

*На правах рукописи*

**ДЕНИСОВА**

Анна Валентиновна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ  
ПЛАСТИКИ ДЕФЕКТА ТРАХЕИ  
С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

14.01.17 – Хирургия

Москва - 2021

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Дыдыкин Сергей Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Акопов Андрей Леонидович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел торакальной хирургии научно-исследовательского института хирургии и неотложной медицины, руководитель отдела

**Тарабрин Евгений Александрович** – доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», научное отделение неотложной торакоабдоминальной хирургии, заведующий научным отделением

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

Защита диссертации состоится « 19 » апреля 2021 г. в 14.00. на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**Ученый секретарь:**

диссертационного совета ДСУ 208.001.03

доктор медицинских наук, профессор



**Семиков Василий Иванович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Вопреки стремительному развитию медицины, протяженные дефекты нижних дыхательных путей продолжают оставаться нерешенной задачей хирургии. Распознать и вылечить на ранней стадии заболевания, ведущие к формированию стриктур трахеобронхиального дерева, не всегда возможно. Причинами обширных поражений воздухоносных путей могут быть инфекционные заболевания, травмы, ожоги, новообразования 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; Epstein S.K., 2005; Паршин В.Д., 2006, 2007; Герасимов С.С. и др., 2014).

Проблема закрытия дефектов нижних дыхательных путей, в частности трахеи, 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). Циркулярная резекция трахеи является операцией выбора, однако с ростом числа пораженных колец снижаются шансы на успех (Кузьмичев А.П. и др., 1967; Харченко В.П., 1999). Синтетические и биологические протезы, аутооттрансплантаты не зарекомендовали себя в качестве универсальной техники замещения протяженных дефектов трахеи и бронхов. Аллотрансплантация ограничена медицинскими показаниями, религиозными убеждениями, сложностями правового регулирования и неготовностью населения к посмертному донорству (Готье С.В., 2016). Эти трудности создают весомые предпосылки к поиску новых способов замещения повреждений нижних дыхательных путей. Общеизвестным хирургическим техникам достойную конкуренцию могут составить передовые методики лечения, базирующиеся на достижениях регенеративной медицины (Fishman J.M. et al., 2014; Zhang H. et al., 2015). Получают все большую популярность в лабораторных и клинических условиях клеточно-инженерные конструкции (КИК) (Omori K. et al., 2008; Ott L.M. et al., 2011;

Luo X. et. al., 2013; Kojima K. et al., 2014; Law J.X. et al., 2016; Александров и др., 2017; Gao B. et al., 2019; Hamilton N.J.I., et al., 2019; Dhasmana A. et al., 2020). Поиски универсального способа пластики дефектов нижних дыхательных путей насущны 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 КИК для замещения дефекта.
5. Провести сравнительный анализ различных способов фиксации КИК 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 слизистой подслизистой трахеи при помощи КИК, фиксированной стентом, может служить основой для практического применения метода в клинической практике. Возможно продолжение эксперимента по усовершенствованию методики в направлении замещения циркулярных и мультифокальных дефектов нижних дыхательных путей. Модель пластики трахеи при помощи КИК и стента перспективна как универсальный эквивалент 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 им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. 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 эксперименте установлены размеры критического дефекта стенки трахеи кролика, при которых самозаживление невозможно. Повреждение слизистой подслизистой 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 слизистой подслизистой трахеи, который основан на прочной фиксации КИК в зоне поражения при помощи стента. Предложенный метод реконструкции может стать эффективной альтернативой инвазивному лечению протяженных эпителиальных дефектов нижних дыхательных путей.

### **Личный вклад автора в исследование**

Диссертантом сформулированы основные положения, разработан дизайн исследования, осуществлен поиск материалов по вопросам

реконструктивной хирургии нижних дыхательных путей, выполнен анализ последних тенденций в этой области. Диссертантом проведены все типы описанных хирургических вмешательств, и выполнен скрупулезный анализ полученных данных, изложены выводы, даны практические рекомендации.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов эксперимента подтверждается достаточным количеством наблюдений. Для наглядности представлены таблицы, графики, диаграммы, фотографии. Выдвинутые в работе умозаключения обоснованы статистическими расчетами. Результаты исследований были представлены на следующих конференциях, конгрессах, симпозиумах: Научные конференции кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) 2017-2020 гг.; 9th ISCAA World Congress from 9th to 12th September 2017. (Innsbruck, Tyrol, Austria); III Российский национальный конгресс "Трансплантация и донорство органов» 2-4 октября 2017 г. (Москва, Россия); XXVI International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) from 5th to 7th July 2018. (Prague, Czech); 10th ISCAA World Congress from 13th to 16th September 2018. (Moscow, Russia); 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 31th October 2020. (Chisinau, Moldova); 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 им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 22 июня 2020 года.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

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

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация представлена на 153 страницах и содержит введение, пять глав, заключение, выводы, практические рекомендации, использованную литературу из 211 источников (71 отечественных и 140 зарубежных). В работе представлены 7 таблиц, 72 рисунка.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из которых 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ при Минобрнауки РФ, 1- в журнале индексируемом международной системой цитирования SCOPUS, 1 патент на изобретение Российской Федерации.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы**

#### **Дизайн исследования**

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

Первый этап посвящен анализу мировых разработок в реконструктивно-восстановительной хирургии нижних дыхательных путей. Выявлены перспективные направления замещения протяженных дефектов трахеи с помощью КИК, проанализированы способы фиксации биоматрикса. Выбран оптимальный вариант анестезиологического пособия. Определены параметры контроля: частота дыхательных движений (ЧДД), частота сердечных сокращений (ЧСС), температура тела, уровень лейкоцитов.

