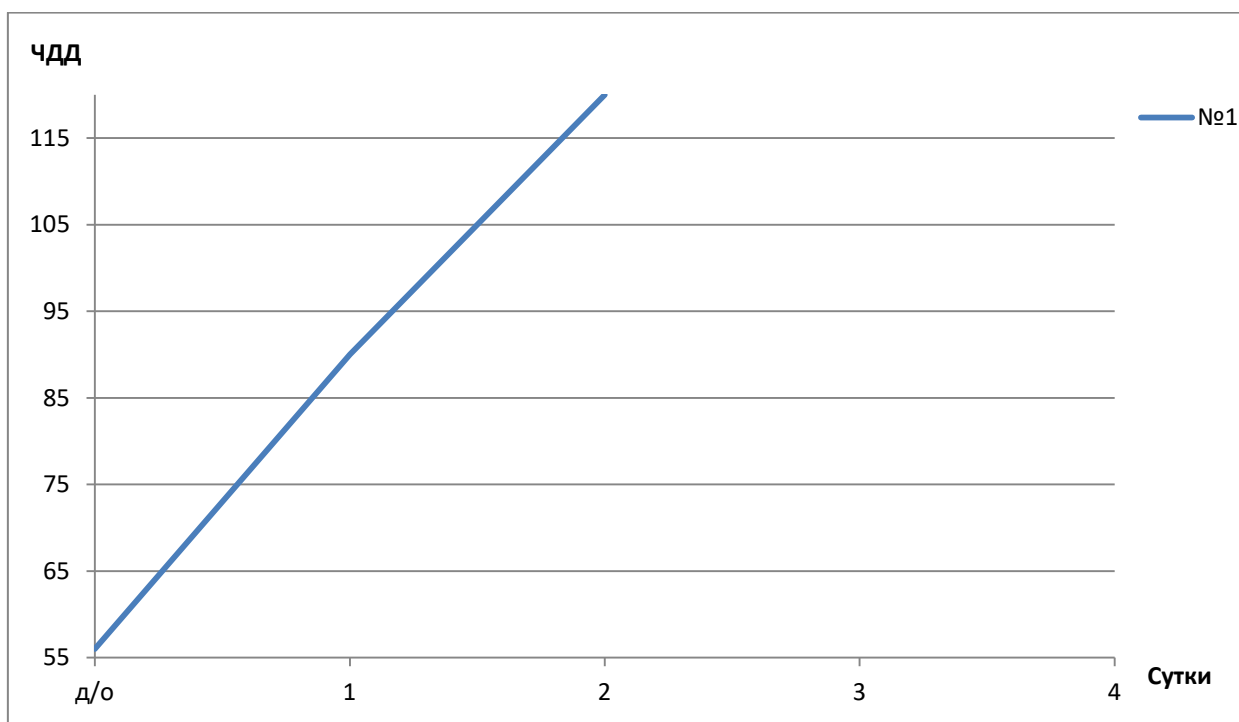


Рисунок 43. Динамика ЧДД от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1

График отражает прямо пропорциональную зависимость прогрессирования дыхательной недостаточности с течением времени. На первые сутки после операции ЧДД увеличилась на 60,7% от исходной величины, на вторые - на 114,3%.

Динамика ЧСС от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1 представлена на рисунке 44.

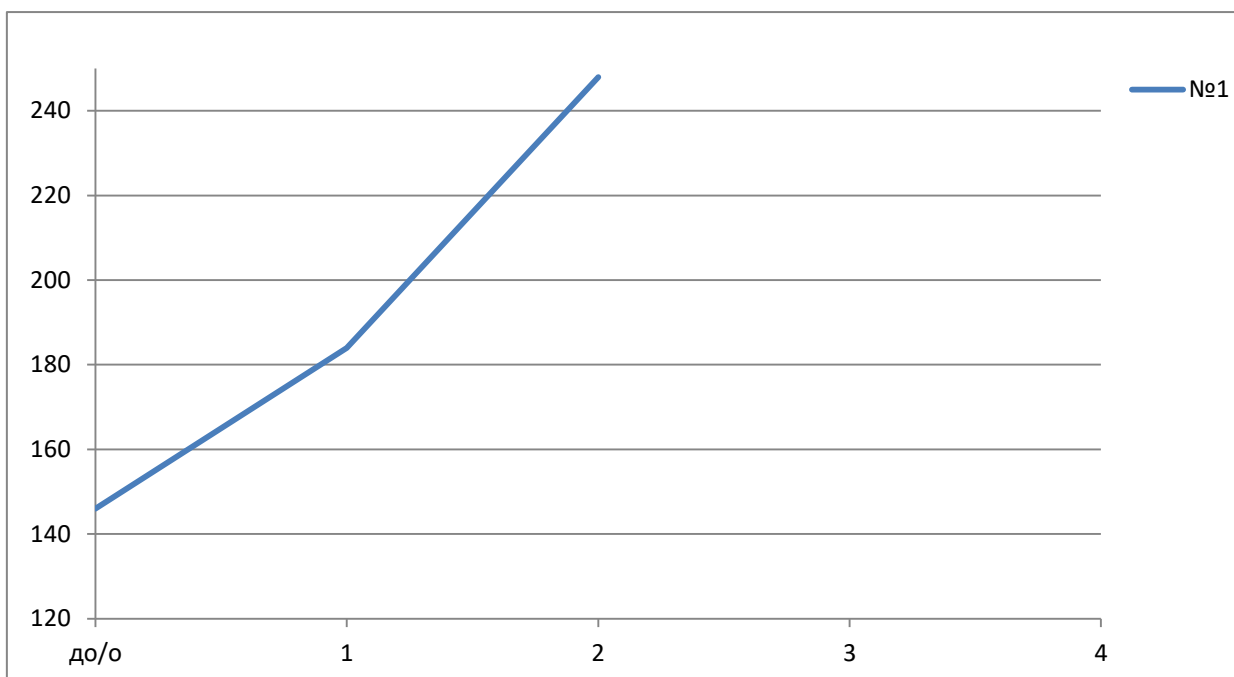


Рисунок 44. Динамика ЧСС от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1

Кривая изменения ЧСС у единственного объекта в данной группе демонстрирует развитие тахикардии с увеличением ЧСС на 69,9% от исходного уровня.

Динамика температуры тела от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1 представлена на рисунке 45.

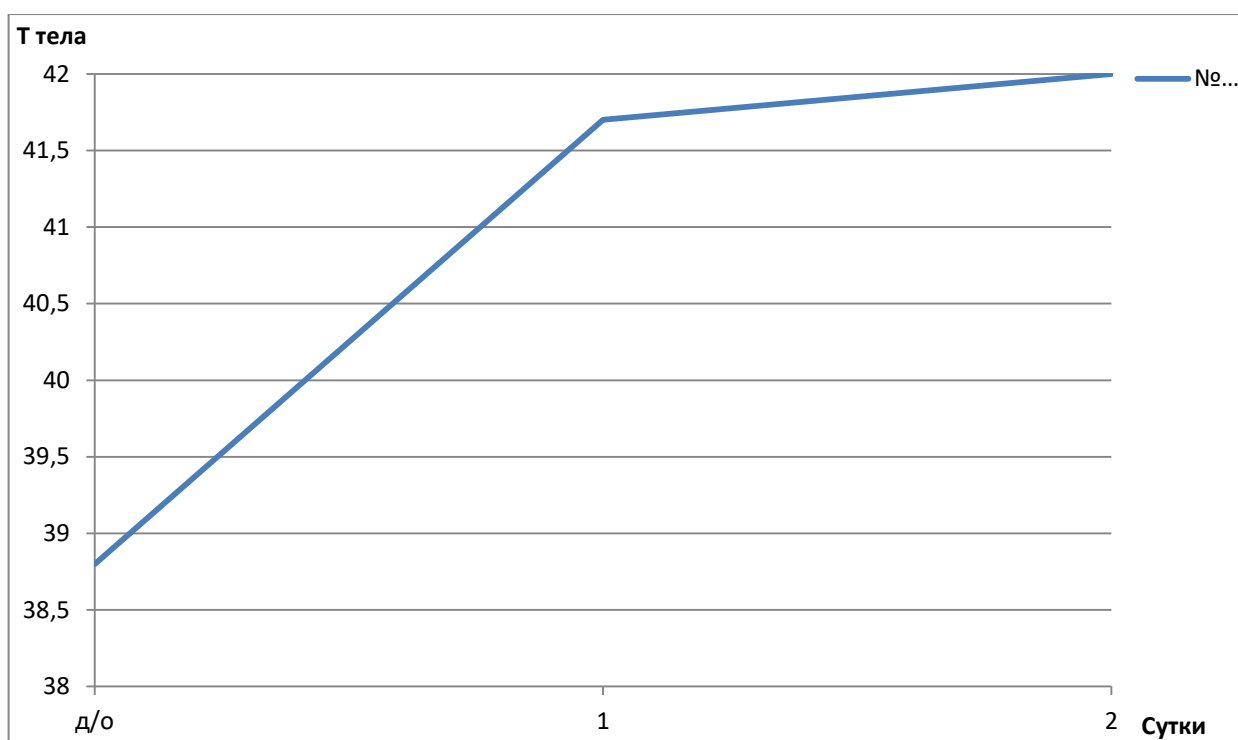


Рисунок 45. Динамика T от момента нанесения дефекта на предварительно реваскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1

В случае с одним единственным объектом наблюдения температура тела возрастает с $38,8^{\circ}\text{C}$ до 42°C , что соответствует картине острого воспалительного процесса.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у животного №1 представлена на рисунке 46.

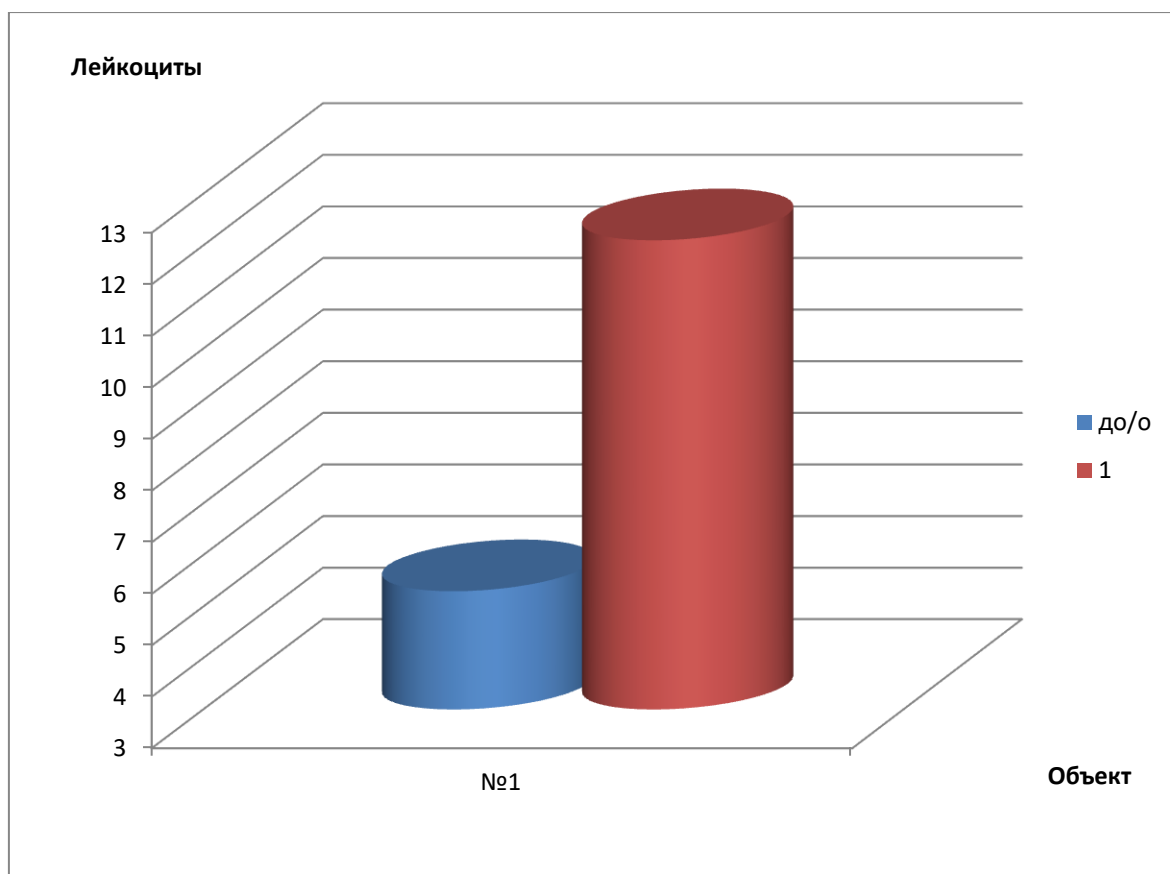


Рисунок 46. Динамика лейкоцитоза от момента нанесения дефекта на предварительно ревааскуляризованный участок трахеи до конца эксперимента у животного №1

Диаграмма наглядно показывает рост количества лейкоцитов в общем анализе крови в 2,28 раза на первые сутки после оперативного вмешательства в объеме нанесения критического дефекта трахеи.

4.4.3. Гистологическое исследование у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода

Картина вскрытия ничем не отличалась от увиденной ранее у кроликов, которые погибли от критического дефекта. Визуализировалось большое количество густой слизи в трахее и нескольких крупных бронхах. Помимо отека в области самой раны отмечался отек и слизистой вокруг нее. На

препарате видна гематома. На месте раны масса воспалительного инфильтрата с эритроцитами (рисунок 47).

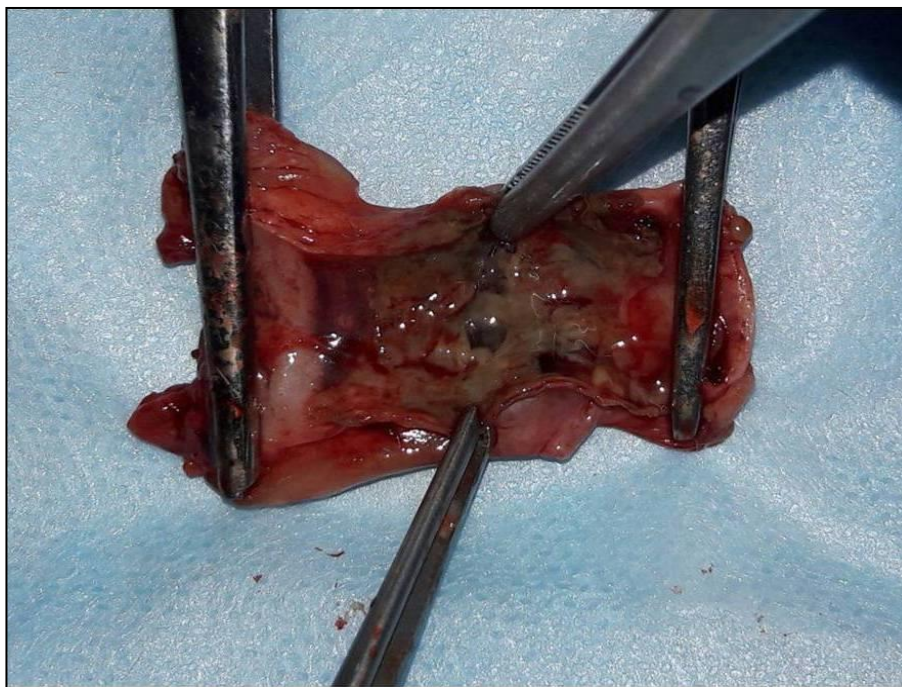


Рисунок 47. Макропрепарат.

Большое количество густой слизи в просвете трахеи

Заручившись результатами предыдущих наблюдений, картина исхода у особи была для нас практически предсказуема. Сделан вывод, что реваскуляризация на заживление критического дефекта трахеи не оказывает положительного влияния и поэтому не имеет перспектив в реконструктивно-восстановительных операциях по замещению дефектов слизистой и подслизистой нижних дыхательных путей.

ГЛАВА 5.

РЕКОНСТРУКЦИЯ КРИТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА СЛИЗИСТО-ПОДСЛИЗИСТОЙ ТРАХЕИ КРОЛИКОВ

После того, как мы определились с размерами критического дефекта слизисто-подслизистой трахеи и выделили контрольную группу, дальнейшая часть эксперимента была направлена на поиски и апробацию нового метода реконструкции раневой поверхности трахеи.

Для замещения дефекта трахеи был предложен биоинженерный субстрат. Клеточно-инженерная конструкция разработана на базе НИЦ «Курчатовский институт». В основе КИК лежит биоразлагаемый синтетический скаффолд на основе хитозана и коллагена, заселенный клетками слизисто-подслизистого слоя, предварительно взятыми из носовой полости подлежащих исследованию кроликов.

5.1. Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной шовным материалом

В соответствии с типом хирургического вмешательства сформирована одноименная группа IV «Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной шовным материалом» (n=8).

5.1.1. Ход оперативного вмешательства в группе IV

Подобно контрольной группе у всех животных группы IV был создан критический дефект слизистой и подслизистой трахеи (рисунок 48). Остановка кровотечения производилась коллагеновой гемостатической губкой. Электрокоагуляция не применялась на данном этапе. На дефект укладывали КИК (рисунок 49).



Рисунок 48. Формирование критического дефекта
слизисто-подслизистой трахеи

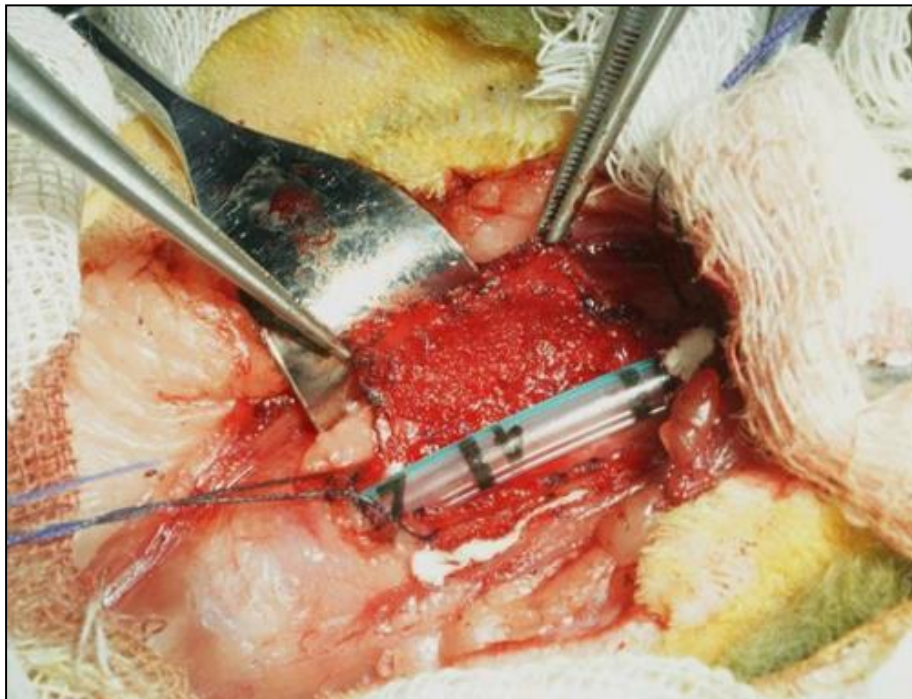


Рисунок 49. Размещение КИК в зоне дефекта

Трахею выше и ниже «окна» закрывали плотными марлевыми тампонами, смоченными физиологическим раствором, чтобы обеспечить постоянство искусственной вентиляции легких и не допустить аспирации.

Матрикс фиксировали по краю дефекта узловыми швами к слизистой оболочке и подлежащим хрящам. В качестве шовного материала применялся Prolene 8/0. При смещении или резорбции КИК найти границы ее фиксации можно было благодаря синему цвету нерассасывающегося монофиламента.

Область фиксации осторожно промывали, проверяли гемостаз, убирали марлевые тампоны и закрывали трахеальное «окно» узловыми швами с использованием Prolene 6/0 (рисунок 50). Послойно ушивали мягкие ткани и накладывали стерильную повязку.

Экстубацию осуществляли с большой осторожностью, чтобы не повредить закрепленный матрикс.

