

На правах рукописи

КОВАЛЕНКО АЛЕКСЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ТОНКОКИШЕЧНОЙ
НЕПРОХОДИМОСТИ ПУТЕМ АКТИВАЦИИ МЕСТНЫХ
ПЕПТИДЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ**

14.01.17 – Хирургия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Щербюк Александр Николаевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Хугаева Валентина Каргоевна

Официальные оппоненты:

Власов Алексей Петрович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, кафедра факультетской хирургии с курсами топографической анатомии и оперативной хирургии, урологии и детской хирургии, заведующий кафедрой

Гришин Александр Владимирович – доктор медицинских наук, ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», отделение неотложной хирургии, эндоскопии и интенсивной терапии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится «_____» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.03 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, дом 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.040.03
доктор медицинских наук, профессор

Шулутко Александр Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Актуальность темы исследования. Кишечная непроходимость (КН) – это грозное осложнение различных заболеваний органов брюшной полости и сердечно-сосудистой системы. Выделяют большое количество предрасполагающих факторов КН, которые могут быть врожденные (удлинение участков кишки, аномалии развития) и приобретенные. Наиболее частыми приобретенными факторами являются: спаечный процесс после воспалительных заболеваний брюшной полости или перенесенной операции, различного рода опухоли, грыжи передней брюшной стенки и др. [А.Г. Хасанов и др., 2011]. Следует отметить, что с увеличением продолжительности жизни населения растет число заболеваний кишечника, сопровождающихся развитием острой кишечной непроходимости.

По данным современной литературы летальность при острой кишечной непроходимости остается высокой и зависит в первую очередь от времени с момента начала заболевания и от вида КН. При декомпенсированной КН прогноз, как правило, неблагоприятный. Несмотря на существование различных причин КН универсальным звеном патогенеза является нарушение микроциркуляции в стенке кишки, приводящее к некрозу [Ю.М. Галеев, 2008]. Необратимые нарушения микроциркуляции стенки кишки возникают через 12 часов от момента начала заболевания и прогрессируют со временем. В этот период начинают накапливаться продукты эндогенной интоксикации. Развивается гиповолемия, что также ухудшает процессы микроциркуляции.

В случае механической КН основным методом лечения является хирургический, который заключается в устранении причины, вызвавшей острую кишечную непроходимость (ОКН), при необходимости - резекцию нежизнеспособного участка кишечника с последующим восстановлением пассажа кишечного содержимого [А.В. Воробей, 2008]. Наложение межкишечного анастомоза в условиях КН сопровождается высокой частотой его несостоятельности (несмотря на прово-

димую коррекцию водно-электролитных нарушений) и развитием вторичного перитонита. Главная причина несостоятельности межкишечного анастомоза при КН – нарушения микроциркуляции (МЦ) в стенке кишки [А.В. Меньков, С.В. Гаврилов, 2013].

В связи с этим возникло предположение о возможности улучшения прогноза операции с помощью методов, улучшающих микроциркуляцию [М.В. Гринев, К.М. Гринев, 2009]. Несмотря на применяемые способы активации кровотока и улучшения реологических свойств крови процент осложнений и летальность остаются на высоком уровне [Е.Е. Ачкасов, М.Г. Негребов, 2013].

Степень разработанности темы исследования

На протяжении последних 35 лет в ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» проводились экспериментальные исследования, показавшие возможность восстановления микрогемоциркуляции с помощью стимуляции лимфотока в микрососудах. В.К. Хугаевой в 1988 году обнаружен новый вид регуляции лимфатических микрососудов (ЛМ) – опиоидергическая. Использование опиоидных пептидов прямого действия при ишемии мозга [В.К. Хугаева, 1993], воспалении кожи [А.В. Ардасенов, 2004] и кардиогенном отеке легких [Д.В. Султанов, 2015] дали положительные результаты. Лимфостимуляторы прямого действия активируют сокращение стенки и клапана ЛМ. При этом происходит активное дренирование лимфы в лимфатические узлы, что способствует дезинтоксикации. Микроциркуляторная сеть кишечной стенки богата лимфатическими сосудами. Их плотность обусловлена всасыванием питательных веществ из просвета кишечника [В.М. Седов, 2002]. Появившаяся возможность управлять лимфомикроциркуляцией и лимфодинамикой организма навела на мысль использовать метод прямой лимфостимуляции в условиях ОКН.

Цель исследования: экспериментальное обоснование роли активатора микролимфоциркуляции (опиоидного пептида-171 прямого действия) в комплексном хирургическом лечении тонкокишечной непроходимости.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальные модели непроходимости тонкого кишечника (ТК) для последующего изучения роли пептидергической регуляции микроциркуляции.
2. Изучить выживаемость животных с тонкокишечной непроходимостью (ТКН) в зависимости от ведущего патофизиологического механизма ее развития, пола и возраста, и влияние опиоидного пептида на этот процесс.
3. Оценить состояние МЦ в зоне энтеро-энтероанастомоза (ЭЭА) и в прилегающих к нему участках у животных, прооперированных по поводу КН, с помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии и биомикроскопии.
4. Изучить влияние синтетического пептида на стимуляцию лимфотока в брыжейке ТК крысы, динамику микроциркуляции и выживаемость после резекции ТК. Определить адаптационный потенциал пептида в саногенезе КН в комплексе с оперативным лечением.
5. Обосновать целесообразность применения активации лимфотока в комплексном лечении ТКН.