Сформулированные протоколы эксперимента представлены в Локальный этический комитет ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Заседание от 5 февраля 2020 года постановило одобрить (выписка из протокола № 02-20). На втором этапе эксперимента сформирован алгоритм выполнения операций (Рисунок 1).

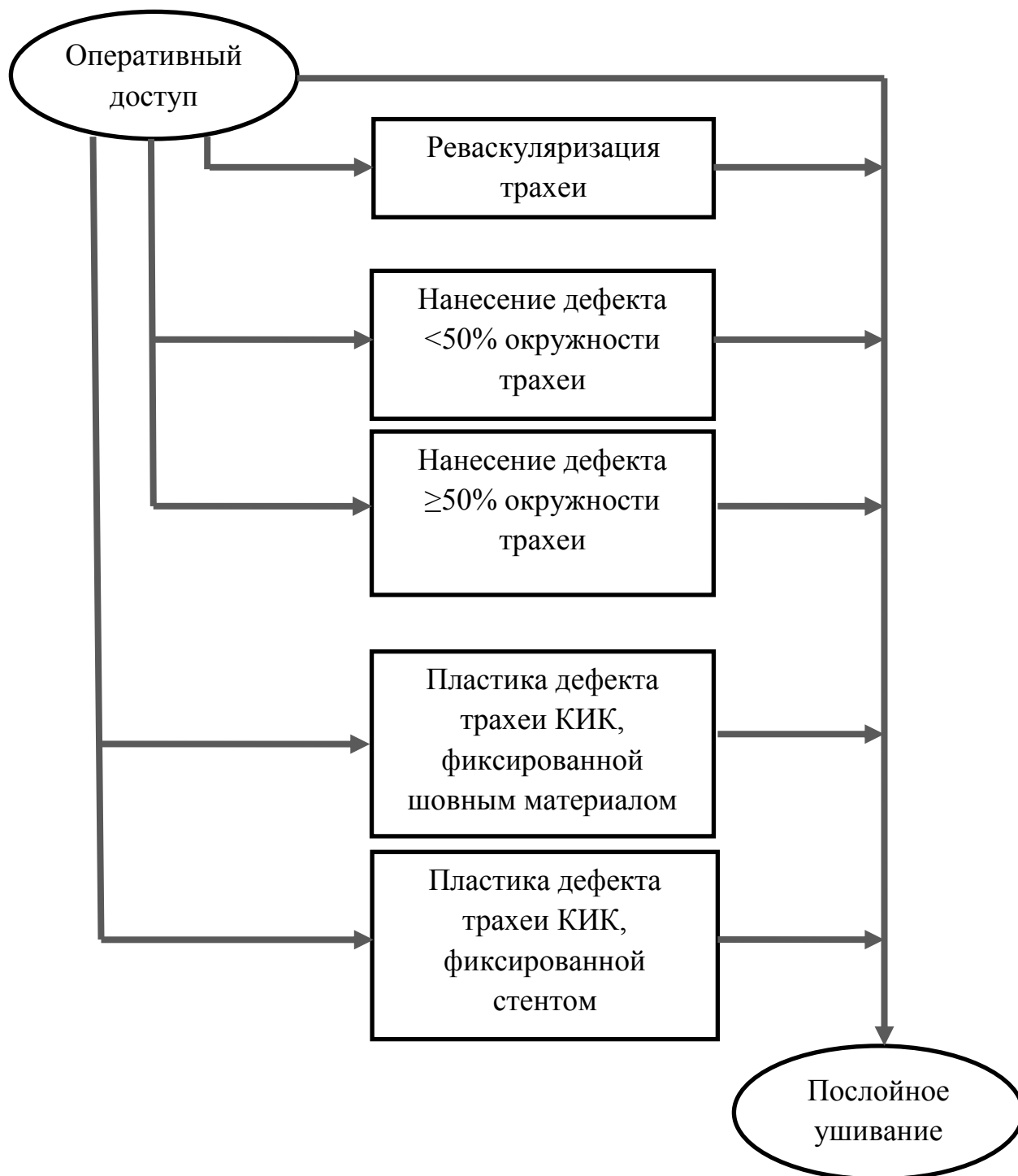


Рисунок 1. Алгоритм выполнения хирургических операций



На третьем этапе дана оценка роли реваскуляризации в репарации оболочек трахеи. Разработан оптимальный способ повреждения трахеи и смоделирован ее критический дефект. Четвертый этап связан с имплантацией КИК и методами ее фиксации. На пятом этапе проведена интерпретация полученных результатов и статистический анализ, которые послужили основой для построения выводов и формирования рекомендаций.