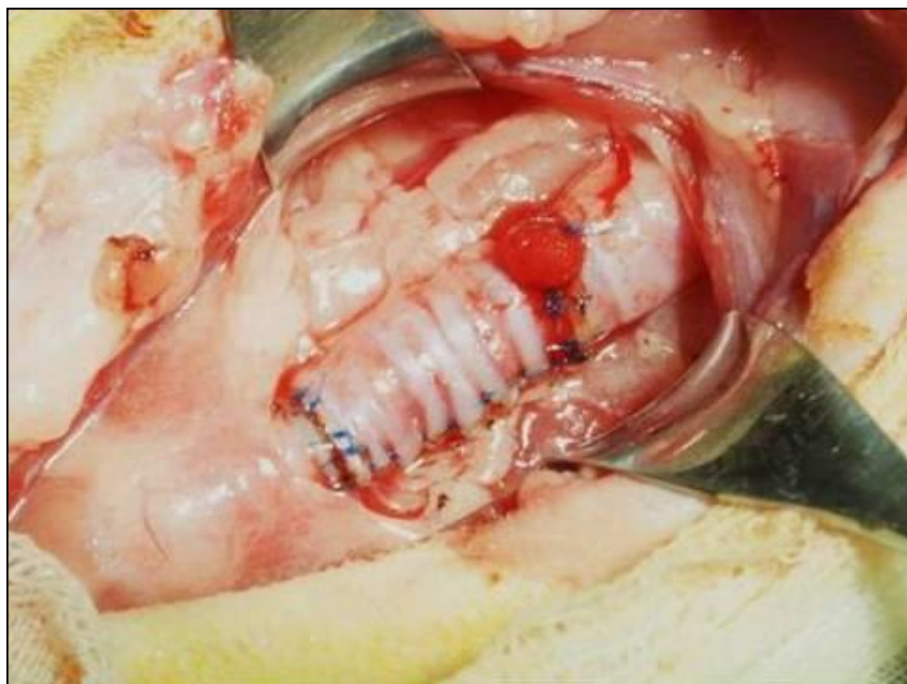


Рисунок 50. Матрикс фиксирован на месте дефекта трахеи. Трахеальное «окно» закрыто узловыми швами

Описанная техника пластики дефекта слизистой-подслизистой трахеи при помощи КИК, фиксированной в просвете органа шовным материалом представлена схематически (рисунок 51).

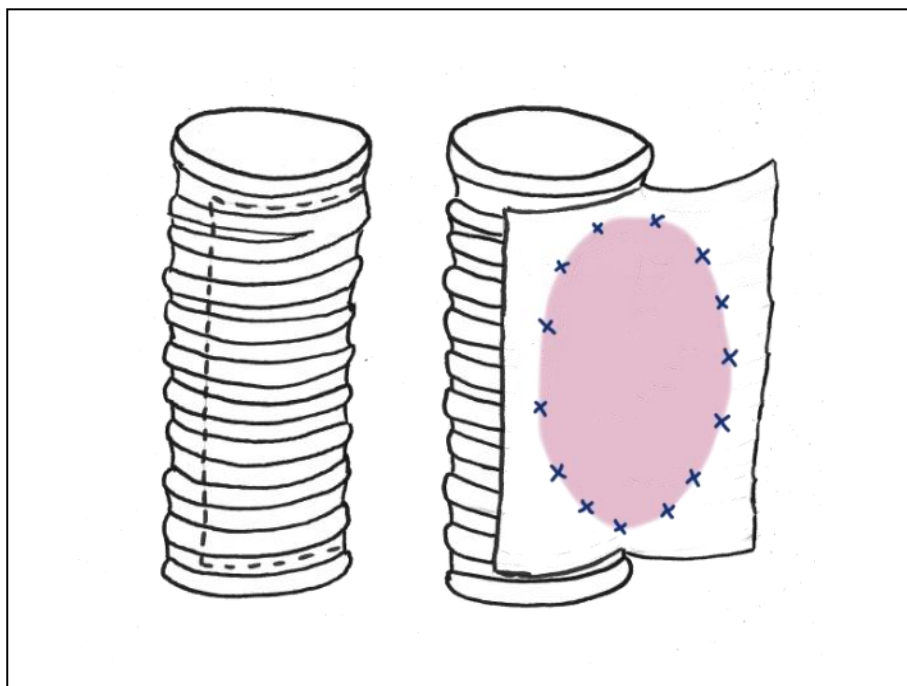


Рисунок 51. Пластика дефекта трахеи КИК, фиксированной шовным материалом

5.1.2. Клиническое течение послеоперационного периода в группе IV

Летальность в группе составила 25%. У кроликов №3-4 послеоперационный период осложнился развитием острой дыхательной недостаточности. Обе особи находились под наблюдением в течение только первых суток после хирургического вмешательства. Гибель животных наступила в результате асфиксии, вызванной миграцией КИК в просвет трахеи. Послеоперационный период у выживших шести кроликов соответствовал объему перенесенного оперативного вмешательства и анестезиологического пособия. На двадцатые сутки после операции объектам исследования в запланированный срок выполнена эвтаназия в связи с окончанием периода наблюдения.

Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы IV представлена на рисунке 52.

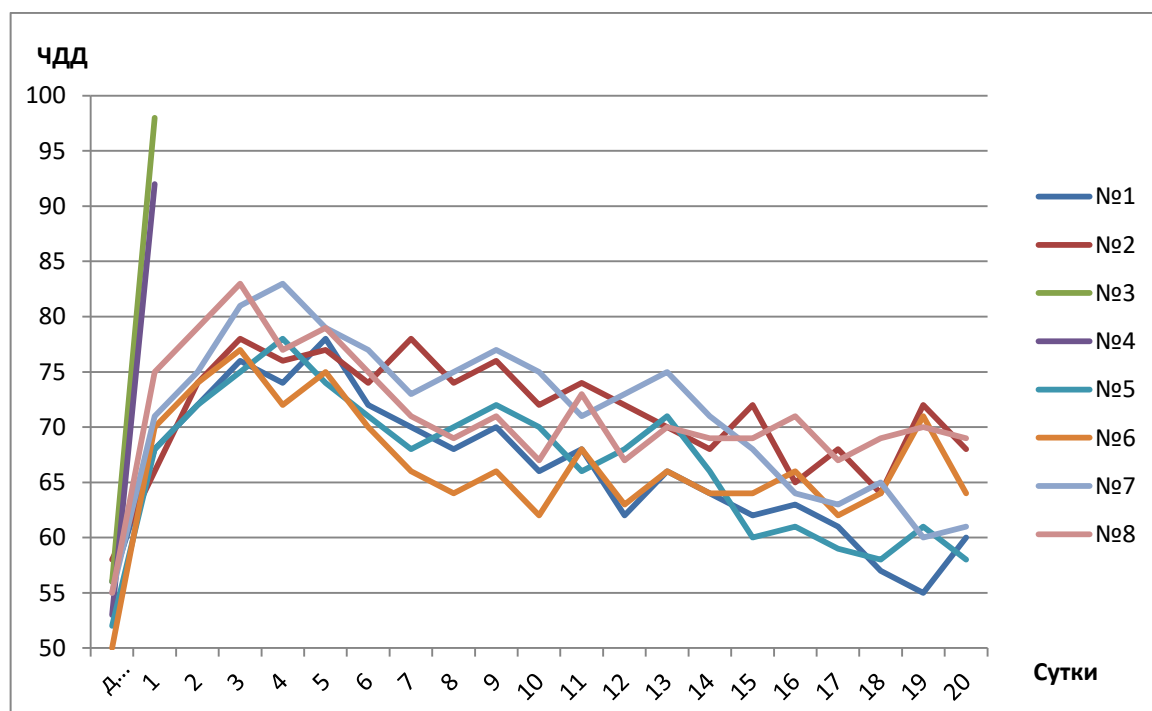


Рисунок 52. Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы IV (№1-8)

За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической ЧДД составляли $54,3 \pm 2,0$, на двадцатые сутки - $63,3 \pm 3,6$. Графически кривые №2 и №4 отличаются резко возрастающей амплитудой ЧДД и прерыванием в раннем послеоперационном периоде. В остальных шести случаях №1-2, №5-8 кривые имеют одинаковую тенденцию. В первые несколько суток ЧДД возрастает, а к моменту выведения животных из эксперимента начинает снижаться. Однако одышка у всех выживших объектов наблюдения продолжает сохраняться на протяжении всего исследования.

Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы IV представлена на рисунке 53.

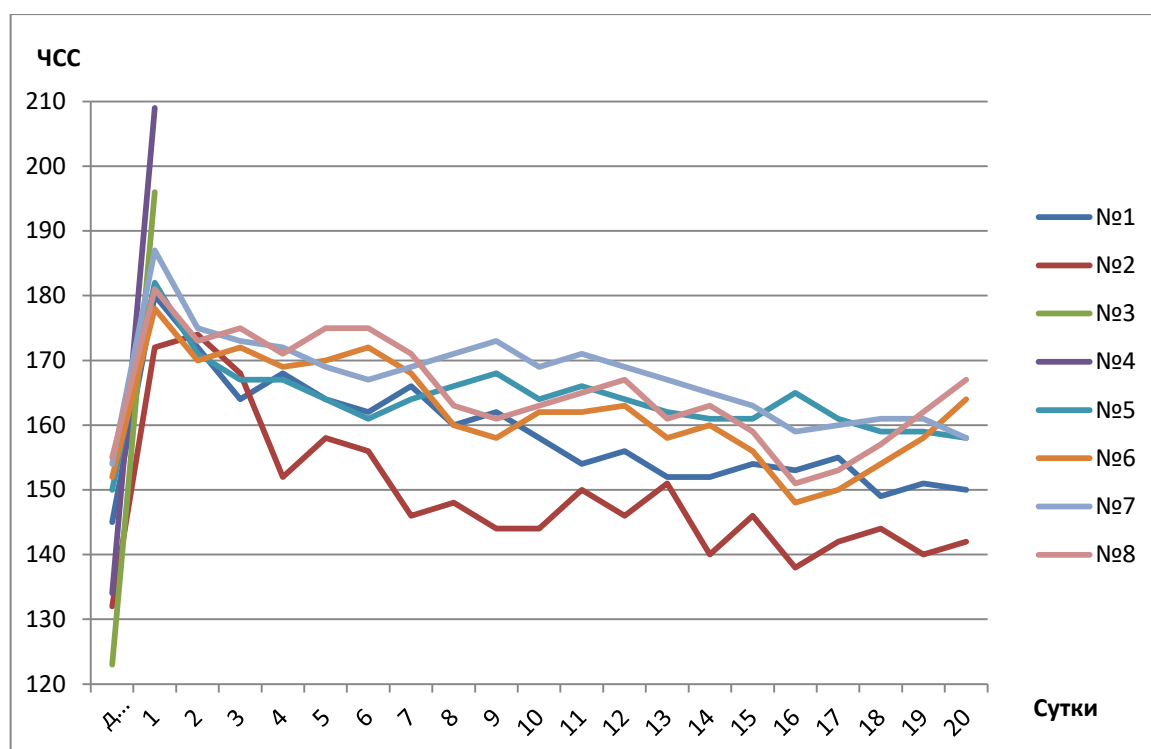


Рисунок 53. Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы IV (№1-8)

Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли до операции $143,1 \pm 10,1$, на двадцатые сутки - $156,5 \pm 7,0$. Выделяются кривые №3 и №4 со стремительно нарастающей тахикардией. В остальных шести случаях №1-2, №5-8 резкий подъем кривых преимущественно в первые сутки после оперативного вмешательства с течением времени обретает нисходящую тенденцию, но урежения ЧСС до исходного уровня так и не достигнуто на протяжении всего исследования.

Динамика температуры тела от начала до конца эксперимента у животных IV группы представлена на рисунке 54.

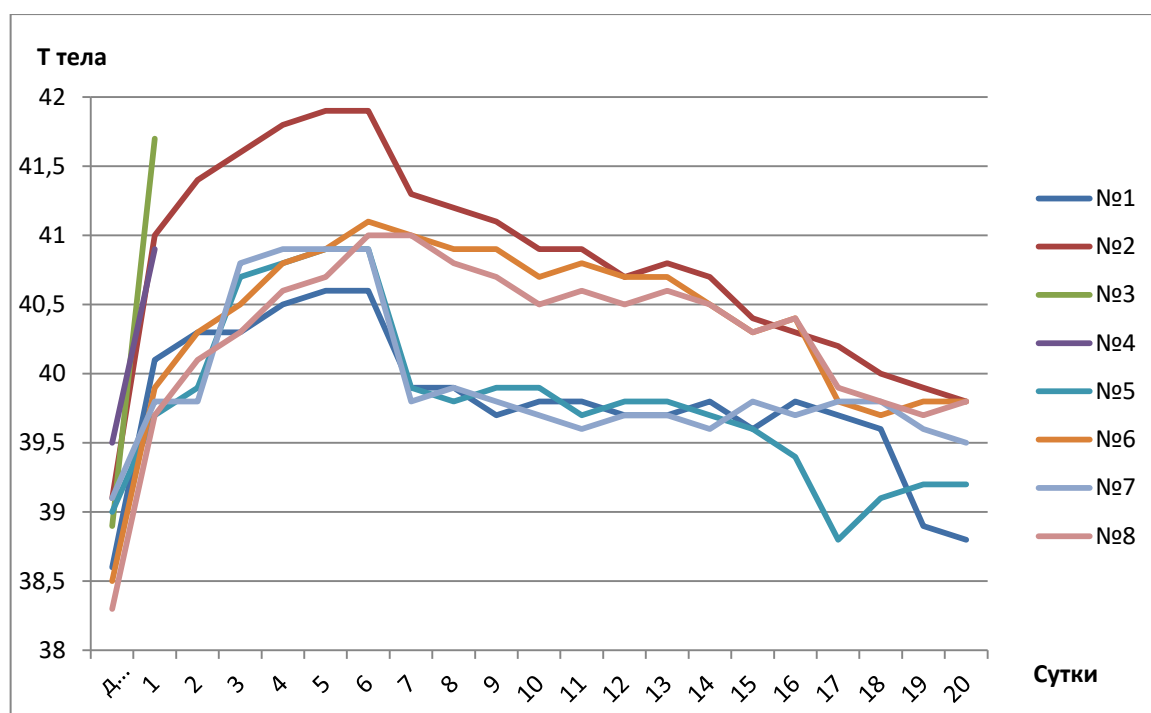


Рисунок 54. Динамика T от начала до конца эксперимента у животных группы IV (№1-8)

За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической температурной реакции составляли $38,8 \pm 0,3$ на двадцатые - $39,5 \pm 0,32$. В группе IV отмечено уверенное нарастание гипертермии в первую неделю эксперимента, а затем постепенный регресс. Однако температура тела на двадцатые финальные сутки эксперимента не только превосходит исходные параметры, фиксированные в дооперационном периоде, но и превышают верхние границы нормы. В случае с животными №3 и №4 полноценный анализ не представляется возможным в связи с ранней послеоперационной летальностью. Отмечено, что в первые сутки послеоперационного периода температура тела у №3 и №4 возросла на 3,3% и 7,2% соответственно.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у особей группы IV представлена на рисунке 55.

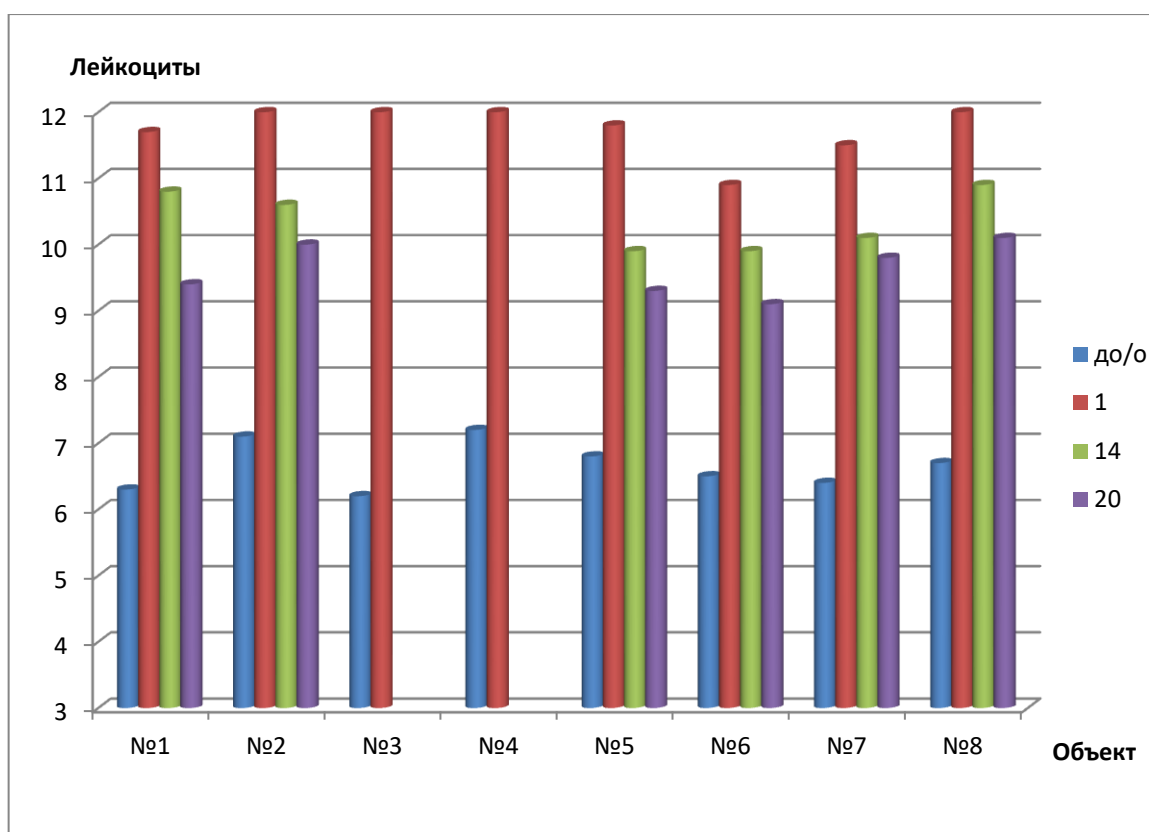


Рисунок 55. Динамика лейкоцитоза от начала до конца эксперимента у животных группы IV (№1-8)

Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической уровня лейкоцитов в крови составили до операции $6,6 \pm 0,3$, на двадцатые сутки - $9,6 \pm 0,35$. Показательна динамика лейкоцитарной реакции у выживших кроликов №1-2, №5-8. На двадцатые сутки наблюдается снижение уровня лейкоцитов относительно контрольной точки в первые сутки после операции. Все же динамика снижения лейкоцитоза к завершению эксперимента в этой группе довольно слабая.

5.1.3. Гистологическое исследование в группе IV

У кроликов, погибших на первые сутки после операции, на вскрытии обнаружен отек легких и дыхательных путей на всем протяжении.

У выживших особей при вскрытии трахея незначительно сужена, имеется умеренное количество слизи, просвет ее не обтурирован. Матрикс

уменьшился в размере, приобрел белый цвет. Пространство между матриксом и хрящами трахеи заполнено геморрагическим экссудатом (рисунок 56).

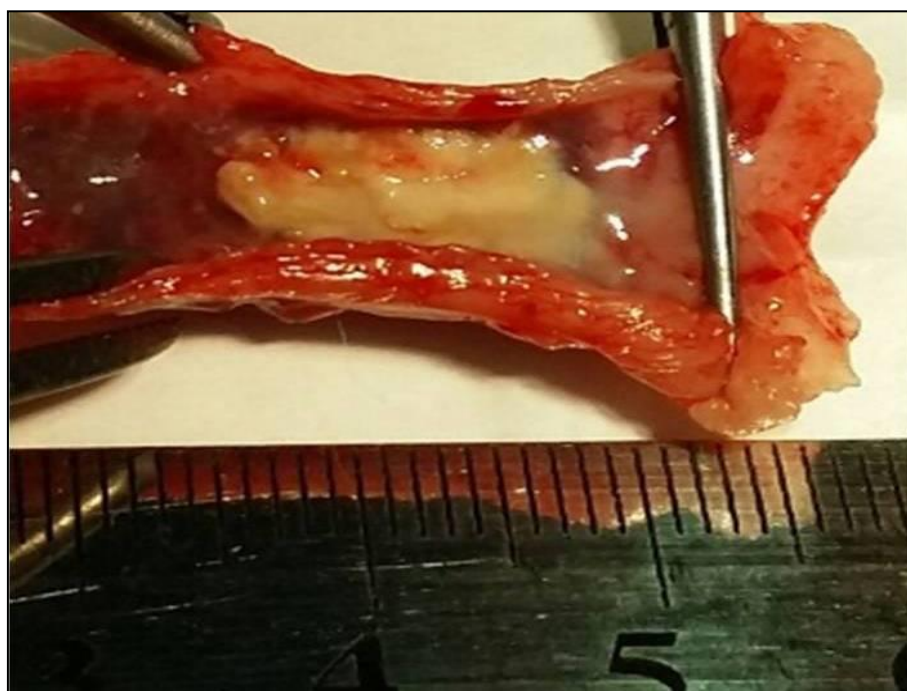


Рисунок 56. Группа IV. Макропрепарат.

Матрикс распадается, он густо инфильтрирован воспалительными клетками. Между матриксом и трахеей виден экссудат, содержащий воспалительные клетки и эритроциты, под ним – тонкий новообразованный подслизистый слой. В пограничных зонах между КИК и дефектом виден регенерирующий эпителий, но его активный рост ограничивается инфильтрированным матриксом, плотно не прилегающим к трахее, а потому не выполняющим своей функции в полном объеме (рисунок 57, 58).

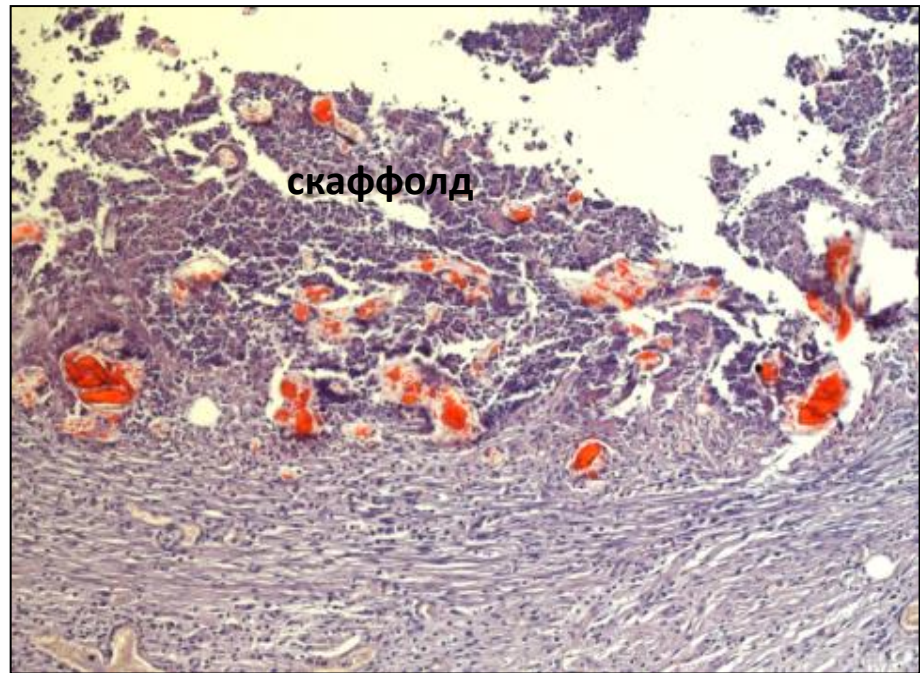


Рисунок 57. Группа IV. Микропрепарат
(Окраска гематоксилином и эозином)

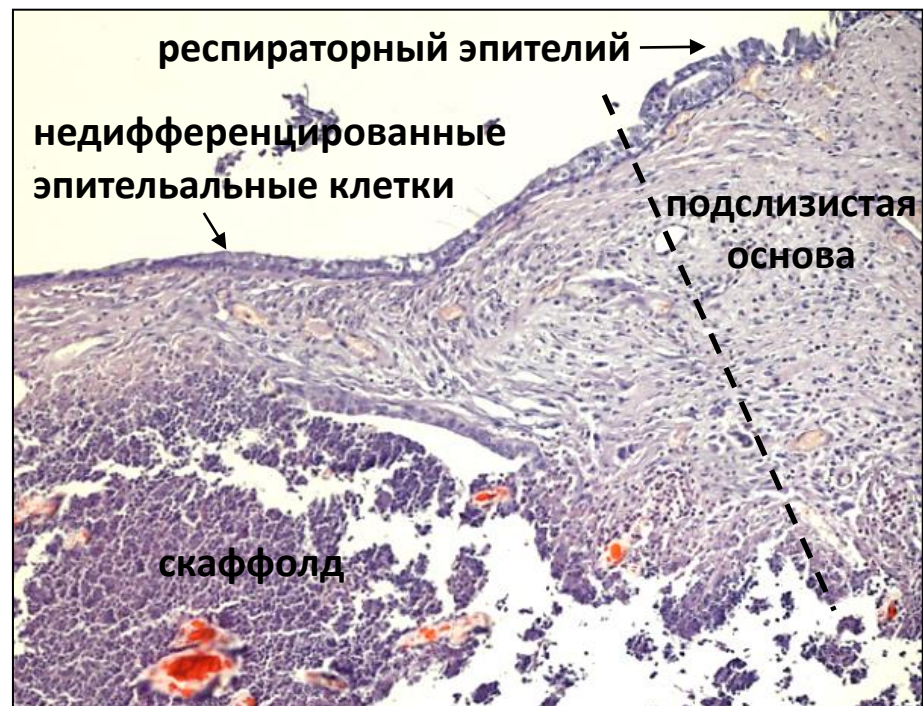


Рисунок 58. Группа IV. Микропрепарат
(Окраска гематоксилином и эозином)

В связи с полученным результатом стала очевидна необходимость более щадящего способа фиксации биоматрикса в просвете трахеи, нежели подшивание. Использование шовного материала было недостаточно надежным, чтобы предотвратить миграцию КИК в просвет дыхательных путей.

Использование биоклея в качестве альтернативы шовному материалу мы исключили из-за ряда факторов. Во-первых, клей создает дополнительный слой между естественным каркасом трахеи и матриксом, что возвращает нас к проблеме отсутствия тесной связи между КИК и собственным хрящом трахеи. Во-вторых, клей, наверняка, будет вызывать в той или иной степени воспалительный ответ. Наконец, необходимо учитывать возможное взаимодействие биоклея с синтетическим матриксом.

5.2. Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной стентом

Апробирована предложенная нами новая методика пластики протяженного дефекта стенки трахеи. Создана одноименная с типом хирургического вмешательства группа V «Пластика дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной стентом», в которую включили восемь кроликов (n=8).

5.2.1. Ход оперативного вмешательства в группе V

Офтальмологическим скальпелем создавали критическое повреждение слизисто-подслизистой трахеи по аналогии с контрольной группой III. Далее для закрытия протяженного дефекта обратились к КИК, ранее уже используемой в группе IV. Только у кроликов в этой группе вместо подшивания биоматрикса предложен новый способ фиксации. Подбран

сосудистый стент, соответствующий трахее по размеру. На стент укладывали клеточно-инженерную конструкцию (рисунок 59).

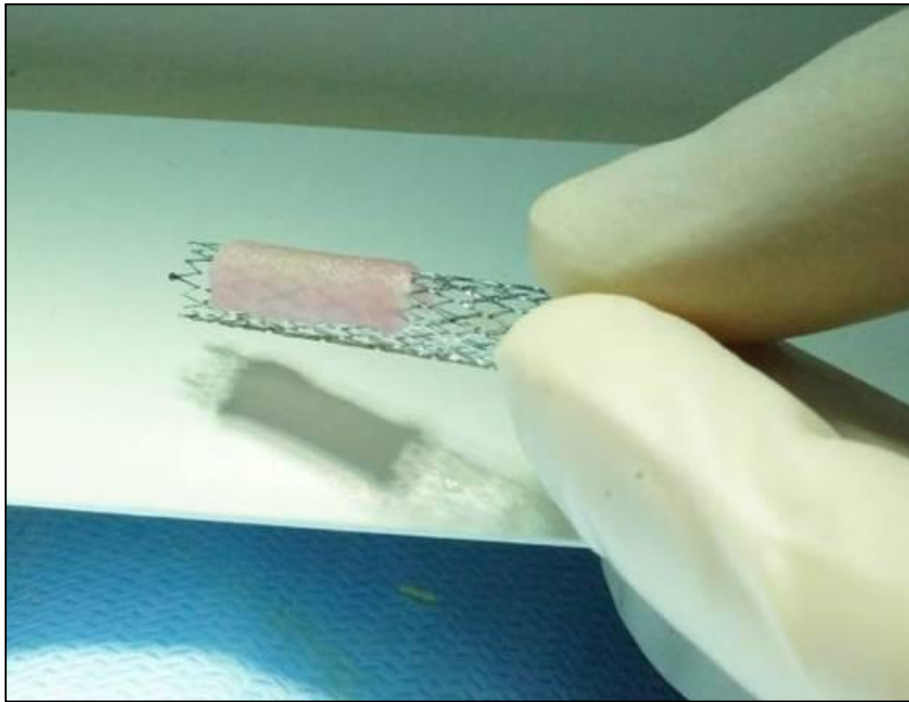


Рисунок 59. Непокрытый цилиндрический сосудистый стент и КИК

Одномоментно под контролем зрения между вдохом и выдохом лабораторному кролику *per os* внутритрахеально устанавливали стент, который надежно фиксировал КИК изнутри к стенке трахеи в зоне раневой поверхности (рисунок 60). Эндотрахеальную трубку смещали таким образом, чтобы она не создавала препятствий для установки стентка. Под контролем зрения вручную направляли конец интубационной трубки.



Рисунок 60. Стент надежно фиксирует матрикс,
прижимая его к стенке трахеи

Во время ушивания раны трахеи было необходимо продолжать ИВЛ. Хрящевой каркас трахеи ушивали с использованием Prolene 6/0. Гемостаз проводили электрокоагуляционный. Мягкие ткани послойно ушивали. Накладывали асептическую наклейку.

Экстубацию осуществляли бережно, однако биоматрикс был надежно фиксирован и интубационная трубка его не травмировала.

5.2.2. Клиническое течение послеоперационного периода

У семи кроликов №1, №3-8 послеоперационный период протекал без осложнений. Эти животные находились под наблюдением в течение двадцати суток. На двадцатые сутки после операции кроликам в срок выполнена эвтаназия в связи с окончанием периода наблюдения. Особь №2 находилась под наблюдением в течение семи суток после операции. На

седьмые сутки по гуманным соображениям кролик досрочно выведен из эксперимента в связи с некупированной кишечной непроходимостью.

Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы V представлена на рисунке 61.

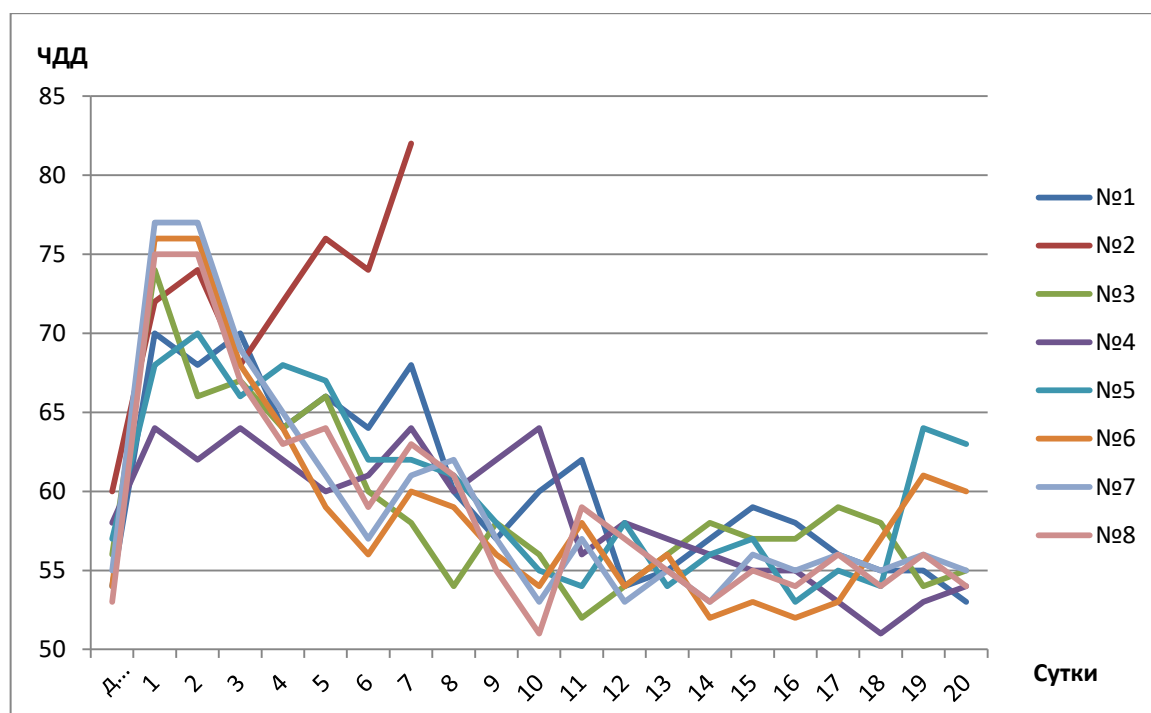


Рисунок 61. Динамика ЧДД от начала до конца эксперимента у животных группы V (№1-8)

За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической ЧДД составляли $55,8 \pm 1,8$, на двадцатые сутки - $56,3 \pm 2,9$. У выживших особей рост ЧДД сравнительно с исходным показателем наблюдается в первые несколько суток, а к моменту завершения эксперимента у всех животных отмечено отсутствие одышки. На графике отдельное внимание заслуживает кривая №2. У кролика прослеживаются признаки нарастания дыхательной недостаточности, но учитывая клиническую картину кишечной непроходимости, одышка наряду с изменениями других объективных параметров жизненно-важных функций была расценена как проявление одного из компенсаторных механизмов.

Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы V представлена на рисунке 62.

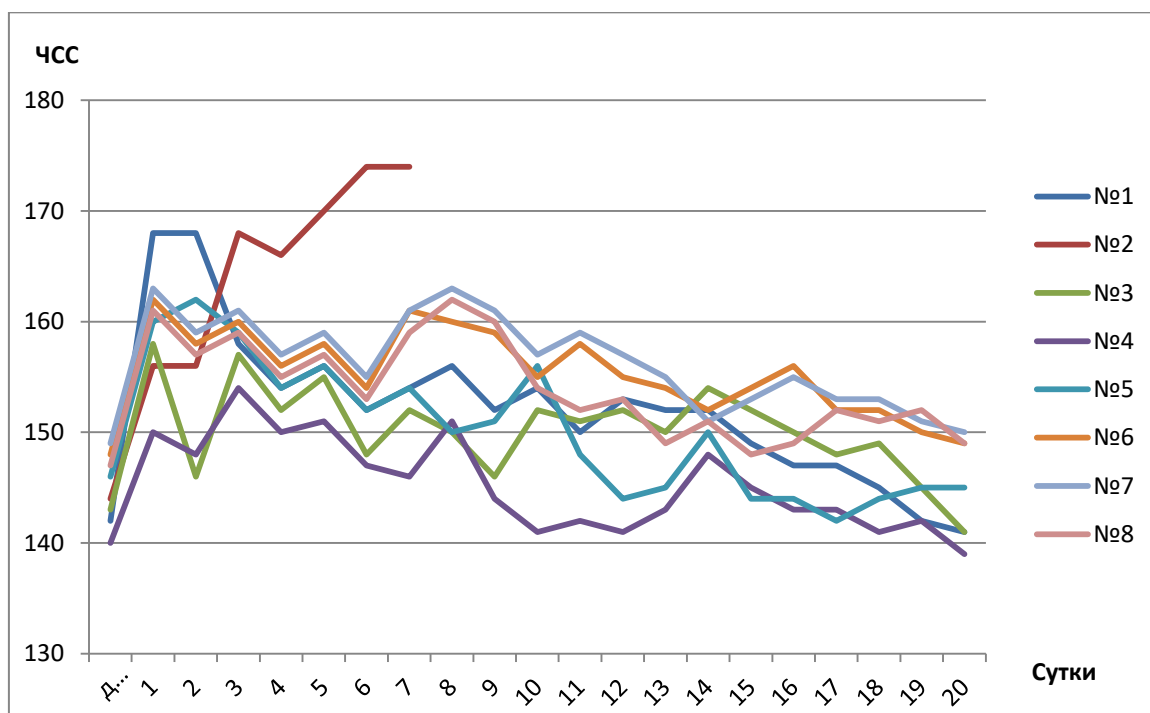


Рисунок 62. Динамика ЧСС от начала до конца эксперимента у животных группы V (№1-8).

Средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической ЧСС составляли до операции $44,8 \pm 2,6$, на двадцатые сутки - $144,8 \pm 3,8$. У выживших животных наибольший рост ЧСС по сравнению с исходным параметром наблюдается в первые несколько суток, а к моменту завершения эксперимента у всех кроликов отмечено отсутствие тахикардии. На графике кривая №2 прерывается на седьмые сутки в связи с досрочным выведением объекта из эксперимента.

Динамика температуры тела от начала до конца эксперимента у животных группы V представлена на рисунке 63.

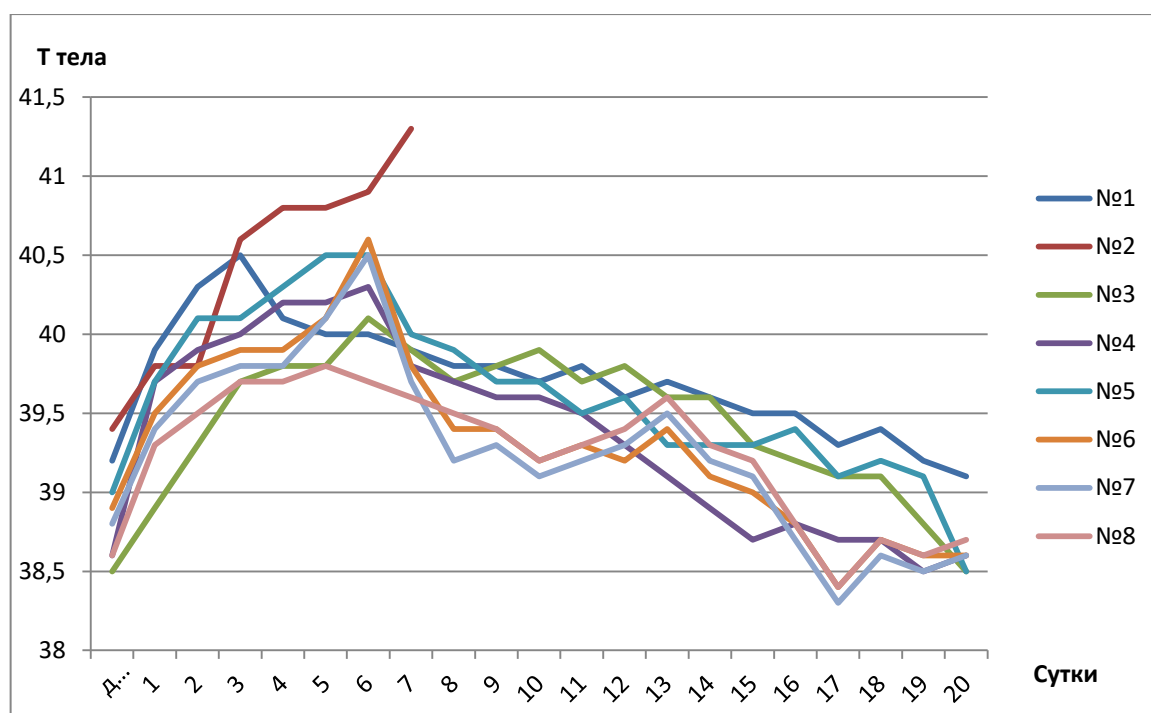


Рисунок 63. Динамика Т от начала до конца эксперимента у животных группы V (№1-8)

За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической температуры тела составляли $38,8 \pm 0,25$, на двадцатые - $38,6 \pm 0,13$. Колебания температуры тела относительно контрольного измерения в дооперационном периоде у выживших животных наиболее выражены в первую неделю эксперимента, затем кривые стремятся к нормальным значениям. Отсутствие гипертермии свидетельствует о регрессе системного воспалительного процесса. В случае объекта №2 продолженный рост температуры тела соответствует картине развившегося осложнения.

Динамика изменения уровня лейкоцитов крови у особей группы V представлена на рисунке 64.