### **Характеристика лабораторных животных**

В качестве животной модели использовали кроликов породы Шиншилла (*Oryctolagus Chinchilla*) весом около 4 кг в возрасте  $12 \pm 1$  мес. Хирургическое вмешательство проведено 41 животному.

### **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».

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **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, как дополнительно можно стимулировать заживление. Создана группа I «Реваскуляризация трахеи» ( $n=8$ ) с целью оценки роли реваскуляризации в репаративных процессах трахеи.

**Ход операции в группе I.** В положении кролика на спине разрез на шее производили по средней линии. Так как реваскуляризация трахеи достигалась путем подтягивания и окутывания ее лоскутом фасции груди на сосудистой

ножке, то при переходе на грудную клетку разрез отклоняли от средней линии в сторону противоположную той, где планировалось формирование лоскута, чтобы не повредить питающие его сосуды. Послойно препарировали мягкие ткани. Участок мобилизованной трахеи размерами 2,0x1,0 см лишали внешнего кровоснабжения и оборачивали сформированным фасциальным лоскутом на питающей ножке. Лоскут фиксировали к трахее шовным материалом. Обеспечив гемостаз, рану послойно ушивали (Рисунок 2).



Рисунок 2. Ход операции в группе I «Реваскуляризация трахеи»

***Клиническое течение послеоперационного периода в группе I.*** У двух кроликов №2 и №4 послеоперационный период осложнился развитием динамической кишечной непроходимости, что повлекло летальный исход на третьи и четвертые сутки соответственно. У животных №1, №3, №5-8 осложнений не отмечено, на двадцатые сутки после операции они выведены из эксперимента. Между ЧДД и сутками динамического мониторинга отсутствовала пропорциональная зависимость. Максимальное отклонение ЧДД на 35% от верхней границы нормы зарегистрировано у объекта №4. У всех кроликов в первые сутки отмечалась тахикардия. Наибольший рост

амплитуды ЧСС зафиксирован у объектов №2, №4 и превышал верхнюю границу нормы на 24,4% и 22,5% соответственно. У выживших животных гемодинамически значимых отклонений ЧСС не отмечалось. У всех особей группы I зарегистрировано повышение температуры тела в первые послеоперационные сутки. У животных №2 и №4 рост температуры продолжился на протяжении последующих суток вплоть до наступления летального исхода. В случае с №1, №3, №5-8 температурные реакции являлись убывающими и стремились к нормальным значениям. Отмечено повышение уровня лейкоцитов у всех животных на первые сутки после оперативного вмешательства. Наибольший подъем относительно показателей дооперационного периода у объектов №2 и №4. У выживших кроликов наблюдался синхронный регресс лейкоцитоза к двадцатым суткам.

**Гистологическое исследование в группе I.** У кроликов, выведенных из эксперимента, признаков стеноза, воспаления и нагноения трахеи нет. В зоне реваскуляризации отмечен активный ангиогенез. Сосудов в этой области больше чем в интактной трахее. Все трахеи 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. Сосудистая ножка лоскута во всех случаях функционировала, артерии и вены были проходимы и полнокровны. Ни на одном препарате не было найдено сосудов между хрящевыми кольцами. Микрокартина свидетельствовала о независимом от фасциального лоскута кровоснабжении слизисто-подслизистой трахеи (Рисунок 3).

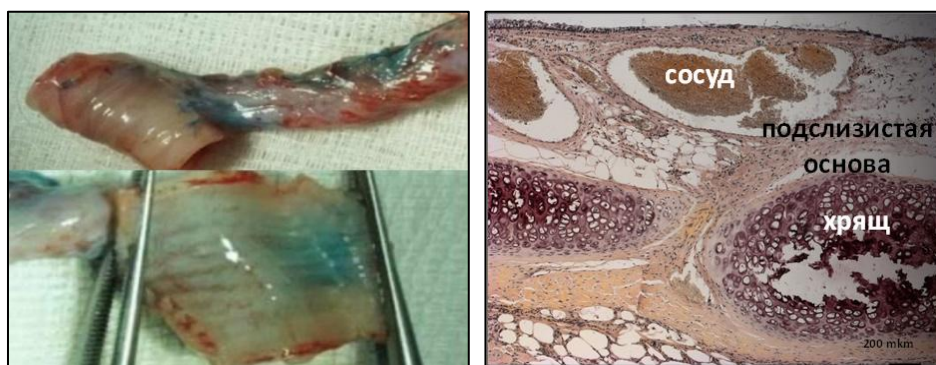


Рисунок 3. Гистологическое исследование в группе I (макро- и микропрепарат)

Полученные данные позволяют интерпретировать реваскуляризацию с точки зрения бесперспективности в стимуляции репаративных процессов слизистой и подслизистой оболочек трахеи. Исключена возможность двухэтапного подхода в замещении дефектов трахеи.