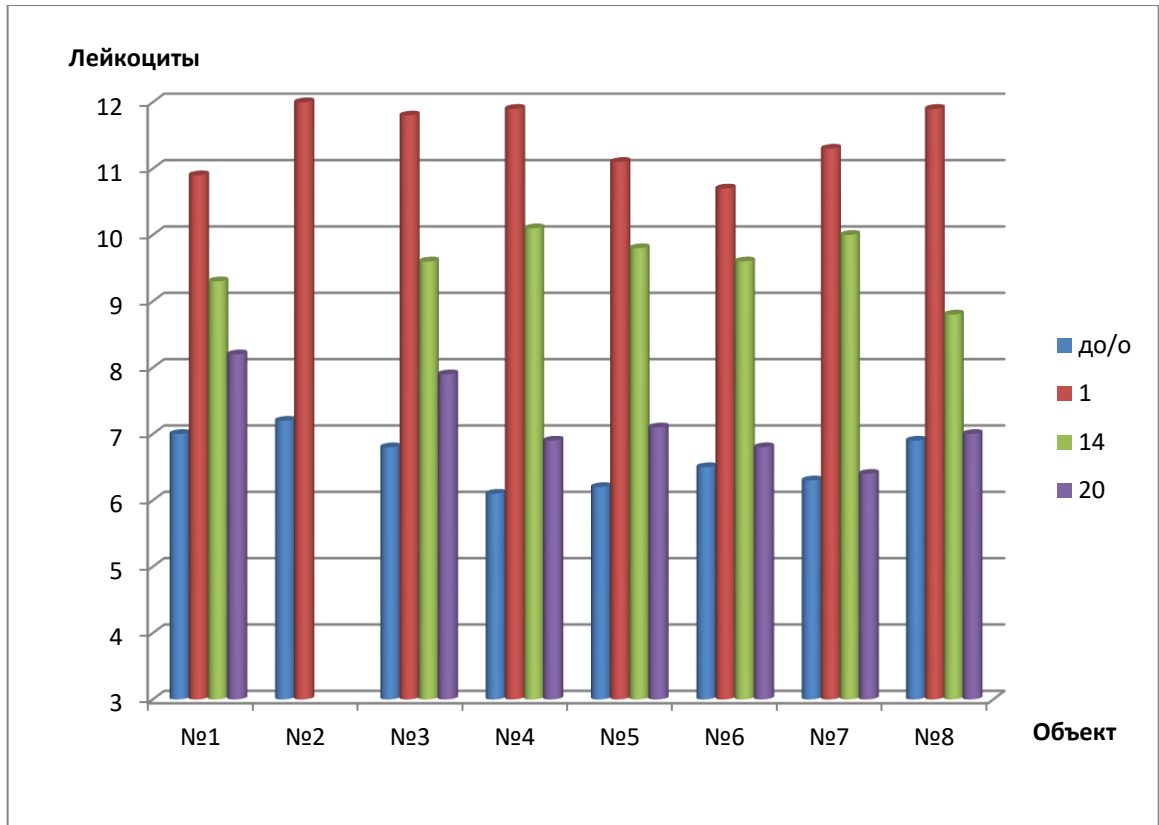


Рисунок 64. Динамика лейкоцитоза от начала до конца эксперимента у животных V группы (№1-8)

За сутки до операции средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической составляли $6,6 \pm 0,35$, на двадцатые сутки - $7,2 \pm 0,49$. На диаграмме 6, иллюстрирующей динамику общего количества лейкоцитов на протяжении эксперимента, у всех животных группы V на первые сутки прослеживается увеличение общего числа лейкоцитов. Для объекта №2 экспериментальное исследование остановлено ранее запланированных сроков в связи с выведением животного из эксперимента по гуманным соображениям. Особенно значимо то, что к моменту выведения животных №1, №3-8 из эксперимента на двадцатые сутки лейкоцитоза нет.

5.2.3. Гистологическое исследование

Просвет трахеи не сужен, есть незначительное количество слизи. Стент легко отделился от стенки трахеи (рисунок 65), однако вместе со стентом отделились остаточные фрагменты матрикса. Макроскопически на месте дефекта нет выраженных гематомы и отека по сравнению с другими группами (рисунок 66). Микроскопически видны множественные зоны начинающейся регенерации подслизистого слоя, по краям дефекта можно увидеть регенерацию эпителия (рисунок 67).

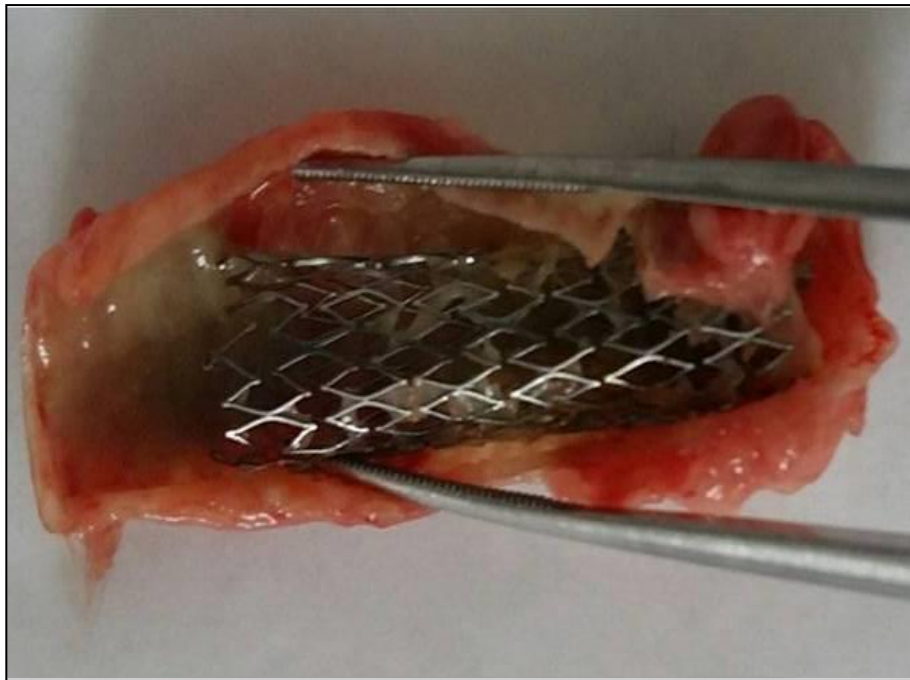


Рисунок 65. Группа V. Макропрепарат.
Стент легко отделяется от стенки трахеи



Рисунок 66. Группа V. Макропрепарат.
На месте дефекта нет выраженной гематомы и нет
выраженного отека

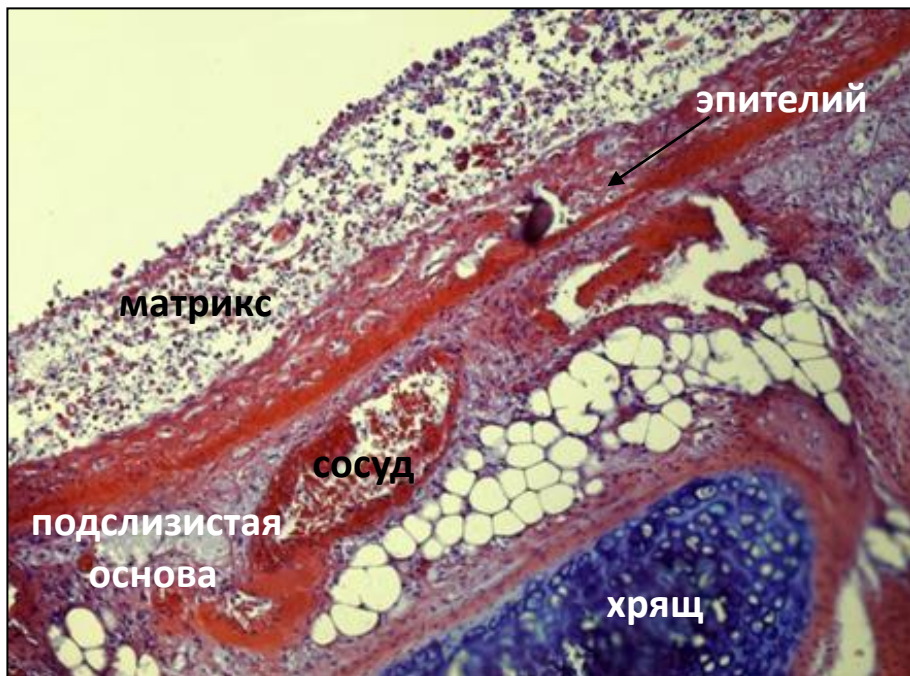


Рисунок 67. Группа V. Микропрепарат.
(Окраска гематоксилином и эозином)

Метод, основанный на пластике критического дефекта трахеи клеточно-инженерной конструкцией, фиксированной стентом, благоприятно сказался на клинической картине в послеоперационном периоде. Это обеспечивалось сокращением длительности общей анестезии и объема оперативного вмешательства. В экспериментальной группе V не требовался расширенный доступ в трахею, а фиксация биоматрикса стентом сокращала время, которое затрачивалось при подшивании КИК в группе IV.

Предложенная модель реконструкции трахеи характеризуется меньшей воспалительной реакцией и большей активизацией репаративных процессов в зоне повреждения. Материалы гистологии позволили говорить о перспективности биоматрикса в замещении критических дефектов слизисто-подслизистой трахеи.

Таким образом, разработка является актуальной в связи с возможностью повышения радикальности операции, а, следовательно, и улучшения прогнозов лечения стенозов трахеи.

Предложенный способ реконструкции трахеи при помощи клеточно-инженерной конструкции, фиксированной стентом, запатентован (Патент РФ № 2017110581).

5.3. Статистический анализ в экспериментальных группах

Статистическая обработка полученных клинических и лабораторных результатов эксперимента выполнена в многофункциональной программе статистического анализа «Statistica 10.0».

В пяти группах животных на протяжении всех суток наблюдения рассчитана средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической для каждого клинического показателя: ЧДД (таблица 1), ЧСС (таблица 2), температура тела (таблица 3).

Таблица 1. ЧДД в группах сравнения

№ группы	1	2	3	4	5
Сутки					
0 (до операции)	55,5+2,0	58,5+1,0	54,6+2,1	54,3+2,0	55,8+1,8
1	68,5+2,0	73,7+3,3	83,8+3,6	76,0+1,5	72,0+3,5
2	65,5+7,1	76,6+3,1	91,2+3,8	74,3+1,7	71,0+4,5
3	64,8+7,2	74,4+3,2	93,8+2,2	78,3+2,4	67,3+1,3
4	60,6+2,3	72,5+3,1	95,0+2,0	76,6+2,6	65,2+2,3
5	60,3+2,1	71,4+3,2		77,0+1,6	64,8+3,8
6	60,3+3,3	70,4+3,2		73,1+2,1	61,6+3,8
7	59,1+2,2	69,4+3,2		71,0+3,0	64,7+5,1
8	59,0+3,0	68,8+3,3		70,0+3,0	59,6+1,7
9	61,1+3,8	68,2+3,3		72,0+3,0	57,5+1,5
10	61,0+4,6	67,2+3,3		68,6+3,6	56,1+3,3
11	61,3+4,0	66,8+3,3		70,0+2,6	56,8+2,4
12	59,1+3,1	66,1+2,6		67,5+3,5	55,4+1,9
13	59,5+4,3	65,2+2,5		69,6+2,4	55,4+0,7
14	58,6+2,6	63,8+2,4		67,0+2,3	55,0+2,0
15	61,3+2,4	63,0+2,0		65,8+3,8	56,0+1,4
16	60,3+1,4	62,5+2,2		65,0+2,3	54,8+1,6
17	59,5+2,0	62,0+2,7		63,3+2,7	55,4+1,5
18	60,3+1,3	61,7+2,8		62,8+3,5	54,8+1,6
19	57,1+1,1	61,2+2,2		64,8+6,1	57,0+3,1
20	57,3+1,5	60,1+1,6		63,3+3,6	56,3+2,9

Таблица 2. ЧСС в группах сравнения

№ группы	1	2	3	4	5
Сутки					
0 (до опер.)	147,0+8,0	135,5+6,1	141,5+4,6	143,1+10,1	144,8+2,6
1	167,1+5,8	159,7+7,5	165,8+9,8	185,6+8,7	159,7+3,8
2	163,5+16,0	157,5+2,8	177,4+12,6	172,5+1,5	156,7+5,0
3	155,8+13,2	156,0+5,2	193,5+7,6	169,8+3,5	159,5+2,6
4	151,5+6,3	150,2+3,5	213,3+11,5	166,5+4,8	155,5+3,1
5	147,3+6,9	146,7+3,3		166,7+4,6	157,7+3,4
6	151,8+4,5	147,2+8,0		165,5+5,8	154,4+5,0
7	150,6+6,7	142,2+7,7		164,0+6,0	157,6+6,1
8	149,3+5,5	144,0+6,2		161,3+5,3	156,0+4,8
9	148,1+8,5	143,2+1,8		161,0+6,6	153,3+5,7
10	150,0+7,3	142,2+5,0		160,0+6,0	152,7+3,5
11	151,5+5,1	143,2+4,8		161,3+6,2	151,4+4,2
12	151,1+7,1	140,7+4,2		160,8+6,5	150,7+4,7
13	151,0+8,6	141,4+5,6		158,5+4,8	149,7+3,4
14	145,5+9,0	140,6+5,4		156,8+7,2	151,1+1,3
15	147,0+4,6	140,2+6,3		156,5+4,5	149,3+3,2
16	147,0+7,3	140,2+6,2		152,3+6,6	149,1+3,8
17	149,3+7,0	139,7+6,0		153,5+5,1	148,1+3,6
18	148,3+9,5	138,1+6,3		154,0+5,0	147,8+3,8
19	147,3+9,5	137,0+5,7		155,1+6,4	146,7+3,6
20	146,3+8,5	136,8+5,1		156,5+7,0	144,8+3,8

Таблица 3. Температура тела в группах сравнения

№ группы	1	2	3	4	5
Сутки					
0 (до опер.)	38,7+0,18	38,9+0,27	39,0+0,22	38,8+0,30	38,8+0,25
1	40,5+0,41	40,3+0,30	40,7+0,82	40,3+0,63	39,5+0,25
2	40,8+0,42	40,6+0,26	41,2+0,54	40,3+0,36	39,8+0,22
3	40,5+0,60	41,5+0,15	41,5+0,24	40,7+0,33	40,0+0,27
4	40,1+0,35	41,3+0,41	41,8+0,06	40,9+0,30	40,1+0,27
5	40,1+0,49	40,4+0,41		40,9+0,30	40,1+0,25
6	40,0+0,42	40,7+0,53		41,1+0,29	40,3+0,30
7	39,9+0,33	40,6+0,53		40,5+0,61	40,0+0,32
8	39,7+0,32	40,3+0,46		40,4+0,55	39,6+,020
9	39,6+0,36	40,2+0,36		40,3+0,55	39,6+0,17
10	39,6+0,34	40,1+0,37		40,2+0,45	39,+0,27
11	39,5+0,36	39,8+0,19		40,2+0,53	39,5+0,17
12	39,4+0,35	39,7+0,13		40,2+0,45	39,5+0,18
13	39,2+0,28	39,7+0,21		40,2+0,48	39,5+0,16
14	39,2+0,32	39,7+0,24		40,1+0,43	39,3+0,18
15	39,2+0,37	39,6+0,12		40,0+0,33	39,2+0,19
16	39,0+0,34	39,4+0,28		40,0+0,36	39,0+0,29
17	39,0+0,36	39,3+0,30		39,7+0,30	38,7+0,35
18	38,9+0,25	39,2+0,27		39,6+0,21	38,9+0,27
19	38,9+0,33	39,1+0,32		39,5+0,31	38,7+0,23
20	38,9+0,31	39,0+0,26		39,5+0,32	38,6+0,13

В пяти группах животных в контрольные сутки эксперимента рассчитана средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической уровня лейкоцитов (таблица 4).

Таблица 4. Уровень лейкоцитов в группах сравнения

№ группы	1	2	3	4	5
Сутки					
0 (до опер.)	6,6+0,29	6,7+0,32	6,7+0,24	6,6+0,30	6,6+0,35
1	10,1+0,72	12,4+0,76	14,6+0,77	12,5+1,25	11,5+0,51
14	8,6+0,60	10,3+0,45	--	10,3+0,40	9,6+0,31
20	7,6+0,44	9,3+0,32	--	9,6+0,35	7,2+0,49

В группах дефектов (II и III) и реконструкций (IV и V) для ЧДД, ЧСС, Т и лейкоцитов в общем анализе крови рассчитана средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической в послеоперационном периоде (в расчетах исключены показания в дооперационном периоде) (таблица 5).

Таблица 5. Средние значения изучаемых клинических показателей в послеоперационном периоде в группах II - V

№ группы	2	3	4	5
Параметр				
ЧДД	66,85+4,95	81,39+13,33	68,97+5,69	59,96+5,26
ЧСС	143,95+7,35	172,09+20,64	161,13+8,82	152,42+5,32
Т тела	40,02+0,66	40,68+1,04	40,16+0,59	39,46+0,46

Изображена динамика клинических показателей (рисунок 68) и лейкоцитов в послеоперационном периоде в группах II - V (рисунок 69).

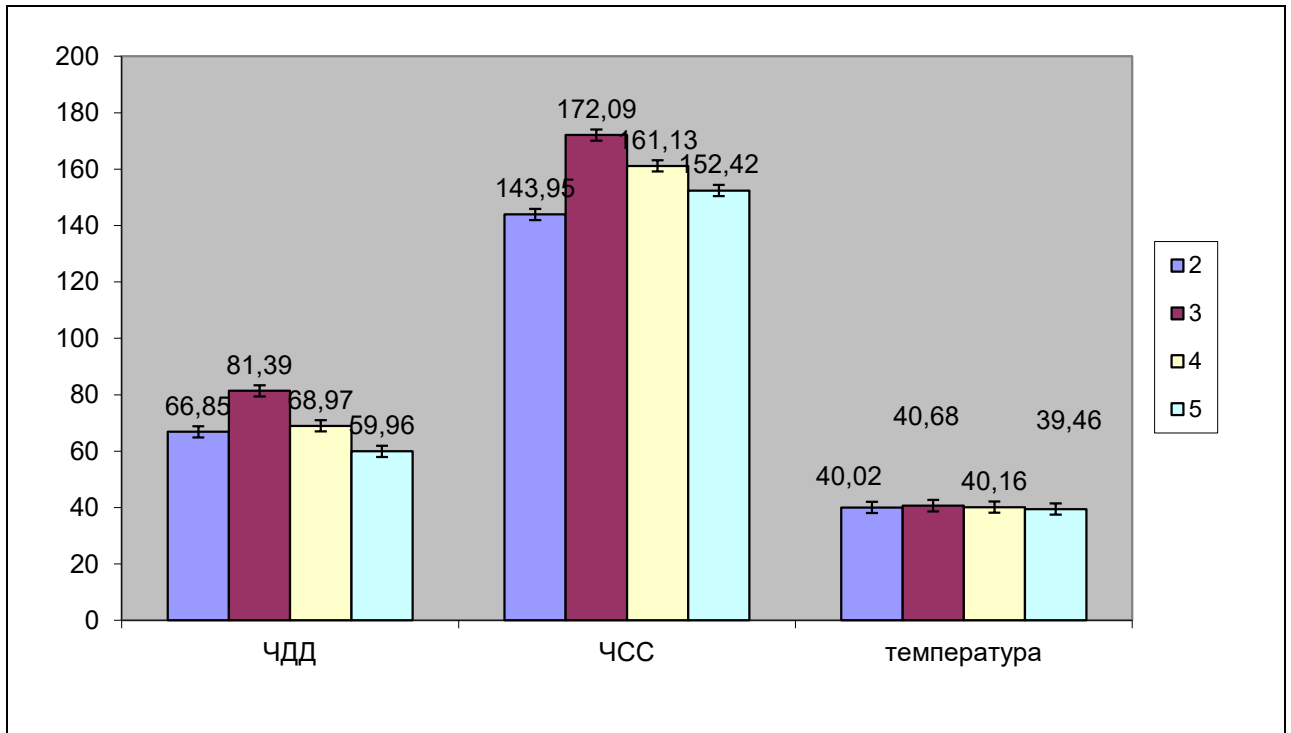


Рисунок 68. Динамика клинических показателей в послеоперационном периоде в группах II – V

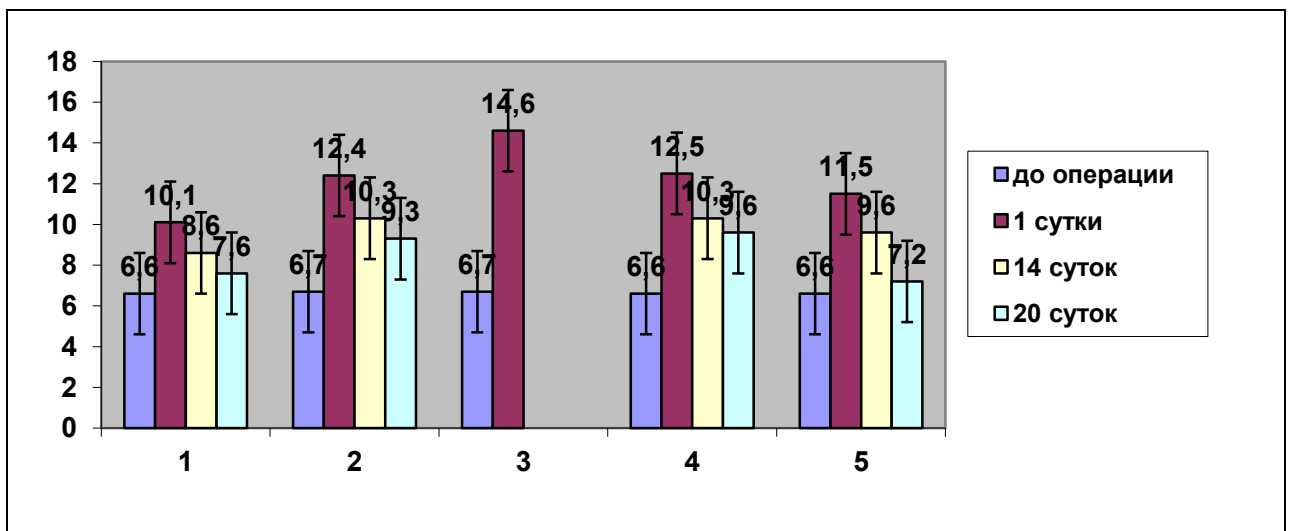


Рисунок 69. Динамика лейкоцитов в послеоперационном периоде в группах II-V

Во всех пяти группах рассчитана корреляционная зависимость изучаемых клинических и лабораторных показателей (таблица 6) и представлена наглядно (рисунок 70).

Таблица 6. Корреляция изучаемых показателей в послеоперационном периоде с течением времени в группах I - V

№ группы	1	2	3	4	5
ЧДД	-0,469	-0,716	0,791	-0,520	-0,749
ЧСС	-0,597	-0,708	0,980	-0,560	-0,706
Температура	-0,746	-0,685	0,865	-0,483	-0,678
Лейкоциты	-0,142	0,036	1,000	0,082	-0,251

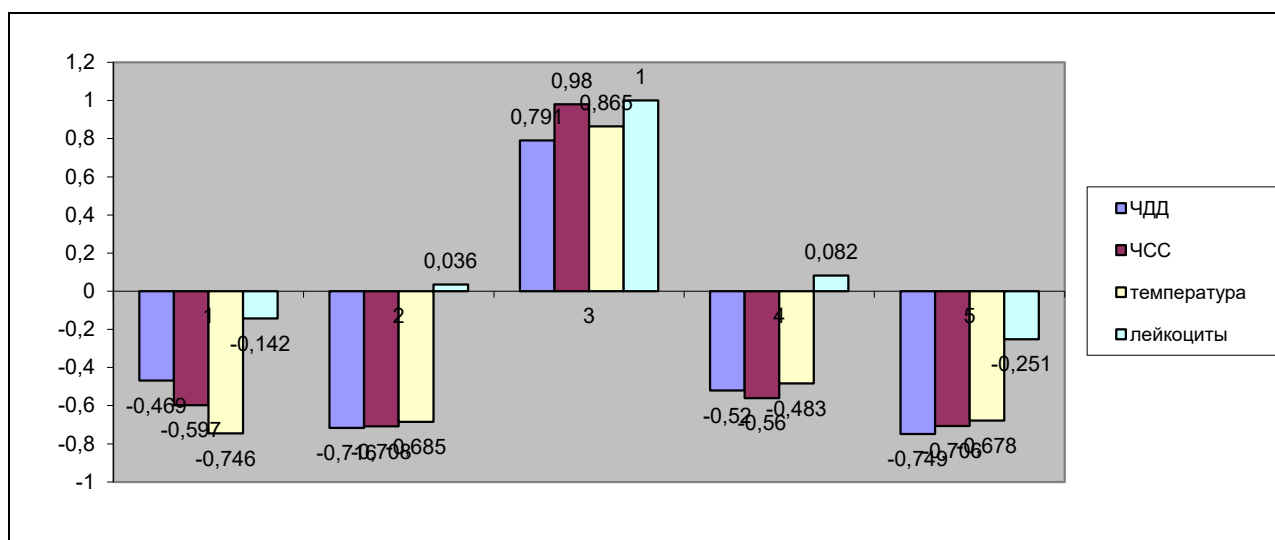


Рисунок 70. Значения силы и направления корреляций изучаемых показателей с течением времени в группах I - V

По показателю ЧДД группа I со всеми остальными группами не имела достоверных различий ($p > 0,1$). Это же касалось сравнения показателей ЧДД в

группах II и IV, группах II и V (в них $p > 0,1$). Достоверные различия по показателям ЧДД обнаружены при сравнении в группах II и III ($p < 0,0002$), в группах III и IV ($p < 0,001$), в группах III и V ($p < 0,05$), в группах IV и V ($p < 0,05$).

По показателю ЧСС отсутствие достоверных различий установлено при сравнении групп I и IV, V, а также II и IV, V (везде $p > 0,1$). Достоверные различия большой выраженности установлены при сравнении групп I и II ($p = 0,004$), групп II и III ($p = 0,02$), групп IV и V ($p = 0,00028$). Достоверные различия меньшей интенсивности имелись при сравнении групп I и III ($p = 0,04$), групп II и V ($p = 0,09$), групп III и IV ($p = 0,04$), групп III и V ($p = 0,03$).

По показателю температуры тела установлены достоверные различия I группы со всеми остальными группами, кроме V группы (I-II $p = 0,02$, I-III $p = 0,029$, I-IV $p = 0,0007$, I-V $p > 0,1$). Во II группе достоверные различия имелись с показателями III группы ($p = 0,083$) и с показателями V группы ($p = 0,00389$), отсутствие различий с показателями IV группы ($p > 0,1$). Значения III группы достоверно различались с показателями V группы ($p = 0,022$), а также III и IV групп ($p = 0,038$). Достоверных различий между IV и V группами не имелось ($p > 0,1$).

По показателю уровень лейкоцитов все сравнения между всеми группами показали недостоверность различий (везде $p > 0,1$).

По всем группам (кроме III) получены отрицательные корреляции высокой или средней силы по показателям ЧДД, ЧСС, T с длительностью послеоперационного периода, наиболее выраженные по показателям ЧДД и ЧСС в II и V группах ($r = -0,716$, $r = -0,708$, $r = -0,749$, $r = -0,706$), по T – в I, II и V группах ($r = -0,746$, $r = -0,685$, $r = -0,678$). В III группе получены положительные корреляции высокой силы длительности послеоперационного периода со всеми изучаемыми параметрами (ЧДД $r = 0,791$, ЧСС $r = 0,980$, T $r = 0,865$, уровень лейкоцитов $r = 1,00$). Уровень лейкоцитов во всех группах, кроме III, не обнаружил значимых корреляций по силе и по направлению (отсутствие

корреляционных зависимостей) в связи с высокой вариабельностью клеточных показателей.

Резюмируя полученные статистические данные, следует отметить, что в проведенном анализе принципиальным стал уровень достоверности в следующих сравниваемых группах:

- 1) II (дефект трахеи $< 50\%$ окружности) и III (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности);
- 2) III (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности) и IV (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности, замещенный КИК, фиксированной подшиванием);
- 3) III (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности) и V (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности, замещенный КИК, фиксированной стентом);
- 4) IV (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности, замещенный КИК, фиксированной подшиванием) и V (дефект трахеи $\geq 50\%$ окружности, замещенный КИК, фиксированной стентом).

Достоверность различий между второй группой с дефектом трахеи менее половины окружности и третьей группой с дефектом трахеи от половины окружности по ЧДД, ЧСС, Т доказаны. Это в свою очередь подтвердило выводы, сделанные нами на основании оценки динамики клинических показателей и результатов гистологического исследования. Таким образом, формирование группы III контрольной стало абсолютно обоснованным.

Достоверность различий по трем клиническим показателям между контрольной группой III с критическим дефектом трахеи без последующего лечения и группами IV и V, в которых для замещения дефекта апробированы методики лечения на основе КИК, статистически подтверждена. Полученные расчеты трактовались в пользу гипотезы об эффективности биоматрикса в реконструкции обширного повреждения трахеи.

При статистическом анализе клинических данных в группах IV и V, которые разнились методом фиксации КИК в просвете трахеи, достоверные различия получены по ЧДД и ЧСС. Достоверных различий по Т не отмечено,

вероятно, в связи с малой мерой разнообразия признака и небольшим диапазоном динамики показателей.

Отсутствие достоверных различий уровня лейкоцитов в общем анализе крови в экспериментально значимых группах II и III, III и IV, III и V, IV и V обусловлено тем, что клеточный показатель обнаружил очень высокую вариабельность.

Наглядно представлено распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента животных (таблица 7).

Таблица 7. Распределение животных в эксперименте

Группа	I	II	III	Единиц. наблюдение двух-этапного подхода	IV	V	Всего
Выжило	6	8	0	0	6	7	27
Умерло	2	0	8	1	2	0	13
Досрочно выведено	0	0	0	0	0	1	1
Всего	8	8	8	1	8	8	41

В процентном отношении рассчитана выживаемость и летальность в общей популяции (рисунок 71) и внутри каждой группы (рисунок 72). Отдельно выделена категория животных, досрочно выведенных из эксперимента.



Рисунок 71. Распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента особей в общей популяции.

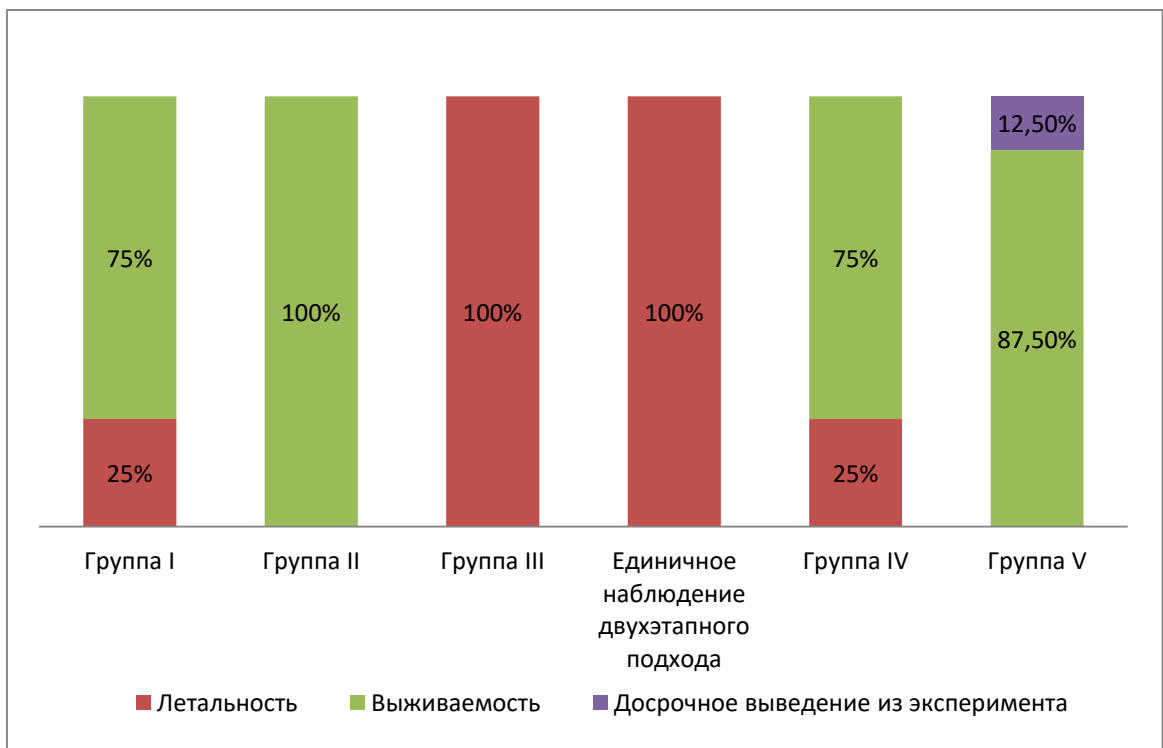


Рисунок 72. Распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента особей в каждой группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что хирургия нижних дыхательных путей имеет долгую и внушительную историю развития, проблема реконструкции протяженных дефектов трахеи и бронхов по-прежнему является актуальной для всего мирового научного сообщества. Погрешности ранней диагностики и отсутствие своевременного адекватного лечения стриктур воздухоносных путей являются неблагоприятными прогностическими факторами, ведущими к инвалидизации экономически активного населения. Поиски универсального метода замещения дефектов трахеобронхиального дерева являются приоритетными для специалистов в области торакальной хирургии.

В рамках диссертационного исследования проведен основательный поиск материалов, посвященных тематике данного вопроса, в печатных изданиях по хирургии, трансплантологии и регенеративной медицине в архивах ГЦНМБ, РГПБ, ЦИТиС, электронных библиотеках (Scopus, PubMed, Web of Science, ELIBRARY), в базах патентных ведомств, Всемирной организации по интеллектуальной собственности.

Результаты опубликованных доклинических и клинических исследований позволили с уверенностью полагать, что единого подхода в лечении протяженных дефектов нижних дыхательных путей на сегодняшний день не предложено.

Перечень состояний, течение которых осложняется развитием стойких стриктур воздухоносных путей, достаточно разнообразен. Прогрессирование стенозирующего процесса в трахее неминуемо ведет к необходимости хирургического вмешательства, направленного на удаление пораженной зоны. Долгое время операцией выбора у таких пациентов являлась циркулярная резекция трахеи. Технически она не всегда была выполнима, так как с ростом числа пораженных колец трахеи натяжение между концами анастомоза и риски его несостоятельности возрастали. В случае с тотальным повреждением органа циркулярная резекция и вовсе не применима. Методы,

основанные на внедрении искусственных протезов, аутотрансплантатов не нашли отклика в реалиях современной хирургии. Трансплантология в силу ряда объективных причин не смогла стать общедоступной панацеей.

В то же время эпоха XXI века активно начинает развивать современные биотехнологии. Регенеративная медицина – это перспективное междисциплинарное направление, образованное путем синтеза молекулярной биологии, тканевой инженерии и собственно медицины. Столь революционное направление уверенно обрело популярность в научных кругах.

Опираясь на экспериментальный опыт коллег, мы пришли к пониманию того, что тщательно отработанная в доклинических исследованиях на животных методика по замещению повреждений трахеи при помощи клеточно-инженерных конструкций может стать достойной альтернативой в лечении протяженных дефектов нижних дыхательных путей.

Таким образом, целью работы стало создание нового способа пластики протяженного дефекта слизисто-подслизистой трахеи в эксперименте.

При анализе литературы обращает внимание существование достаточного количества трудов по замещению всей трахеи, а методике восстановления эпителия посвящены лишь единичные исследования. Поэтому в диссертационной работе реконструктивно-восстановительное вмешательство было направлено на пластику именно слизистой и подслизистой трахеи.

Если считать, что миграционная способность эпителиоцитов с краев раны в зону повреждения приблизительно одинакова у млекопитающих, а отношение размера поражения к размеру клетки у крупных животных существенно больше, то критический дефект эпителия может быть сформирован только у крупных животных. К тому же они пригодны в качестве модели для изучения процессов эпителизации в трахее, так как размеры нижних дыхательных путей у них более приближены к параметрам

человека. Поэтому в качестве лабораторных животных были выбраны кролики.

Прежде чем приступить к моделированию критического дефекта трахеи с последующей его реконструкцией, мы решили оценить эффективность реваскуляризации в репаративных процессах слизистой и подслизистой трахеи. Для анализа возможности применения реваскуляризации трахеи как этапа реконструкции была сформирована группа I. Нами модифицирована техника, представленная Hardillo J. с соавторами в 2001 году.

Предложен оригинальный доступ к трахее кролика с разрезом кожи по средней линии шеи. В группе I на грудной клетке разрез дополнительно отклонялся влево от средней линии, чтобы не травмировать сосудистую ножку, питающую лоскут для будущей реваскуляризации. После мобилизации трахеи на ее передне-боковой стенке участок размерами 20x10 мм лишали внешнего кровоснабжения. Далее формировали фасциальный лоскут на груди, сохраняя питающую его крупную артерию с сопровождающей веной. Лоскут оборачивали вокруг выделенного участка трахеи и фиксировали шовным материалом. В послеоперационном периоде клинически значимых нарушений у шести животных группы I не диагностировано. Кролики своевременно выведены из эксперимента на двадцатые послеоперационные сутки в связи с окончанием периода наблюдения. У двух кроликов развилась кишечная непроходимость, которую не удалось разрешить. Летальность в данной группе составила 25%, однако она была не связана с нарушениями со стороны дыхательной системы. При гистологическом исследовании препаратов выживших особей стеноза трахеи не было, сосудистая сеть в зоне лишенной питания после реваскуляризации была развита лучше, чем в интактной трахее. Все же ни на одном гистологическом препарате не было найдено сосудов между хрящевыми кольцами. Это свидетельствовало о независимой от фасциального лоскута васкуляризации подслизистого слоя трахеи. Таким образом, мы сделали

выводы о том, что выполнение реваскуляризации как дополнительного этапа, направленного на стимуляцию репарации слизисто-подслизистой трахеи, не имеет доказательной базы.

Так как непосредственной целью нашей работы была реконструкция дефекта трахеи, то было принципиальным смоделировать именно такое повреждение трахеи, при котором ее самозаживление было бы невозможным, а в случае отсутствия реконструктивного вмешательства повлекло бы летальный исход. Созданы две группы дефектов, которые различались в зависимости от ширины наносимого повреждения, при этом длина раны оставалась константной и составляла 15 мм. В группу II включили животных с размерами дефекта слизисто-подслизистой менее 50% окружности трахеи, а в III группу вошли кролики с размерами дефекта 50% окружности и более. Технически ход операций в этих двух группах не отличался. После осуществления доступа к трахее и ее мобилизации на передне-боковой стенке трубчатого органа было сформировано «окно». Такая локализация зоны поражения выбрана не случайно. Наше решение продиктовано тем, что анатомически передняя и боковые стенки трахеи лабильнее чем задняя. Технически в силу небольших размеров трахеи выполнение манипуляций на передней и боковых поверхностях доступнее. Статистически передняя поверхность трахеи чаще подвержена риску формирования дефектов. Клинически при поражении задней стенки трахеи прогнозируется ранняя летальность. На этапе моделирования дефекта мы задались вопросом о рациональном способе повреждения слизисто-подслизистого слоя трахеи. Наиболее эффективным методом создания дефекта, апробированным в эксперименте, стал хирургический с использованием офтальмологического скальпеля. За счет легкости и малых размеров инструмента параметры наносимого повреждения можно было максимально выверить. После нанесения повреждения слизистой и подслизистой трахеи в зоне сформированного «окна» накладывали П-образные швы на трахею, и рана послойно ушивалась. В послеоперационном периоде в группе II летальности

не было зарегистрировано. Послеоперационный период протекал без особенностей. На двадцатые сутки все восемь объектов исследования подвергнуты эвтаназии. На макропрепарате заметно некоторое сужение трахеи. В области дефекта отмечен слабый слой подслизистой и тонкая эпителиальная пленка. Результаты наглядно демонстрировали способность трахеи к самозаживлению при размерах дефекта слизисто-подслизистой менее половины окружности. Такие объемы повреждения не требовали реконструктивного вмешательства.