### **Моделирование дефекта слизисто-подслизистой трахеи кроликов**

При формировании патологии слизисто-подслизистой трахеи кроликов мы столкнулись с отсутствием адекватной модели нанесения повреждения. В поисках рационального метода создания дефекта нижних дыхательных путей экспериментальным путем мы пришли к мнению, что оптимальным способом является хирургический с использованием офтальмологического скальпеля. Инструмент, обладающий малыми размерами и легкостью, имея сложное строение, позволял максимально выверить размеры дефекта.

Одной из главных задач стало определение параметров раневого поля с учетом баланса между размерами, при которых повреждение способно к самовосстановлению и размерами, при которых без лечения заживление невозможно. Так мы приступили к поиску критических размеров слизисто-подслизистой трахеи. В зависимости от отношения ширины предполагаемого дефекта к размерам окружности трахеи было принято решение выделить две группы животных. В одной из них ширина повреждения составляла менее половины окружности трахеи, а в другой – половина окружности и более.

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

**Ход операции в группе II.** Разрез длиной 5 см производили по средней линии шеи. Аналогично группе I обеспечивались доступ к трахее и ее мобилизация. Трахею вскрывали поперечно, формируя «окно» на ее передне-боковой поверхности. У всех кроликов выполняли дезэпителизацию трахеи, формируя дефект шириной менее 50% ее окружности, точнее у №1-15%, №2-20%, №3-25%, №4-30%, №5-35%, №6-40%, №7-45%, №8-49%. Длина дефекта оставалась постоянной - 15 мм (Рисунок 4). Трахею ушивали узловыми П-образными швами. Мягкие ткани ушивали послойно.

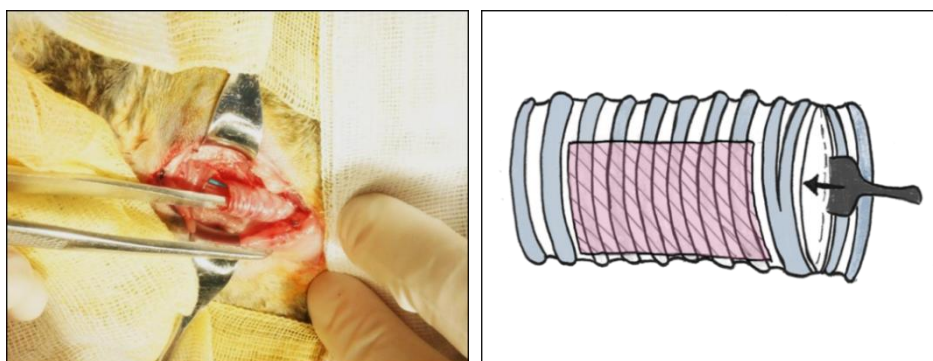


Рисунок 4. Формирование дефекта на передне-боковой поверхности трахеи

**Клиническое течение послеоперационного периода в группе II.** Все объекты были под наблюдением в течение двадцати суток после операции, затем подвергнуты эвтаназии. В группе II летальность и жизнеугрожающие осложнения не зарегистрированы. Наиболее высокие показатели ЧДД по сравнению с предоперационными данными зафиксированы в первые три дня после операции, но уже к седьмым суткам у всех кроликов отмечено снижение ЧДД ниже 70 в минуту. У всех животных уже на второй неделе эксперимента ЧСС находилась в диапазоне референсных значений. Максимальная температура зафиксирована на третьей сутки после операции, а затем наблюдалось ее синхронное снижение. В раннем послеоперационном периоде отмечался лейкоцитоз, который нивелировался к окончанию опыта.

**Гистологическое исследование в группе II.** Отмечено незначительное сужение трахеи, визуализировалось красное сосудистое пятно. Признаков нагноения нет. В области дефекта отмечался вновь сформированный слой подслизистой основы и истонченного трахеального эпителия (Рисунок 5).

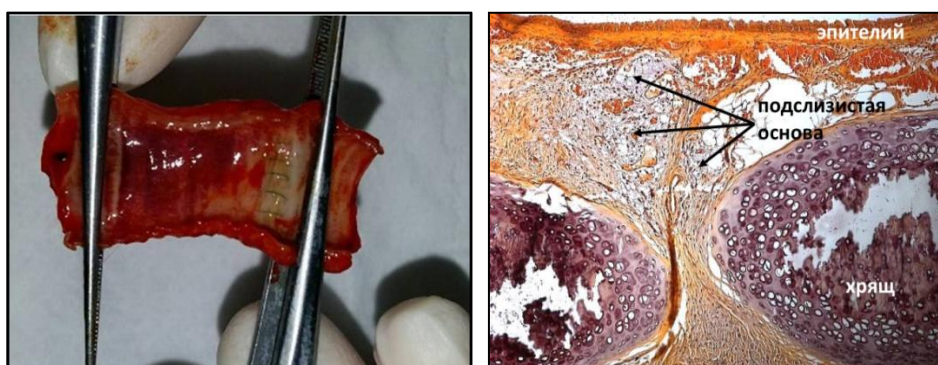


Рисунок 5. Гистологическое исследование в группе II (макро- и микропрепарат)

Все восемь животных группы II продемонстрировали отсутствие летальности, что позволило говорить о способности трахеи к самооживлению при размерах дефекта менее половины ее окружности.