В группе III летальность была тотальной. Все восемь кроликов умерли на третьи и четвертые сутки после операции. Клиническая картина характеризовалась прогрессирующим нарастанием явлений острой дыхательной недостаточности. При гистологии просвет трахеи и крупных бронхов практически полностью был закрыт большим количеством густой мутной слизи. В зоне дефекта визуализировался массивный детрит из воспалительного инфильтрата и эритроцитов. Полученные данные позволили с уверенностью утверждать, что при размерах дефекта слизисто-подслизистой трахеи длиной 15 мм и шириной 50% и более ее окружности, самовосстановление органа не возможно без дополнительного вмешательства, направленного на замещение повреждения. Группа III стала контрольной.

От формирования предполагаемой группы двухэтапного подхода, где на первом этапе планировалась реваскуляризация трахеи, а на втором - создание критического дефекта слизисто-подслизистой основы трахеи в зоне реваскуляризации, по гуманным соображениям решено воздержаться. Причиной тому стал заведомо предсказуемый неблагоприятный исход, основанный на данных об отсутствии эффективности реваскуляризации, полученных в группе I. Мы понимали, что критический дефект трахеи без лечения неминуемо приведет к летальному исходу. В порядке эксперимента, двухэтапный подход все же был апробирован на одном объекте наблюдения. Первоначально выполнена реваскуляризация трахеи, а спустя две недели был

сформирован ее критический дефект в зоне реваскуляризации. Зарегистрирована ранняя послеоперационная летальность. При гистологии картина в зоне повреждения аналогична контрольной группе. Собственно ранее сделанные выводы о бесперспективности реваскуляризации в регенеративных процессах слизисто-подслизистого слоя трахеи подтвердились.

Важным этапом экспериментальной части диссертационного исследования стала апробация клеточно-инженерной конструкции в замещении дефекта трахеи. КИК представляла собой скаффолд на основе коллагена и хитозана, который предварительно колонизировался клетками слизистой оболочки носа кроликов.

Нами созданы две экспериментальные группы IV и V. Доступ к трахее и моделирование дефекта реализованы по уже отработанной ранее методике. Особенности реконструкции в данных группах стало помещение в зону дефекта биоматрикса. Различие хирургической техники в этих двух группах заключалось в способах фиксации КИК.

В группе IV биоматрикс фиксировали к трахее шовным материалом, синий цвет которого выбран не случайно. Такой подход сохранял возможность найти границы подшивания КИК в случае ее миграции или полной резорбции. Летальность у двух особей в группе IV связана с асфиксией, так как КИК мигрировала в просвет трахеи. У выживших шести кроликов в пограничных зонах между биоматриksom и дефектом трахеи была видна регенерация эпителия, рост которого ограничивался инфильтрированным матриксом. Мы пришли к мнению, что при подшивании невозможно проконтролировать плотное прилегание конструкции к собственному хрящевому каркасу трахеи. Независимо от механических свойств матрикса он будет смещаться при появлении экссудата в месте повреждения.

Так как при гистологическом исследовании животных группы IV мы убедились в обоснованности применения КИК в замещении дефекта трахеи,

то дальнейшие поиски были продолжены в направлении эффективного способа фиксации биоматрикса, который нивелирует все недостатки, спровоцированные использованием шовного материала.

От возможного использования биоклея решено воздержаться из-за его недостаточной эффективности и безопасности.

Была сформирована группа V, в которой для фиксации биоинженерной конструкции в просвете трахеи предложен сосудистый стент.

Этот способ выглядел более надежным за счет равномерного распределения давления пористого стента по всей поверхности КИК. Последняя оказывалась плотно фиксированной к зоне повреждения. Таким образом, стало возможным замещение циркулярных поражений и дефектов с большей протяженностью по длине трахеи. При гистологии сужения трахеи не было. Отмечены множественные зоны начинающейся регенерации подслизистого слоя и регенерация эпителия по краям дефекта.

Безусловно, полученные результаты в экспериментальной группе V однозначно трактовались в пользу предложенного нового способа реконструкции дефекта слизисто-подслизистой трахеи при помощи КИК и стента. Данная методика запатентована (Патент РФ № 2017110581 от 30 марта 2017 года).

Делом дальнейших исследований и экспериментов по усовершенствованию методики остается разработка подходящего скаффолда и заселение его стволовыми клетками дыхательного эпителия.

На основании проведенного опыта мы сформулировали требования к применяемому КИК. Матрикс должен по срокам биodeградации совпадать со сроками образования новой слизистой оболочки, быть достаточно плотным, чтобы не фрагментироваться под давлением стента, быть удобным для манипуляций, в том числе и при бронхоскопической установке, обладать низкой реактивностью в организме пациента, чтобы не допустить гибель клеток в матриксе от мощного иммунного ответа реципиента.

Стент должен быть потенциально удаляемым либо биоразлагаемым, гипоаллергенным. Для выполнения своей основной функции стент необходимо подбирать по размеру трахеи так, чтобы не допустить избыточного давления на стенки трубчатого органа и при этом фиксировать матрикс надежно.

Сделаны выводы, что либо стент, либо биоматрикс должны обладать антибактериальными свойствами, поскольку просвет трахеи является инфицированной средой. На любой КИК, как на инородном биоразлагаемом теле, обязательно будут осажаться микроорганизмы, вызывая дополнительное локальное воспаление и приводя к гибели клеток на поверхности скаффолда, а также к его более ранней биодеградации.

Рассмотренный в нашем эксперименте метод фиксации имплантата с помощью внутрисветного стента имеет определенные перспективы. Этот способ возможно осуществить при малоинвазивном, эндоскопическом доступе к поврежденной слизистой оболочке трахеи. Однако на данный момент не существует подходящих для этой цели стентов. Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку специального эндотрахеального стента, который обладал бы достаточной эластичностью и прочностью, чтобы фиксировать матрикс изнутри к стенке трахеи, не вызывая при этом чрезмерной компрессии и ишемии тканей. Необходимо уделить внимание удалению стента после выполнения его фиксирующей функции, а также рассмотреть возможность создания биоразлагаемого стента.

Целесообразно рассмотреть возможность проведения эндоскопического вмешательства, делая выбор в пользу малоинвазивных технологий. С помощью бронхоскопа станет возможной имплантация матрикса на поврежденные зоны трахеи и иных участков дыхательных путей с применением для фиксации КИК биоклея или иных конструкций типа стентов.

В экспериментальных условиях возможно проведение эндоскопического формирования дефекта и закрытия его синтетическим материалом на животных. Однако животное должно быть значительно больше кролика, например, свинья.

Предложенный способ реконструкции дефектов при помощи КИК, фиксированной в просвете трахеи стентом, потенциально применим для замещения повреждений и других трубчатых структур, например, пищевода, мочеточников, желчевыводящих путей. Главное, тщательно подбирать имплантат и стент с учетом всех их свойств.

Таким образом, на основании приведенной экспериментальной модели возможно выполнение большого спектра исследований по изучению регенерации дефектов слизистой и подслизистой оболочки нижних дыхательных путей, тестирование различных покровных материалов и клеточно-инженерных конструкций.

Проведенное экспериментальное исследование оставило достаточно много вопросов, на которые могли бы ответить дальнейшие опыты и разработки.

В заключение необходимо отметить, что проанализировав мировой опыт реконструктивно-восстановительной хирургии нижних дыхательных путей в кооперации с передовыми разработками регенеративной медицины и выполнив собственное исследование, мы пришли к единому мнению о необходимости данного опыта. Можно встретить как доклинические исследования, увенчавшиеся успехом, так и клинические случаи, сопряженные с человеческими жертвами из-за отсутствия убедительной доказательной базы в лабораторных условиях. Но совершенно точно одно, что сегодняшние разработки в области клеточной инженерии создают уверенную платформу для завтрашних достижений не только в хирургии, но и медицине в целом.

В настоящее время предложенный способ пластики дефекта слизистой-подслизистой трахеи требует детального изучения в доклинических

исследованиях. Безопасность и эффективность – это те критерии, которые должны быть максимально обоснованы. Для более детального изучения рисков предложенной методики, необходимо увеличить выборку животных в пределах данного вида, а также осуществить доклинические исследования на более крупных животных (свиньях).

ВЫВОДЫ

1. В ходе настоящего исследования достоверно установлено, что реваскуляризация трахеи фасциальным лоскутом на питающей ножке не способна оказывать стимулирующее влияние на репаративные процессы в слизистой и подслизистой трахее кролика.
2. Проведено сравнение методик создания протяженного дефекта трахеи в эксперименте, и предложена оптимальная модель нанесения повреждения слизисто-подслизистой нижних дыхательных путей при помощи офтальмологического скальпеля.
3. Дефект слизисто-подслизистой трахеи кролика длиной 15 мм и шириной 50% и более окружности трахеи является критическим, так как не способен к самозаживлению и без дополнительного хирургического вмешательства, направленного на замещение повреждения, неминуемо ведет к гибели животного.
4. Экспериментальная модель пластики критического дефекта трахеи с помощью клеточно-инженерной конструкции, фиксированной стентом в просвете трахеи, является жизнеспособной.
5. Предложенный метод пластики дефекта трахеи с помощью клеточно-инженерной конструкции и стента может составить достойную конкуренцию существующим способам реконструкции критических повреждений слизисто-подслизистой трахеи, стать доступной альтернативой в лечении обширных повреждений нижних дыхательных путей.
6. Разработана новая модель пластики обширного дефекта стенки трахеи в эксперименте. Получен Патент РФ № 2017110581 от 30 марта 2017 года.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для экспериментального воспроизведения дефекта нижних дыхательных путей наиболее рационально использование офтальмологического скальпеля, который позволяет стандартизировать размеры и глубину повреждения.
2. Для апробации новых методов лечения протяженных дефектов трахеи рекомендовано моделировать размер повреждения таким образом, чтобы его ширина составляла не менее половины окружности трахеи, так как иначе возможно самостоятельное заживление.
3. С целью улучшения эффективности методики рекомендовано продолжить разработки, направленные на усовершенствование КИК и поиски стентов, адаптированных непосредственно для имплантации в трахею.
3. Разработанная методика пластики протяженных дефектов нижних дыхательных путей рекомендована к апробации на более крупных животных.
4. Предложенная методика реконструкции дефекта стенки трахеи в эксперименте с помощью клеточно-инженерной конструкции, фиксированной в просвете трахеи при помощи стента, рекомендована к внедрению в экспериментальную хирургию для замещения повреждений других трубчатых органов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

КИК – клеточно-инженерная конструкция

T – температура тела

ЧДД – частота дыхательных движений

ЧСС – частота сердечных сокращений

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян А.С. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток / А.С. Акопян, Д.Ю. Белоусов, М.Р. Рысулы, А.В. Куликов. // Качественная клиническая практика. – 2010. – №1. – С. 22-28.
2. Александров В.Н. Трансплантация тканеинженерной трахеи как альтернативы аллогенной трахеи / В.Н. Александров, Л.И. Калюжная-Земляная, Д.В. Фирсанов, [и др.]. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2017. – Т. 176. – №4. – С. 110-114.
3. Амиров Ф.Ф. Пластические операции на трахее и бронхах / Ф.Ф. Амиров. – Ташкент: Госмедиздат Уз ССС, 1962. – 173 с.
4. Амиров Ф.Ф. Реконструктивные операции на трахее и бронхах (Эксперим. исслед.) / Ф.Ф. Амиров; Под ред. Е.Н. Мешалкина. – Ташкент: Медицина, 1978. – 246 с.
5. Аналитический центр Юрия Левады (Левада-Центр). Донорство и пересадка органов в общественном мнении россиян / Аналитический центр Юрия Левады (Левада-Центр) // Трансплантология. – 2014. – №1. – С. 8-19.
6. Аничкин В.В. Трахеобронхопластические операции / В.В. Аничкин, А.А. Оладько, Г.Ф. Сапко, [и др.]. – Витебск, 1996. – 272 с.
7. Аничкин В.В. Циркулярная резекция бифуркации трахеи с сохранением функции легких: дис ... д-ра мед. наук: 14.00.27 / Аничкин Владимир Владимирович. – Витебск, 1988. – 488 с.
8. Барановский Д.С. Получение функционально-полноценного мерцательного эпителия *in vitro* для тканевой инженерии трахеи / Д.С. Барановский, А.В. Люндуп, В.Д. Паршин // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70. – № 5. – С. 561-567.
9. Батухтина Е.В. Патент № 125464. РФ, МПК А61F 2/20 (2006.01). Тканеинженерный имплантат для замещения дефектов гортани и/или

- трахеи / Е.В. Батухтина, Е.В. Киселева, А.В. Васильев, И.В. Решетов // Дата подачи заявки: 2012.09.10. Опубликовано: 2013.03.10.
10. Вагнер Е.А. Трансплантация трахеи в эксперименте / Е.А. Вагнер, Р.Н. Хохлова, В.Д. Фирсов [и др.]. // Грудная хирургия. – 1980. – № 3. – С. 61 - 65.
 11. Вахрушева Т.И. Техника изготовления влажных патологоанатомических препаратов / Т.И. Вахрушева // Вестник КрасГАУ. – 2014. – №9. – С. 150-152.
 12. Герасимов С.С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных опухолей трахеи / С.С. Герасимов, С.М. Иванов, А.Ф. Маренич. – М. 2014. – 8 с.
 13. Гилевич И.В. Тканеинженерные конструкции на основе синтетического каркаса и недифференцированных костномозговых моноклеарных клеток в лечении стенозов трахеи : дис ... кандидата мед. наук: 14.01.17, 03.03.04 / Гилевич Ирина Валериевна. – Краснодар, 2017. – 134 с.
 14. Голуб. И.Е. Постинтубационные повреждения трахеи / И.Е. Голуб, С.Б. Пинский, Е.С. Нетесин // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – №4. –С. 124-128.
 15. Готье С.В. Органное донорство должно стать национальным приоритетом. / Беседовала И. Широкова // Ремедиум. 02.02.2016.
 16. Гудовский Л.М. Патент № 2125415С1 РФ, МПК А61В 17/24. Способ устранения дефектов трахеи и гортани / Л.М. Гудовский, Н.О. Миланов, Е.И. Трофимов, В.Д. Паршин // Дата подачи заявки: 1997.02.12. Опубликовано: 1999.01.27.
 17. Гумеров Т.А. Этические и правовые аспекты применения стволовых клеток в медицине / Т.А. Гумеров // Наука и мир. – 2014. – №5 (9) – С. 114-116.
 18. Давыдов М.И. Патент № 2010146680 РФ, МПК А61F 2/04 (2006.01). Способ получения матрикса трахеи для аллогенной трансплантации / М.И. Давыдов, Н.Ю. Анисимова, Ф.В. Доненко, Б.Е. Полоцкий,

- О.В. Лебединская, Е.А. Корнюшенков, В.В. Митин, И.Ф. Вилковыский, М.В. Киселевский // Дата подачи заявки: 2010.11.17. Опубликовано: 2012.06.20.
19. Демина М.Ф. Болезни кроликов / М.Ф. Демина, Б.А. Гусев, А.А. Дубницкий, С.В. Леонтюк. – М.: Сельхозгиз, 1959. – 221 с.
 20. Дыдыкин С.С. Анатомо-экспериментальное обоснование аллотрансплантации трахеи на сосудистой ножке: монография / С.С. Дыдыкин. – М.: Книжный Дом Университет, 2006. – 111 с.
 21. Дыдыкин С.С. Анатомо-экспериментальное обоснование аллотрансплантации трахеи на сосудистой ножке: дис ... д-ра мед. наук: 14.00.41 / Дыдыкин Сергей Сергеевич. – М., 2001. – 245 с.
 22. Дыдыкин С.С. Патент № 2110224 РФ, МПК А61В 17/24 (2006.01). Способ пересадки трахеи / С.С. Дыдыкин, А.В. Павлов // Дата подачи заявки: 1995.08.02. Опубликовано: 1998.05.10.
 23. Еремеева М.В. Возможности применения стволовых клеток и клеток-предшественников для стимуляции реваскуляризации и регенерации органов / М.В. Еремеева // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т.ХII. – №1. – С. 86-93.
 24. Зенгер В. Г. Хирургия повреждений гортани и трахеи / В.Г. Зенгер, А.Н. Наседкин, В.Д. Паршин. – М.: Медкнига, 2007. – 364 с.
 25. Колпаков Г. Операция по «мегагранту» / Г. Колпаков // Газета.ру. – 22.06.2012, 15:08 – URL: https://www.gazeta.ru/science/2012/06/22_a_4637213.shtml (дата обращения: 10.11.2017).
 26. Коптяева К.Е. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных. Сообщение 5: кролик, хорек / К.Е. Коптяева, Ж.Ю. Устенко, Е.В. Беляева, [и др.]. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – №3. – URL: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-03-05> (дата обращения: 28.12.2019).

27. Копылов А.Н. Перспективные материалы для создания матрикса имплантата трахеи / А.Н. Копылов, Н.Ю. Анисимова, Т.Х. Тенчурина, [и др.]. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13. – №2. – С. 67-71.
28. Королева Н.С. Клиника, диагностика и хирургическое лечение заболеваний трахеи: дис. ... докт. мед. наук. – М., 1980. – 455 с.
29. Кузьмичев А.П. К вопросу о резекции бифуркации трахеи в эксперименте / А.П. Кузьмичев, Л.Г. Малышева, Ю.В. Кипренский // Вопр. пульмонологии. – М., 1967. – С. 156-161.
30. Лазаренко В.А. Использование 3D-принтеров в хирургии (обзор литературы) / В.А. Лазаренко, С.В. Иванов, Е.Г. Обьедков [и др.]. // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2018. – №4. – С. 61-65. DOI: 10.21626/vestnik/2018-4/10
31. Левашев Ю.Н. Аллотрансплантация трахеи в клинике и эксперименте / Ю.Н. Левашев, П.К. Яблонский, В.Г. Пищук // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2009. – Т. 168. – №1. – С. 108-111.
32. Максимов А. Лимфоцит как общая стволовая клетка различных элементов крови в эмбриональном развитии и постфетальной жизни млекопитающих / А. Максимов. Пер. с нем. А.Б. Чухловин, А.И. Неворотин // Folia Haematologica 8. – 1909. – С. 125-134.
33. Новикова И.С. Применение коллагена в медицинских целях / И.С. Новикова, С.А. Сторублевцев // Успехи современного естествознания. – 2012. – № 6. – С. 136-136.
34. Оперативная хирургия / [И. Литтманн]; Под общей ред. проф., И. Литтманна. – Будапешт: Издательство академии наук Венгрии, 1985. – 1136 с.
35. Паршин В. Д. Диагностика, профилактика и лечение рубцовых стенозов трахеи: дис ... д-ра. мед. наук: 14.00.27 / Паршин Владимир Дмитриевич. – М., 2000. – 319 с.

36. Паршин В. Д. Закрытая травма трахеи - хирургическая или анестезиолого-реаниматологическая проблема / В. Д. Паршин // Анестезиология и реаниматология. – 2007. – № 4. – С. 50-53.
37. Паршин В.Д. Аллотрансплантация трахеи (анатомическое исследование) / В.Д. Паршин, С.С. Дыдыкин, Е.А. Тарабрин // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2008. – №2. – С. 56-60.
38. Паршин В.Д. Хирургия трахеи с атласом оперативной хирургии / В.Д. Паршин, В.А. Порханов. – М.: Альди-Принт, 2010. – 480 с.
39. Паршин В.Д. Хирургия рубцовых стенозов трахеи / В.Д. Паршин. – М., 2003. – 152 с.
40. Паршин В.Д. Транстрахеальный доступ при мультифокальном трахеопищеводном свище / В.Д. Паршин, Г.А. Вишневская, В.В. Паршин, Р.Д. Шарипжанова // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2013. – №7. – С. 55-57
41. Паршин В.Д., Гудовский Л.М., Русаков М.А. Лечение рубцовых стенозов трахеи / В.Д. Паршин, Л.М. Гудовский, М.А. Русаков // Хирургия. – 2002. – №3. – С. 25-32.
42. Паршин, В. Д. Трахеостомия. Показания, техника, осложнения и их лечение / В.Д. Паршин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 176 с.
43. Паршин, В. Д. Ятрогенные постинтубационные разрывы трахеи / В. Д. Паршин // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 2. – С. 9-13.
44. Перельман М.И. Рубцовый стеноз трахеи – профилактика и лечение (Вместо предисловия) / М.И. Перельман // Тезисы Российской научно-практической конференции «Профилактика, диагностика и лечение рубцовых стенозов трахеи». – М., 11-12 июня 1999. – с. 3-4.
45. Перельман М.И. Хирургия трахеи / М.И. Перельман. – М.: Медицина, 1972. – 207 с.

46. Петровский Б. В. Трахеобронхиальная хирургия / Б. В. Петровский, М.И. Перельман, Н. С. Королёва. – М., 1978. – 296 с.
47. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. N51 "Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)". – URL: <https://www.rospotrebnadzor.ru> (дата обращения: 15.10.2017).
48. Разина А.В. Влияние различных вариантов общей анестезии и операционной травмы на организм кроликов: Автореферат дисс ... канд-та вет. наук: 16.02.04 / Разина Анна Владимировна. – Троицк, 2010. – С. 22.
49. РОССТАНДАРТ. Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. Каталог межгосударственных стандартов. – URL: <https://rst.gov.ru> (дата обращения: 15.10.2017).
50. Рыбакова А.В. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 / А.В. Рыбакова, М.Н. Макарова // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – №2. – С. 96-107.
51. Самохин А.Я. Хирургическое лечение рубцовых стенозов трахеи: дис ... д-ра мед. наук: 14.00.27 / Самохин Александр Яковлевич. – М., 1992. – С. 225.
52. Сангинов А. Б. Этиология и патогенез рубцовых стенозов трахеи / А.Б. Сангинов, И.В. Мосин, Н.В. Мосина // Вестник Авиценны. – 2010. – №1. – С. 33-39.
53. Севастьянов В.И. Клеточно-инженерные конструкции в тканевой инженерии и регенеративной медицине / В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т.ХVII. – №2. – С. 127-130.

54. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т.ХVI. – №3. – С. 93-102.
55. Семченко В.В. Регенеративная биология и медицина. Книга I. Генные технологии и клонирование / В.В. Семченко, С.И. Ерениев, С.С. Степанов, [и др.]; Под ред. В.П. Пузырева, К.Н. Ярыгина, В.Н. Ярыгина. – Омск - Москва - Томск: Омская областная типография, 2012. – 296 с.
56. Сергеев Ю.Д. Современное состояние и проблемы правового регулирования донорства и трансплантации органов и тканей человека / Ю.Д. Сергеев, С.И. Пospelова // Медицинское право. – 2013. – №1. – С. 3-9.
57. Серебрякова А.А. Государственно-правовое регулирование использования органов и тканей человека в целях трансплантации как особых объектов гражданского права (компаративистское исследование) / А.А. Серебрякова, М.М. Арзамаскин, М.С. Варюшин // Власть. – 2011. – №8. – С. 155-157.
58. Сливкин Д.А. Хитозан для фармации и медицины / Д.А. Сливкин, В.Л. Лапенко, О.А. Сафонова, [и др.]. // Вестник ВГУ. – 2011. – №2. – С. 214-232.
59. Татур А.А. Хирургия рубцовых стенозов трахеи и трахео-пищеводных свищей: монография / А.А. Татур, С.И. Леонович. – Минск: БГМУ, 2010. – 272 с.
60. Терентьев П. В. Лабораторные животные. Кролик. / П.В. Терентьев, В.Б. Дубинин, Г.А. Новиков. – М.: Сов. наука, 1952. – 364 с.
61. Топография трахеи взрослого кролика (морфологические исследования, МРТ) / Л.В. Ткаченко, В.К. Коновалов, С.В. Тютюнников [и др.]. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – №9 (71). – 2010. – С. 51-54.

62. Топольницкий Б.Е. Замещение циркулярных дефектов трахеи лоскутом аутоперикарда в комбинации с никелид-титановой сеткой (экспериментальное исследование) / Е.Б. Топольницкий, Г.Ц. Дамбаев, Н.А. Шефер, [и др.]. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX. – №3. – С. 97-99.
63. Топольницкий Е.Б. Реконструкция трахеи армированным реваскуляризируемым кишечным аутотрансплантатом (экспериментальное исследование) / Е.Б. Топольницкий, Г.Ц. Дамбаев, В.Э. Гюнтер // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27. – №2. – С. 137-141.
64. Тришкин Д.В. Постинтубационная болезнь трахеи (патогенез, диагностика, эндоскопическое и хирургическое лечение, профилактика). Автореферат дис ... д-ра мед. наук: 14.00.27 / Тришкин Дмитрий Вячеславович. – Пермь, 2007. – 39 с.
65. Фоломеев В.Н., Факторы, способствующие стенозированию трахеи / В.Н. Фоломеев, В.Н. Сотников // Эндоскопическая хирургия. – 2001. – №5. – С. 42-45.
66. Харченко В.П. Резекция бифуркации трахеи при немелкоклеточном раке легкого / В.П. Харченко // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2004. – Т.15. – №4. – С. 51-53.
67. Харченко В.П. Хирургическое лечение рубцовых стенозов трахеи / В.П. Харченко // Российская научно-практическая конференция «Профилактика, диагностика и лечение рубцовых стенозов трахеи». Тез. Докл.; Под ред. М.И. Перельмана. – М., 1999. – С. 59 - 60.
68. Хорошилов И.А. Патент № 2 278 616 С1РФ, МПК А61В 17/00(2006.01). Способ хирургического лечения рубцовых стенозов трахеи / Хорошилов И.А., Соколов А.Г., Деринг Е.В. // Дата подачи заявки: 2005.01.31. Опубликовано: 2006.06.27.

69. Целуйко С.С. 3D биопечать на службе дыхательной системы (обзор литературы) / С.С. Целуйко, В.А. Кушнарев // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – №61. – С. 128-134.
70. Этерия Г.П. Пластические операции на трахее и бронхах / Г.П. Этерия. – Тбилиси: Сабчота Сакартвело, 1986.– 255 с.
71. Юнина А.И. Травмы органов шеи и их осложнения / А.И. Юнина. – М.: Медицина, 1972. – 208 с.
72. Abbott A. Culture of silence and nonchalance protected disgraced trachea surgeon / A. Abbott // International weekly journal of science Nature 2016. – 02 September 2016. – URL: <https://www.nature.com/news/culture-of-silence-and-nonchalance-protected-disgraced-trachea-surgeon-updated-1.20533> (date of request: 25 September 2016).
73. Abouarab A.A. Current Solutions for Long-Segment Tracheal Reconstruction / A.A. Abouarab, H.H. Elsayed, H. Elkhayat, [et al.]. // Ann Thorac Cardiovasc Surg. – 2017. V. 23(2). – P. 66-75. DOI: 10.5761/atcs.ra.16-00251.
74. Al-Khudari S. Osteocutaneous radial forearm reconstruction of large partial cricotracheal defects / S. Al-Khudari, S. Sharma, W. Young, R. Stapp, T.A. Ghanem // Head Neck. – 2013. – V. 35 – P. 254–57. DOI: 10.1002/hed.23088.
75. Backer C.L. Intermediate-term results of the free tracheal autograft for long segment congenital tracheal stenosis / C.L. Backer, C. Mavroudis, M.E. Dunham, L. Holinger // J. Pediatr Surg. – 2000. V. 35(6). – P. 813-819.
76. Backer C.L. Repair of congenital tracheal stenosis with a free tracheal autograft / C.L Backer, C. Mavroudis, M.E. Dunham, L.D. Holinger // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1998. – V. 5(4). – P. 869-74. DOI: 10.1016/S0022-5223(98)70368-X.
77. Baiguera S. Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix. / S. Baiguera, C. Del Gaudio, E. [et al.]. // Biomaterials. – 2014. – V. 35(24). – P. 6344-50. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.070.

78. Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea / *Br J Surg.* – 1950. – V. 38. – P. 200-5. DOI: 10.1002/bjs.18003815008.
79. Bolton W.D. Reconstruction of a Long-Segment Tracheal Defect Using an AlloDerm Conduit / W.D. Bolton, S. Ben-Or, A.L. Hale, J.E. Stephenson // *Innovations (Phila).* – 2017. – V. 12(2). – P. 137-139. DOI: 10.1097/IMI.0000000000000347.
80. Brouwer K.M. Regenerative medicine for the respiratory system: distant future or tomorrow's treatment? / K.M. Brouwer, H.R. Hoogenkamp, W.F. Daamen, T.H. van Kuppevelt. // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2013. V. 187(5) – P. 468-75. DOI: 10.1164/rccm.201208-1558PP.
81. Butler C.R. Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds / C.R. Butler, R.E. Hynds, C. Crowley, [et al.]. // *Biomaterials.* – 2017. – V. 124. – P. 95-105. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.001.
82. Cabiati M. Cardiac tissue regeneration: A preliminary study on carbon-based nanotubes gelatin scaffold / M. Cabiati, F. Vozzi, F. Gemma, [et al.]. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2018. – V. 106(8). – P. 2750-2762. DOI: 10.1002/jbm.b.34056.
83. Cañibano-Hernández A. Alginate Microcapsules Incorporating Hyaluronic Acid Recreate Closer in Vivo Environment for Mesenchymal Stem Cells. / A. Cañibano-Hernández, L. Saenz Del Burgo, A. Espona-Noguera, [et al.]. // *Mol Pharm.* – 2017. – V. 14(7). – P. 2390-2399. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00295.
84. Chan D.S. Bridging the gap: Using 3D printed polycaprolactone implants to reconstruct circumferential tracheal defects in rabbits / D.S. Chan, N. Gabra, A. Baig, [et al.]. // *Laryngoscope.* – 2019. – DOI: 10.1002/lary.28472.
85. Chan J.K. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology / *Int J. Surg. Pathol* // 2014. – V. 22(1) – P. 12-32. DOI: 10.1177/1066896913517939.

86. Charous S.J. Canine subglottic stenosis as a model for excessive fibrosis: a pilot histologic and immunohistochemical analysis / S.J. Charous, R.H. Ossoff, L. Reinisch, J.M. Davidson // *Wound Repair Regen.* – 1996. – V. 4(4). – P. 444-53. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1996.40408.x.
87. Chen Q.K. Reconstruction of the lower trachea using a pedicled autologous bronchial flap. / Q.K. Chen, G.N. Jiang, J.A. Ding, [et al.]. // *Ann Thorac Surg.* – 2010. – V. 89(4). – P. 29–30. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2010.01.059.
88. Chinen T. Experimental Reconstruction of the Trachea with Urinary Bladder Wall / T. Chinen, T. Hirayasu, Y. Kuniyoshi, [et al.]. // *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* – 2016. V. 22(3). – P. 153-60. DOI: 10.5761/atcs.oa.15-00375.
89. Ch'ng S. Reconstruction of the trachea / S. Ch'ng, G.L. Wong, J.R. Clark // *J Reconstr Microsurg.* – 2014. – V. 30(3). – P. 153-62. DOI: 10.1055/s-0033-1358786.
90. Colice G. L. Historical background / Colice G. L. // In Tobin M. J. (ed): *Principles and practice of mechanical ventilation.* – New York. – McGraw-Hill. – 1994 – P. 1-37.
91. Corbascio M. Analysis of clinical outcome of synthetic tracheal transplantation compared to results published in 6 articles by Macchiarini et al. / M. Corbascio, T. Fux, K. Grinnemo, O. Simonsson // *Stockholm: Department of Cardiothoracic Surgery and Anesthesiology, Karolinska University Hospital.* – 2014. – 40 p.
92. David A. Bioresorbable Airway Splint Created with a Three-Dimensional Printer / A. David, Zopf, J. Scott, [et al.]. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – V. 368. – P.2043-2045.
93. Delaere P. [Article in French]. The creation of a vascularized tracheal transplantation. *Bull Mem Acad R Med Belg.* – 2011. – V. 166(10-12). – P. 377-9; discussion 380.

94. Delaere P. Experimental tracheal revascularization and transplantation / P. Delaere, Z. Liu, L. Feenstra // *Acta Otorhinolaryngol Belg.* – 1995. – V. 49(4). – P. 407-413.
95. Delaere P. Learning curve in tracheal allotransplantation / P. Delaere, J.J. Vranckx, J. Meulemans, [et al.]. // *Am J Transplant.* – 2012 – V. 12. – P. 2538–45. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04125.x
96. Delaere P. Leuven Tracheal Transplant Group. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy / P. Delaere, J.J. Vranckx, G. Verleden, [et al.]. // *Engl J Med.* – 2010 – V. 362. – P. 138-45.
97. Delaere P. Tracheal allotransplantation and regeneration / P. Delaere, M. Molitor. // *Acta Chir Plast.* Fall 2016. – V. 58(1) – P. 29-38.
98. Delaere P. Tracheal stenosis treated with vascularized mucosa and short-term stenting / P. Delaere, R. Hierner, J.J. Vranckx, R. Hermans // *Laryngoscope.* – 2005. V. 115. – P. 1132–34.
99. Delaere P. Tubes of vascularized cartilage used for replacement of rabbit cervical trachea / P. Delaere, J. Hardillo // *The Annals of otology, rhinology, and laryngology.* – 2003. V. 112. – P. 807-12. DOI: 10.1177/000348940311200911
100. Delaere P., Tracheal replacement / P. Delaere, D.J. Van Raemdonck // *Thorac Dis.* – 2016. V. 8 (Suppl 2). – P. 186-96. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.85.
101. Delaere P.R. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation / P.R. Delaere, Z.Y. Liu, R. Hermans // *J. Thoracic Cardiovasc Surg.* – 1995. – V. 110(3). – P. 728-737. DOI: 10.1016/S0022-5223(95)70105-2
102. Delaere P.R. Prefabrication of composite tissue for improved tracheal reconstruction / P.R. Delaere, J. Hardillo, R. Hermans, B. Van Den Hof. // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 2001. – V. 110. – P. 849–60.
103. Delaere P.R. Tracheal allograft after withdrawal of immunosuppressive therapy. / P.R. Delaere, J.J. Vranckx, M. Den Hondt, Leuven Tracheal

- Transplant Group // *N Engl J Med.* – 2014. – V. 370. – P. 1568–70. DOI: 10.1056/NEJMc1315273.
104. Den Hondt M. Reconstruction of defects of the trachea / M. Den Hondt, J.J. Vranckx. // *J Mater Sci Mater Med.* – 2017. – V. 28(2). – 24. DOI: 10.1007/s10856-016-5835-x.
 105. Den Hondt M. Twenty years of experience with the rabbit model, a versatile model for tracheal transplantation research / M. Den Hondt, B. Vanaudenaerde, P. Delaere, J.J. Vranckx // *Plast Aesthet Res.* – 2016. – V. 3. – P. 223–30.
 106. Dennis J.E. Tissue engineering of a composite trachea construct using autologous rabbit chondrocytes / J.E. Dennis, K.G. Bernardi, T.J. Kean, [et al.]. // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2017. DOI: 10.1002/term.2523.
 107. Dhasmana A. Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration "Tracheal tissue engineering: an overview" / A. Dhasmana, A. Singh, S. Rawal // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2020. V. 14(5). – P. 653-672. DOI: 10.1002/term.3019.
 108. Elliot M.J. Tracheal reconstruction in children using cadaverie homograft trachea/ M.J. Elliot, M.P. Haw, J.P. Jacobs. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 1996. – V. 10(9). – P. 707-712.
 109. Elliott M.J. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study / M.J. Elliott, P. De Coppi, S. Spegginorin, [et al.]. // *Lancet.* – 2012. – V. 380. – P. 994-1000.
 110. Epstein S. K. Late Complications of Tracheostomy / K. S. Epstein // *Respiratory care.* – 2005. – V. 50 (4). – P. 542-549.
 111. Ezemba N. Postintubation tracheal stenosis: Surgical management / N. Ezemba, C.P. Echieh, E.N. Chime, [et al.]. // *Niger J Clin Pract.* – 2019. – V. 22(1). – P. 134-137. DOI: 10.4103/njcp.njcp_288_18.
 112. Fabre D. Successful tracheal replacement in humans using autologous tissues: an 8-year experience / D. Fabre, F. Kolb, E. Fadel, [et al.]. // *Ann Thorac Surg.* – 2013. – V. 96. – P. 1146–55.

113. Fanous N. Anterior pericardial tracheoplasty for long-segment tracheal stenosis: long-term outcomes / N. Fanous, S.A. Husain, M. Ruzmetov, [et al.]. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2010. – V. 139. – P. 18-23.
114. Feist, J.H. Acquired tracheomalacia: etiology and differential diagnosis / J.H. Feist, T.H. Johnson, R. J. Wilson // *CHEST.* – 1975. – V. 68(3). – P. 340-345.
115. Fishman J.M. Airway tissue engineering: an update. / J.M. Fishman, K. Wiles, M.W. Lowdell, [et al.]. // *Expert Opin Biol Ther.* – 2014. – V. 14(10). – P. 1477-91. DOI: 10.1517/14712598.2014.938631.
116. Fu Wei. Patent 105853022 CN. Tracheal stent, tissue engineering trachea adopting tracheal stent and application of tracheal stent and tissue engineering trachea / Application 2016-06-01. Published 2016-08-17.
117. Fulco I. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial / I. Fulco, S. Miot, M.D. Haug, [et al.]. // *The Lancet.* – 2014. – V. 384(9940). – P. 337-46. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60544-4.
118. Gao B. Long-segmental tracheal reconstruction in rabbits with pedicled Tissue-engineered trachea based on a 3D-printed scaffold / B. Gao, H. Jing, M. Gao, [et al.]. // *J. Acta Biomater.* – 2019. – V. 97. – P. 177-186. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.043.
119. Gilbert T.W. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – P. 3675–83. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
120. Gillespie N.A. The history of endotracheal anaesthesia. In: Gillespie N.A. (ed.) *Endotracheal anaesthesia.* – 2-nd edn. – New York, 1948: University of Wisconsin Press, Madison – P. 67-84.
121. Gonfiotti A. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results / A. Gonfiotti, M.O. Jaus, D. Barale, [et al.]. // *Lancet.* – 2014. – V. 383. – P. 238–44.

122. Grillo H.C. Surgery of the trachea / H.C. Grillo // *Curr Probl Surg.* – 1970. – P. 3-59.
123. Grillo H.C. Tracheal replacement: a critical review. / H.C. Grillo // *Ann Thorac Surg.* – 2002. – V. 73. – P. 1995–2004.
124. Guan X. Development of hydrogels for regenerative engineering / X. Guan, M. Avci-Adali, E. Alarçin, [et al.]. // *Biotechnol J.* – 2017. – V. 12(5). DOI:10.1002/biot.201600394.
125. Guimaraes A.B. Evaluation of a Physical-Chemical Protocol for Porcine Tracheal Decellularization / A.B. Guimaraes, A.T. Correia, B.P. Alves, [et al.]. // *Transplant Proc.* 2019. – V. 51(5). – P. 1611-1613. DOI: 10.1016/j.transproceed.2019.01.042.
126. Hamilton N.J.I. Using a Three-Dimensional Collagen Matrix to Deliver Respiratory Progenitor Cells to Decellularized Trachea In Vivo. / N.J.I. Hamilton, R.E. Hynds, K.H.C. Gowers [et al.]. // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2019. – V. 25(2). – P. 93-102. DOI: 10.1089/ten.
127. Hardillo J, Vanclooster C, Delaere PR. An investigation of airway wound healing using a novel in vivo model / J. Hardillo, C. Vanclooster, P.R. Delaere. // *Laryngoscope.* – 2001. V. 111. – P. 1174–1182.
128. Hardillo J.A. Transplantation of tracheal autografts: is a two-stage procedure necessary? / J.A. Hardillo, Poorten V. Vander, P.R. Delaere. // *Acta Otorhinolaryngol Beig.* – 2000. – V. 54(1). – P. 13-21.
129. Haykal S. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols / S. Haykal, J.P. Soleas, M. Salna, [et al.]. // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2012. – V. 18. – P. 614-23.
130. Herberhold C. Long-term result of homograft reconstruction of the trachea in childhood / C. Herberhold, M. Stein, M. Falkenhausen // *Laryngorhinootologie.* – 1999. – V. 78(12). – P. 692 - 696.
131. Hewitt R.J., Butler C.R., Maughan EF, Elliott M/J. Congenital tracheobronchial stenosis / R.J. Hewitt, C.R. Butler, E.F. Maughan,

- M.J. Elliott // *Semin Pediatr Surg.* – 2016. – V. 25(3). – P. 144-9. DOI: 10.1053/j.sempedsurg.2016.02.007.
132. Hirsch T. Implant for autologous soft tissue reconstruction using an adipose-derived stem cell-colonized alginate scaffold / T. Hirsch, C. Laemmle, B. Behr, [et al.]. // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2018. – V. 71(1). – P. 101-111. DOI: 10.1016/j.bjps.2017.08.009.
133. Hong H. Digital light processing 3D printed silk fibroin hydrogel for cartilage tissue engineering / H. Hong, Y.B. Seo, D.Y. Kim, [et al.]. // *Biomaterials.* – 2020. – V. 232. – 119679. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119679.
134. Hung S.H. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization / S.H. Hung, C.H. Su, S.E. Lin, H. Tseng. // *Laryngoscope.* – 2016. – V. 126(11). – P. 2520-2527. DOI: 10.1002/lary.25932.
135. Johnson C.M. The feasibility of gamma radiation sterilization for decellularized tracheal grafts / C.M. Johnson, D. Guo, S. Ryals, [et al.]. // *Laryngoscope.* – 2017. – V. 127(8). – P. 258-264. DOI: 10.1002/lary.26367.
136. Jung S.Y. Biofabrication. 3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: a pilot animal study / S.Y. Jung, S.J. Lee, H.Y. Kim, [et al.]. – 2016. – V. 8(4).
137. Jungebluth P. Tissue-engineered airway: a regenerative solution / P. Jungebluth, G. Moll, S. Baiguera, P. Macchiarini // *Clin Pharmacol Ther.* – 2012. – V. 91. – P 81-93. DOI: 10.1038/clpt.2011.270
138. Jungebluth P. Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study / P. Jungebluth, E. Alici, S. Baiguera, [et al.]. // *Lancet.* – 2011. – V. 378. – P. 1997-2004.
139. Kanzaki M. Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea / M. Kanzaki, M. Yamato, H. Hatakeyama, [et al.]. // *Tissue Eng.* – 2006. – V. 12. P. 1275-1283.