В продолжение работы по моделированию критического дефекта создана группа III «Нанесение дефекта трахеи  $\geq 50\%$  ее окружности» (n=8).

**Ход операции в группе III.** Методика создания дефекта в группе III аналогична воспроизведенной ранее в группе II. Различие этих двух групп заключалось только в размерах наносимого повреждения трахеи. Ширина дефекта слизисто-подслизистой у кроликов группы III составила 50% и более окружности трахеи, точнее у №1-50%, №2-55%, №3-60%, №4-65%, №5-70%, №6-75%, №7-80%, №8-90%). Длина дефекта оставалась прежней - 15 мм.

**Клиническое течение послеоперационного периода в группе III.** Послеоперационный период осложнился развитием острой дыхательной недостаточности. На третьи послеоперационные сутки диагностирована смерть кроликов №5-8, а на четвертые сутки - №1-4 из-за аспирации большого количества экссудата, образованного в зоне дефекта. В восьми случаях зафиксированы чрезвычайные отклонения ЧДД от нормальных первоначальных значений. Зарегистрировано линейное нарастание тахикардии у всех особей с максимальным увеличением ЧСС у кролика №2 до 226 в минуту. Гипертермия у всех объектов наблюдения нарастала с течением суток. Наибольший сдвиг лейкоцитов влево от исходного значения отмечен на 1-е сутки после операции у особи №8 - 180,4%, где повреждение было максимальным.

**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. В тканях в области дефекта содержалось большое количество детрита из воспалительного инфильтрата и эритроцитов. Не было признаков реэпителизации или образования подслизистой оболочки (Рисунок 6).

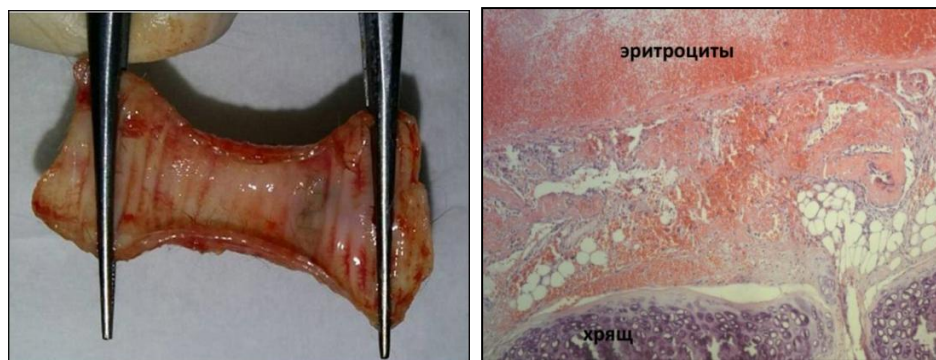


Рисунок 6. Гистологическое исследование в группе III (макро- и микропрепарат)

Дефект слизисто-подслизистой размерами пятьдесят процентов и более окружности трахеи является критическим и не способен к самозаживлению. Эта группа стала контрольной.

**Нанесение критического дефекта на предварительно реваскуляризованную трахею (двухэтапный подход)** по гуманным соображениям выполнено только одному животному (n=1). Отказ от формирования группы обусловлен результатами исследований в группе I, где эффективность реваскуляризации в регенерации слизистого-подслизистой трахеи не доказана. Установив критические размеры дефекта трахеи, мы заведомо предполагали неблагоприятный исход двухэтапного подхода.

*Ход операции у единичного объекта наблюдения.* Реваскуляризация выполнена по ранее описанной технике в группе I. Спустя две недели был выполнен второй этап - нанесение дефекта (ширина - 75% окружности трахеи, длина - 15 мм).

*Клиническое течение послеоперационного периода у единичного объекта наблюдения* подобно группе III. Кролик погиб на вторые сутки после операции.

*Гистологическое исследование у единичного объекта наблюдения двухэтапного подхода.* При аутопсии картина ничем не отличалась от увиденной ранее у кроликов, погибших от критического дефекта в группе III: большое количество густой слизи в трахее и нескольких крупных бронхах, отечная рана и слизистая вокруг, гематома.

## **Реконструкция критического дефекта слизисто-подслизистой трахеи кроликов**

Для замещения критического дефекта трахеи была предложена КИК, в основе которой лежит биоразлагаемый скаффолд на основе хитозана и коллагена, заселенный клетками слизисто-подслизистой, предварительно взятыми из носовой полости у кроликов, подлежащих исследованию.

В соответствии с планируемой операцией создана группа IV «Пластика дефекта трахеи КИК, фиксированной шовным материалом» (n=8).