140. Kashiwa K. Reconstruction of the cervical trachea using a prefabricated corticoperiosteal flap from the femur / K. Kashiwa, S. Kobayashi, H. Tono, [et al.]. // *Ann Plast Surg.* – 2009. – V. 62. – P. 633–36.
141. Kim I.G. Transplantation of a 3D-printed tracheal graft combined with iPS cell-derived MSCs and chondrocytes / I.G. Kim, S.A. Park, S.H. Lee, [et al.]. // *Sci Rep.* – 2020. – 10(1). DOI: 10.1038/s41598-020-61405-4.
142. Kim S.S. Changes in Tracheostomy- and Intubation-Related Tracheal Stenosis: Implications for Surgery. / S.S. Kim, Z. Khalpey, C. Hsu, A.G. Little // *Ann Thorac Surg.* – 2017. – V. 104(3). – P. 964-970. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2017.03.063.
143. Kim W.S. Tracheal reconstruction with a free vascularized myofascial flap: preclinical investigation in a porcine model to human clinical application / W.S. Kim, J.W. Chang, W.S. Jang, [et al.]. // *Sci Rep.* – 2017. – V. 30; 7(1). DOI: 10.1038/s41598-017-10733-z.
144. Klepetko W. Heterotopic trachea transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft / W. Klepetko, G.M. Marta, W. Wisser, [et al.]. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2004. – V. 127. – P. 862-67. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.07.050.
145. Kojima K. Tissue engineering in the trachea / K. Kojima, CA. Vacanti // *Anat Rec (Hoboken).* – 2014. – V. 297(1). – P. 44-50. DOI: 10.1002/ar.22799.
146. Kubo T. Immediate tracheal reconstruction with forearm flap and bone graft / T. Kubo, T. Kurita, H. Tashima, [et al.]. // *Microsurgery.* – 2018. – DOI: 10.1002/micr.30365.
147. Küster E. Über narbige Stenosen der Trachea / E. Küster // *Zentralbl. Chir.* – 1886. – V. 13. – P. 759-760.
148. Law J.X. Tissue-engineered trachea: A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* / J.X. Law, L.L. Liau, B.S. Aminuddin, B.H. Ruszymah // 2016. – V. 91. – P. 55-63. DOI: 10.1016/j.ijporl.2016.10.012.

149. Lenot B. Tracheal transplantation: an experimental technique with revascularization and venous drainage // B. Lenot, P. Macchiarini, P. Dartvelle // *Transplant Proc.* – 1995. – V. 27(2). – P. 1684-1685.
150. Liu J. Free posterior tibial artery perforator flap for 2-stage tracheal reconstruction in patients after resection of well-differentiated thyroid carcinoma invading the trachea / J. Liu, D. Lu, D. Deng, [et al.]. // *Head Neck.* – 2019. – V. 41(7). – P. 2249-2255. DOI: 10.1002/hed.25675.
151. Liu Y. Collagen-conjugated tracheal prosthesis tested in dogs without omental wrapping and silicone stenting / Y. Liu, T. Lu, Y. Zhang, [et al.]. // *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* – 2016. – V. 23(5). – P. 710-715. DOI: 10.1093/icvts/ivw240.
152. Luo X. Long-term functional reconstruction of segmental tracheal defect by pedicled tissue-engineered trachea in rabbits / X. Luo, Y. Liu, Z. Zhang, [et al.]. // *Biomaterials.* – 2013. – V. 34(13). – P. 3336-44. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.060.
153. Lynch T.J. Submucosal Gland Myoepithelial Cells Are Reserve Stem Cells That Can Regenerate Mouse Tracheal Epithelium / T.J. Lynch, P.J. Anderson, P.G. Rotti, [et al.]. // *Cell Stem Cell.* – 2018. – V. 3;22(5). – P. 653-667. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.017.
154. Macchiarini P. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway / P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, [et al.]. // *Lancet.* – 2008. – V. 372. – P. 2023–30. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61598-6.
155. Martinod E. Airway transplantation: a challenge for regenerative medicine / E. Martinod, A. Seguin, D.M. Radu, [et al.]. // *Eur J Med Res.* – 2013. – V. 18. – 25 p. DOI: 10.1186/2047-783X-18-25.
156. Moisenovich M.M. Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds / M.M. Moisenovich, O. Pustovalova, J. Shackelford [et al.]. // *Biomaterials.* 2012. – V. 33(15). P. 3887-98. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013.

157. Mumme M. Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial / M. Mumme, A. Barbero, S. Miot, [et al.]. // *The Lancet* – 2016. – V. 388 (10055). DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31658-0.
158. Mundi N. Closure of tracheocutaneous fistula using prefabricated conchal bowl cartilage and a supraclavicular flap / N. Mundi, K.B. Patel, D.H. Yeh, A.C. Nichols // *J Laryngol Otol.* – 2019. – V. 133(8). P. 727-729. DOI: 10.1017/S0022215119001427.
159. Musso C.G. Imhotep: the dean among the ancient Egyptian physicians. / C.G. Musso // *Humane Medicine Health Care.* – 2005. – 5: 169.
160. Nakaegawa Y. Effect of Structural Differences in Collagen Sponge Scaffolds on Tracheal Epithelium Regeneration / Y. Nakaegawa, R. Nakamura, Y. Tada, [et al.]. // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 2016. – V. 125(2). P. 115-22. DOI: 10.1177/0003489415599991.
161. Nakamura R. Evaluation of Cilia Function in Rat Trachea Reconstructed Using Collagen Sponge Scaffold Seeded with Adipose Tissue-Derived Stem Cells / R. Nakamura, T. Katsuno, I. Tateya, [et al.]. // 2020. – V. 303(3). – P. 471-477. DOI: 10.1002/ar.24104.
162. Nakanishi R. Revascularization of trachea in lung and tracheal transplantation / R. Nakanishi // *Clin Transplant.* – 2007. – V. 21(5). – P. 668-74. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2007.00752.
163. Nemska S., Daubeuf F., Frossard N. Revascularization of the graft in obliterative bronchiolitis after heterotopic tracheal transplantation / S. Nemska, F. Daubeuf, N. Frossard. // *Physiol Rep.* – 2016. – V. 4(4). DOI: 10.14814/phy2.12690.
164. Ninkovic M. One-stage reconstruction of tracheal defects with the medial femoral condyle corticoperiosteal-cutaneous free flap / M. Ninkovic, H. Buerger, D. Ehrl, U. Dornseifer // *Head Neck.* – 2016. – DOI: 10.1002/hed.24491.

165. Nomoto Y. Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium / Y.Nomoto, T. Suzuki, Y. Tada, [et al.]. // *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006. – V. 115. P. 501-506.
166. Omori K. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea / K. Omori, Y. Tada, T. Suzuki, [et al.]. // *Ann Otol Rhinol Laryngol*. – 2008. – V. 117. – P. 673-78. DOI: 10.1177/000348940811700908.
167. Orlando G. Organ bioengineering and regeneration as the new Holy Grail for organ transplantation / G. Orlando, S. Soker, R.J. Stratta // *Ann Surg*. – 2013. – V. 258. P. 221–32.
168. Ott LM. Overview of tracheal tissue engineering: clinical need drives the laboratory approach / L.M. Ott, R.A. Weatherly, M.S. Detamore // *Ann Biomed Eng*. – 2011. – V. 39. – P. 2091-113.
169. Papla B. Post-Intubation Tracheal Stenosis - Morphological-Clinical Investigations / B. Papla, G. Dyduch, W. Frasik, H. Olechnowicz // *Pol J Pathol*. – 2003. – V. 54: 4. – P. 261-266.
170. Partington L. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds / L. Partington, N.J. Mordan, C. Mason, [et al.]. // *Acta Biomater*. – 2013. – V. 9. – P. 5251–61.
171. Peng Q. Reconstruction of Long Noncircumferential Tracheal or Carinal Resections With Bronchial Flaps / Q. Peng, L. Zhang, Y. Ren, [et al.]. // *Ann Thorac Surg*. – 2019. – V. 108(2). – P. 417-423. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2019.02.057.
172. Ratnovsky A. Mechanical properties of different airway stents / A. Ratnovsky, N. Regev, S. Wald, [et al.]. // *Med Eng Phys*. – 2015. – V. 37(4). – P. 408-15. DOI: 10.1016/j.medengphy.2015.02.008.
173. Risbud M. Biocompatible hydrogel supports the growth of respiratory epithelial cells: possibilities in tracheal tissue engineering / M. Risbud,

- M. Endres, J. Ringe, [et al.]. // *J Biomed Mater Res.* – 2001. – V. 56(1). – P. 120-7.
174. Ścierski W. Reconstruction of Ovine Trachea with a Biomimetic Composite Biomaterial / W. Ścierski, G. Lisowska, G. Namysłowski, [et al.]. // *Biomed Res Int.* – 2018. DOI: 10.1155/2018/2610637.
175. Sesterhenn K. Die Trachealtransplantation in Tierexperiment / K. Sesterhenn, K.G. Rose // *Laryng. Rhinol.* – 1977. – V. 56. – P. 643 - 649.
176. Shin Y.S. Tissue-engineered tracheal reconstruction using mesenchymal stem cells seeded on a porcine cartilage powder scaffold / Y.S. Shin, J.W. Choi, J.K. Park, [et al.]. // *Ann Biomed Eng.* – 2015. – V. 43(4). – P. 1003-13. DOI: 10.1007/s10439-014-1126-1.
177. Suzuki R. Optimal bovine collagen concentration to achieve tracheal epithelial coverage of collagen sponges / R. Suzuki, R. Nakamura, Y. Nakaegawa, [et al.]. // *Laryngoscope.* – 2016. – V. 126(12). – P. 396-403. DOI: 10.1002/lary.25989.
178. Szmuk P. A brief history of tracheostomy and trachealintubation, from the Bronze Age to the Space Age / P. Szmuk, T. Ezri, S. Evron, [et al.]. // *J. Intensive Care Med.* – 2008. – V. 34. P. – 222-228.
179. Tan Q.W. Hydrogel derived from decellularized porcine adipose tissue as a promising biomaterial for soft tissue augmentation / Q.W. Tan, Y. Zhang, J.C. Luo, [et al.]. // *J Biomed Mater Res A.* – 2017. – V. 105(6). – P. 1756-1764. DOI: 10.1002/jbm.a.36025.
180. Tani A. Regenerative process of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge scaffold / A. Tani, Y. Tada, Takezawa [et al.]. // *Laryngoscope.* – 2013. – V. 123(6). – P. 1469-73. DOI: 10.1002/lary.23742.
181. Teixeira da Silva J.A. Ethical ramifications of the Paolo Macchiarini case / J.A. Teixeira da Silva // *Indian J Med Ethics.* – 2017. – P. 1-5.
182. The World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki 1964. <https://www.wma.net>. (date of request: 30 September 2017,).

183. Tran J, Zafereo M. Segmental tracheal resection (nine rings) and reconstruction for carcinoma showing thymus-like differentiation (CASTLE) of the thyroid / J. Tran, M. Zafereo // *Head Neck*. – 2019. – V. 41(9). – P. 3478-3481. DOI: 10.1002/hed.25846.
184. Vadalà G. Clinically relevant hydrogel-based on hyaluronic acid and platelet rich plasma as a carrier for mesenchymal stem cells: Rheological and biological characterization / G. Vadalà, F. Russo, M. Musumeci, [et al.]. // *J Orthop Res*. – 2017. – V. 35(10). – P. 2109-2116. DOI: 10.1002/jor.23509.
185. Varma R. Optimal biomaterials for tracheal epithelial grafts: An in vitro systematic comparative analysis / R. Varma, F.G. Aoki, K. Soon, [et al.]. // *Acta Biomater*. – 2018. – V.81. – P. 146-157. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.09.048.
186. Vearick S.B. Fiber-reinforced silicone for tracheobronchial stents: An experimental study / S.B. Vearick, K.B. Demétrio, R.G. Xavier, [et al.]. // *J Mech Behav Biomed Mater*. – 2018. – V. 77. – P. 494-500. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.10.013.
187. Vogel G. Former star surgeon's disgrace rocks Swedish science / G. Vogel // *Science*. – 2016. – V. 353(6305). – P. 1193-4. DOI: 10.1126/science.353.6305.1193.
188. Wang L. Adult Stem Cells and Hydrogels for Cartilage Regeneration // L. Wang, C. Huang, Q. Li, [et al.]. // *Curr Stem Cell Res Ther*. – 2017. DOI: 10.2174/1574888X12666170511142917.
189. Watkinson J.J. Tracheostomy. In: *Stell and Maran's head and neck surgery*, 4th edn. / J.J. Watkinson, M.N. Gaz, J.A. Wilson // Butterworth Heinemann. – 2000. – P. 153-168.
190. Weidenbecher M. Hyaluronan-based scaffolds to tissue-engineer cartilage implants for laryngotracheal reconstruction / M. Weidenbecher, J.H. Henderson, H.M. Tucker, [et al.]. // *Laryngoscope*. – 2007. – V. 117. – P. 1745–49. DOI: 10.1097/MLG.0b013e31811434ae

191. Weinstein-Oppenheimer C.R. Design of a hybrid biomaterial for tissue engineering: Biopolymer-scaffold integrated with an autologous hydrogel carrying mesenchymal stem-cells / C.R. Weinstein-Oppenheimer, D.I. Brown, R. Coloma, [et al.]. // *Mater Sci Eng C Mater Biol.* –2017. – V. 79. – P. 821-830. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.116.
192. Weiss D.J. Tracheal bioengineering: the next steps. Proceeds of an International Society of Cell Therapy Pulmonary Cellular Therapy Signature Series Workshop, Paris, France, April 22, 2014 / D.J. Weiss, M. Elliott, Q/Jang, [et al.]. // 2014. – *Cytherapy.* – V. 16. – P. 1601-13. DOI: 10.1016/j.jcyt.2014.10.012.
193. Wenig B.L. Tracheal reconstruction: in vitro und in vivo animal pilot study / B.L. Wenig, V.C. Reuter, B.M. Steinberg, E.W. Strong. // *Laryngoscope.* – 1987. – V. 97. – P. 959-965.
194. Wiggenhauser P.S. Cartilage engineering in reconstructive surgery: auricular, nasal and tracheal engineering from a surgical perspective. / P.S. Wiggenhauser, J.T. Schantz, N. Rotter // *RegenMed.* – 2017. – V. 12(3). – P. 303-314. DOI: 10.2217/rme-2016-0160.
195. Wurtz A. Surgical technique and results of tracheal and carinal replacement with aortic allografts for salivary gland-type carcinoma / A. Wurtz, H. Porte, M. Conti, [et al.]. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 2010. – V. 140. – P. 387-93.
196. Wurtz A. Tracheal reconstruction with a composite graft: fascial flap-wrapped allogenic aorta with external cartilage-ring support / A. Wurtz, I. Hysi, E. Kipnis, [et al.]. // *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* – 2013. – V. 16(1). – P. 37-43. DOI:10.1093/icvts/ivs422.
197. Wurtz A. Tracheal replacement with aortic allografts / A. Wurtz, H. Porte, M. Conti, [et al.]. // *Engl J Med.* – 2006. V. 355. – P. 1938–40.
198. Xie H. Repair of a defect in the cervical trachea with thyroid-pericardium flap: A case report / H. Xie, Y. Zhang, F. Yu, X. Wang. – *Medicine (Baltimore).* – 2019. – V. 98(46). DOI: 10.1097/MD.0000000000017871.

199. Xu L. Human tracheal allotransplant with greater omentum for revascularization / L. Xu, S. Zhang, J. Li, [et al.]. // *Exp Clin Transplant.* – 2014. – V. 12(5). – P. 448-53.
200. Xu Y. Surface modification of decellularized trachea matrix with collagen and laser micropore technique to promote cartilage regeneration / Y. Xu, Y. Li, Y. Liu , [et al.]. // *Am J Transl Res.* – 2019. – V. 11(9). – P. 5390-5403.
201. Xu Y. Tissue-engineered trachea regeneration using decellularized trachea matrix treated with laser micropore technique / Y. Xu, D. Li, Z. Yin, [et al.]. // *Acta Biomater.* – 2017. V. 58. – P. 113-121. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.05.010.
202. Yamamoto S. Successful silicon stent for life-threatening tracheal wall laceration / S. Yamamoto, S. Endo, T. Endo, S. Mitsuda. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* – 2013. – V. 19(1). – P. 49-51.
203. Yan B. PLGA-PTMC-Cultured Bone Mesenchymal Stem Cell Scaffold Enhances Cartilage Regeneration in Tissue-Engineered Tracheal Transplantation / B. Yan, Z. Zhang, X. Wang [et al.]. // *Artif Organs.* – 2017. V.0 41(5). – P. 461-469. DOI: 10.1111/aor.12805.
204. Yazdanbakhsh A.P. Long-term follow-up of tracheoplasty using autologous pericardial patch and strips of costal cartilage / A.P. Yazdanbakhsh, L.B. van Rijssen, D.R. Koolbergen, [et al.]. // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2015. – V. 47. P. 146–52.
205. Yu P. Human Tracheal Reconstruction With a Composite Radial Forearm Free Flap and Prosthesis / P. Yu, G.L. Clayman, G.L. Walsh. // *Ann Thorac Surg.* – 2006. – V. 81. – P. 714–16.
206. Zang M. Perichondrium directed cartilage formation in silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tracheal transplantation / M. Zang, Q. Zhang, G. Davis, [et al.]. // *Acta Biomater.* – 2011. – V. 7(9). – P. 3422-31. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.05.012.

207. Zhang F. Research progress of decellularized matrix in tissue engineered trachea transplantation. [Article in Chinese] / F. Zhang, W. Zhang, H. Shi. // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2013. – V. 27(2). – P. 223-6.
208. Zhang H. Re-epithelialization: a key element in tracheal tissue engineering / H. Zhang, W. Fu, Z. Xu // *Regen Med.* – 2015. – V. 10(8). – P. 1005-23. DOI: 10.2217/rme.15.68.
209. Zhang S. Airway reconstruction with autologous pulmonary tissue flap and an elastic metallic stent / S. Zhang, Z. Liu. // *World J Surg.* – 2015. – V. 39. – P. 1981-85.
210. Zhong Y. In vivo transplantation of stem cells with a genipin linked scaffold for tracheal construction / Y. Zhong, W. Yang, Z. Yin Pan, [et al.]. // *J Biomater.* – 2019. V. 34(1). – P. 47-60. DOI: 10.1177/0885328219839193.
211. Zopf D.A. Bioresorbable Airway Splint Created with a Three-Dimensional Printer / D.A. Zopf, S.J. Hollister, M.E. Nelson [et al.]. // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – 368. – P. 2043-2045. DOI: 10.1056/NEJMc1206319