**Ход операции в группе IV.** Подобно контрольной группе III создавался критический дефект слизистой и подслизистой трахеи. В зону дефекта помещали КИК. Матрикс фиксировали по краю узловыми швами к краям слизистой оболочки и подлежащим хрящам трахеи (Рисунок 7). Закрывали трахеальное «окно» узловыми швами. Послойно ушивали мягкие ткани. Экстубацию проводили с осторожностью, чтобы не повредить КИК.

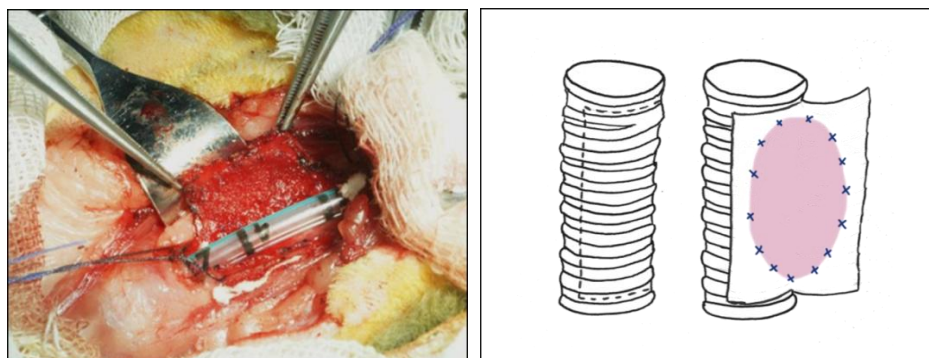


Рисунок 7. Пластика дефекта трахеи КИК, фиксированной шовным материалом

**Клиническое течение послеоперационного периода в группе IV.** У кроликов №3-4 в первые послеоперационные сутки развилась острая дыхательная недостаточность из-за миграции КИК в просвет трахеи. Смерть обеих особей наступила вследствие асфиксии. Послеоперационный период у шести выживших кроликов протекал без особенностей и на двадцатые сутки они выведены из эксперимента. У погибших животных №3-4 после операции резко возрастала амплитуда ЧДД. У выживших №1-2, №5-8 отмечен рост ЧДД в раннем послеоперационном периоде, который к 20-м суткам



постепенно снижался, хотя и превышал верхнюю границу нормы. В случаях объектов №3-4 ЧСС стремительно возрастала. В остальных шести наблюдениях №1-2, №5-8 резкий подъем показателя преимущественно в первые сутки после операции со временем обретал нисходящую тенденцию. Исходного уровня ЧСС так и не было достигнуто. Во всей группе отмечен уверенный рост температуры в первую неделю опыта, затем постепенный регресс. Однако на двадцатые сутки эксперимента все же сохранялась гипертермия. Динамика уровня лейкоцитов у животных №3-4 аналогична группе III с критическим дефектом трахеи. У кроликов №1, №2, №5-8 в финальные сутки наблюдалось снижение уровня лейкоцитов относительно контрольной точки в первые сутки после операции. Регресс лейкоцитоза к завершению эксперимента в этой группе был незначительным.

***Гистологическое исследование в группе IV.*** У погибших кроликов на вскрытии обнаружен отек легких и дыхательных путей. У выживших особей при вскрытии трахея незначительно сужена, имеется умеренное количество слизи, просвет ее не обтурирован. КИК уменьшилась в размере, приобрела белый цвет. Матрикс распадается и густо инфильтрирован воспалительными клетками. Между КИК и трахеей виден экссудат, содержащий эритроциты и воспалительные клетки, 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 8).

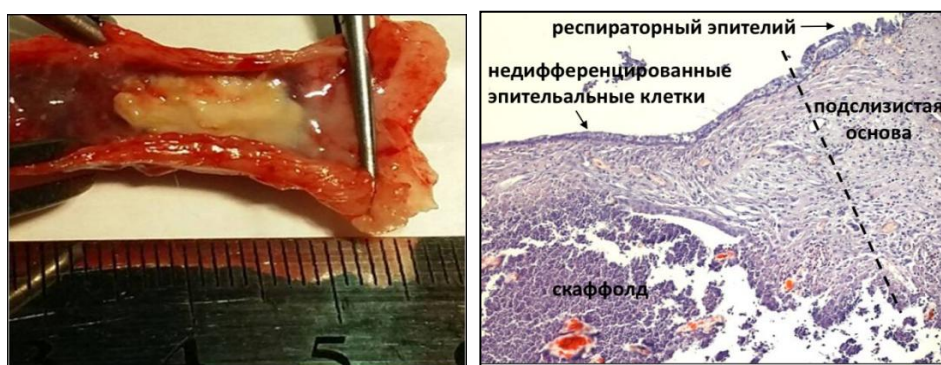


Рисунок 8. Гистологическое исследование в группе IV (макро- и микропрепарат)

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

Сформирована группа V «Пластика дефекта трахеи КИК, фиксированной стентом» (n=6).

**Ход операции в группе V.** Для замещения критического дефекта трахеи использовали КИК, как и в группе IV. Только у кроликов этой группы вместо подшивания предложен новый способ фиксации КИК в просвете дыхательной трубки при помощи сосудистого стента, соответствующего трахее по размеру. Одновременно под контролем зрения между вдохом и выдохом кролику рег ос внутритрахеально устанавливали стент, который надежно фиксировал КИК к стенке трахеи в зоне повреждения (Рисунок 9). Эндотрахеальную трубку смещали таким образом, чтобы она не создавала препятствий для установки стентка. Под контролем зрения вручную направляли интубационную трубку. Во время ушивания трахеи продолжали искусственную вентиляцию легких. Экстубацию осуществляли бережно. КИК была надежно фиксирована и не травмировалась интубационной трубкой. Ушивали хрящевой каркас трахеи, а затем и мягкие ткани послойно.



Рисунок 9. Пластика дефекта трахеи КИК, фиксированной стентом

**Клиническое течение послеоперационного периода в группе V.** На седьмые сутки по гуманным соображениям кролик №2 досрочно выведен из эксперимента в связи с некупированной кишечной непроходимостью. У

остальных кроликов послеоперационный период протекал без особенностей. На двадцатые сутки после операции им выполнена эвтаназия. У кролика №2 прослеживалось нарастание дыхательной недостаточности, тахикардии. У остальных животных тахипноэ наблюдалось в первые несколько суток, а к моменту завершения эксперимента у всех особей одышка отсутствовала. Максимальная ЧСС наблюдалась в первые несколько суток, далее тахикардия регрессировала. Колебания температуры наиболее выражены в первую неделю эксперимента, затем кривые стремились к нормальным значениям. На первые сутки возрастало общее число лейкоцитов, но особенно значимо то, что на двадцатые сутки у выживших особей лейкоцитоза нет.

**Гистологическое исследование в группе V.** Просвет трахеи не сужен, есть незначительное количество слизи. Стент легко отделился от стенки трахеи, однако вместе со стентом отделились и остаточные фрагменты матрикса. Макроскопически на месте дефекта нет выраженной гематомы и нет выраженного отека по сравнению с группами III и IV. Микроскопически видны множественные зоны начинающейся регенерации подслизистого слоя, по краям дефекта можно увидеть регенерацию эпителия (Рисунок 10).

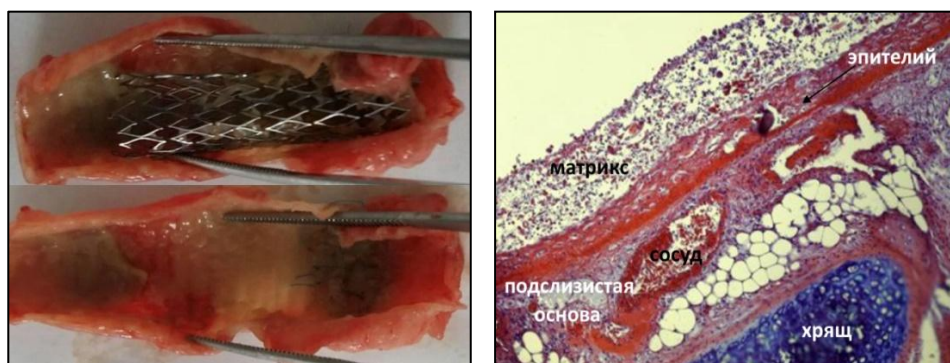


Рисунок 10. Гистологическое исследование в группе V (макро- и микропрепарат)

Представлено распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента животных в абсолютных величинах (Таблица 1), в процентном соотношении в общей популяции (Рисунок 11) и внутри каждой группы (Рисунок 12).

Группа	I	II	III	Единичное наблюдение	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

Таблица 1. Распределение животных в эксперименте.



Рисунок 11. Распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента животных в общей популяции.

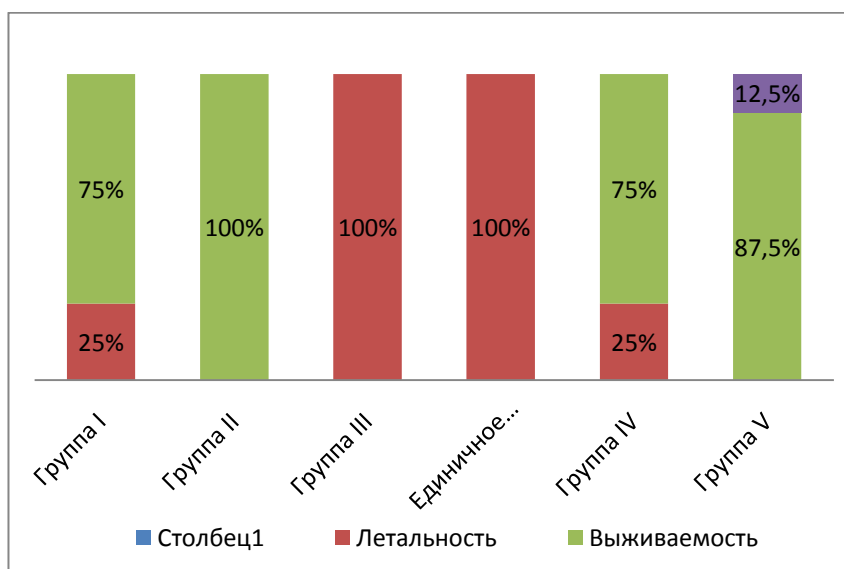


Рисунок 12. Распределение выживших, умерших и досрочно выведенных из эксперимента животных внутри каждой группы

Таким образом, реконструкция критического дефекта трахеи кролика КИК и стентом в эксперименте оказалась успешной. Это обеспечивалось надежной фиксацией биоматрикса в просвете дыхательных путей, сокращением длительности общей анестезии, так как не требовался расширенный доступ в трахею, и фиксация КИК стентом требовала меньше времени, нежели подшивание.

Разработка является актуальной в связи с возможностью повышения радикальности операции и улучшения прогнозов лечения стенозов трахеи. Предложенный способ пластики трахеи КИК, фиксированной стентом, запатентован. (Патент РФ № 2017110581).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Рассмотренный в работе метод фиксации имплантата с помощью внутрипросветного стента имеет определенные перспективы. Этот способ возможно осуществить при эндоскопическом доступе к поврежденной слизистой оболочке трахеи. Однако на данный момент не существует подходящих для этой цели стентов. Дальнейшему развитию методики может способствовать создание специального эндотрахеального стента достаточной эластичности и прочности, 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.

Делая выбор в пользу малоинвазивных технологий, целесообразно выполнение эндоскопического вмешательства. С помощью бронхоскопа возможна имплантация матрикса на поврежденные зоны трахеи и иные участки дыхательных путей.

В экспериментальных условиях возможно проведение эндоскопического формирования дефекта и закрытия его синтетическим

материалом. При этом лабораторные животные должны быть значительно больше кролика.

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. Таким образом, на основании приведенной экспериментальной модели возможно выполнение большого спектра исследований по изучению регенерации дефектов слизистой и подслизистой нижних дыхательных путей, тестирование различных покровных материалов и КИК. Полагаем, что сегодняшние разработки в области клеточной инженерии являются основой для завтрашних достижений не только в хирургии, но и медицине в целом.

## **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 длиной 15 мм и шириной 50% и более окружности трахеи кролика является критическим, так как не способен к самозаживлению и без дополнительного хирургического вмешательства, направленного на замещение повреждения, ведет к гибели животного.
4. Экспериментальная модель пластики критического дефекта трахеи с помощью КИК, фиксированной стентом, является жизнеспособной.
5. Предложенный метод пластики дефекта трахеи с помощью КИК и стента может составить достойную конкуренцию в реконструкции

критических повреждений слизисто-подслизистой трахеи и стать доступной альтернативой в лечении 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 КИК, фиксированной в просвете трахеи при помощи стента, рекомендована к внедрению в экспериментальную хирургию для замещения повреждений других трубчатых органов.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Денисова А.В., Сафронова Е.И.** История развития реконструктивно-восстановительной хирургии нижних дыхательных путей // **Вопросы реконструктивной и пластической хирургии** - 2018. - №3 (66). - С. 66 - 72. DOI: 10.17223/1814147/66/09
2. **Денисова А.В., Дыдыкин С.С., Сафронова Е.И., Пискунова Н.Н., Пантелеев А.А., Григорьевский Е.Д., Кольченко С.И.** Пластика критического

дефекта стенки трахеи с помощью клеточно-инженерной конструкции и стента: экспериментальное исследование // **Сеченовский вестник** - 2019. - №10 (3) - С. 15 - 21. DOI: 10.26442/22187332.2019.3.

3. **Денисова А.В.**, Дыдыкин С.С., Сафронова Е.И., Пискунова Н.Н., Пантелеев А.А., Романова О.А., Григорьевский Е.Д., Кольченко С.И. Моделирование пластики эпителиального дефекта стенки трахеи с помощью клеточно-инженерной конструкции и стента // **Вопросы реконструктивной и пластической хирургии** - 2019. - №2 (69). - С. 42 - 52. DOI: 10.17223/1814147/69/06

4. Сафронова Е.И., Дыдыкин С.С., Пантелеев А.А., Романова О.А., **Денисова А.В.**, Григорьевский Е.Д., Кольченко С.И., Пискунова Н.Н. Способ моделирования пластики эпителиального дефекта стенки трахеи. **Патент РФ** № 2017110581. Опубликовано 21.05.2018.

5. Elizaveta I. Safronova, MD; Sergey S. Dydykin, MD, PhD; Evgeny D. Grigorevskiy, MD; Ekaterina A. Tverye; Stepan I. Kolchenko; Natalia. N.Piskunova; Galina P. Titova MD, PhD; Vladimir D. Parshin MD, PhD; **Anna V. Denisova** MD; Olga A. Romanova, PhD; Andrey A. Panteleyev, PhD. Experimental animal model for assessment of tracheal epithelium regeneration // **The Laryngoscope** - 20 Nov. 2018. - № 129 (6). DOI: 10.1002/lary.27480.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КИК – клеточно-инженерная конструкция

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЧДД – частоты дыхательных движений