Научная новизна исследования

Впервые проведено комплексное изучение адаптационно-регулирующей роли синтетического лимфостимулирующего опиоидного пептида-171 при его местном однократном применении в процессе саногенеза после хирургического лечения ТКН.

В работе определен и обоснован патофизиологический и прогностический потенциал моделирования различных видов непроходимости ТК в эксперименте. На основании анализа шансов выживаемости животных и характера микроциркуляторных нарушений в различных половозрастных группах разработана оптимальная экспериментальная модель острой хирургической патологии и оперативного вмешательства по поводу нее, позволившая изучить микроциркуляцию в зоне

ЭЭА и в прилегающих участках с помощью функциональных и морфологических методов исследования.

Впервые с целью коррекции нарушений микроциркуляции после резекции ТК по поводу КН использован опиоидный пептид, обладающий прямым лимфостимулирующим действием. Установлено, что использование данного вещества при КН восстанавливает МЦ, уменьшает отек и повреждение ткани ТК. Впервые с помощью биомикроскопии показано патофизиологическое значение изменения диаметра микрососудов в динамике ТКН, а также при использовании лимфостимулирующего пептида с лечебной целью.

Использование лимфостимулирующего пептида позволило повысить выживаемость животных независимо от веса, их выживаемость всегда превышала выживаемость животных контрольной группы.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В условиях биомикроскопии получены новые знания о МЦ в стенке ТК в динамике ТКН. Показано участие опиоидного пептида в регуляции микроциркуляции в стенке ТК в условиях патологии. Результаты исследования, расширившие представление о патогенезе ТКН, демонстрируют важную роль брыжеечных микрососудов и стимуляции лимфотока в устранении ТКН.

Практическая значимость работы определяется возможностью появления нового эффективного направления в комплексном лечении ТКН с помощью активации лимфотока в микрососудах с последующим восстановлением МЦ в кровеносных сосудах, устранением ТКН и увеличением выживаемости животных. Предложенная модификация метода изучения МЦ в стенке ТК расширяет возможности экспериментального изучения патологии кишечника в условиях биомикроскопии и оценки эффективности исследуемых веществ.

Методология и методы исследования. Использовали несколько методических подходов для формирования ТКН, основанных на анализе реальной клиниче-

ской практики: окклюзия брыжеечных артерий, перекрут петли кишки, перевязка кишки, а также их сочетаний.

Для анализа патогенетической значимости разрабатываемой модели изучали выживаемость животных в различных возрастных и половых группах. Использовали систему периодизации возраста крыс по Т.А. Гуськовой (2002).

Регуляторная роль активации регионарной опиоидной пептидергической системы была оценена путем регистрации показателя микроциркуляции (ПМ) в стенке ТК методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), а также анализа структурно-функциональных свойств венозных и лимфатических микрососудов брыжейки и кишечной стенки методом биомикроскопии.

Эффективность местного использования синтетического агониста дельта-опиатных рецепторов оценивалась на основе гистологического исследования ТК в области сформированного анастомоза на 7 сутки после хирургического вмешательства.

Положения, выносимые на защиту:

1. Лимфостимулятор прямого действия, опиоидный пептид №171, способствует уменьшению проявлений ТКН, улучшает микроциркуляцию, препятствует повреждению стенки ТК.

2. Использование пептида №171 увеличивает выживаемость животных при его предварительном введении.

3. Разработанная модификация метода прижизненного изучения ТКН позволяет исследовать динамику КН.

Степень достоверности

Достоверность изложенных в диссертации результатов обусловлена строгим соблюдением требований Правил надлежащей лабораторной практики при работе с экспериментальными животными, в том числе в части соблюдения требований к их содержанию; использованием в работе здоровых крыс; применением методов исследования с высокой степенью доказательности; использованием лабораторно-

го оборудования, расходных материалов и инструментов ведущих отечественных и зарубежных производителей, находящихся в исправном техническом состоянии; надлежащим и объективным ведением записей исследования; применением адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Практическое внедрение

Изучение микроциркуляции в зоне ЭЭА и в прилегающих участках после резекции ТК при КН, с помощью гистологических методов исследования активно применяется в учебной работе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), научных исследованиях сотрудниками лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Апробация работы. Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, госпитальной хирургии №1 лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИОПП» 26 июня 2019 г.

Результаты работы были доложены и обсуждены на: конкурсе на лучший научный и инновационный проект студентов и молодых ученых российских и зарубежных вузов (медицинское и фармацевтическое образование) 2007, Итоговых научных конференциях молодых исследователей с международным участием «Татьянин день», Москва, 2007, 2008, 2010, 2012; VII,IX,X, XI, Международных конференциях «Гемореология и гемоциркуляция» Ярославль, 2009, 2013, 2015, 2017; XIII ежегодной сессии НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых, Москва, 2009, Успенские чтения; Научно-практическая конференция врачей России с международным участием, посвященная 60-летию кафедры общей хирургии Тверского государственного медицинского университета, Тверь, 2015; 90-й Международной научно-практической конференции студентов и

молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины», посвященной 100-летию медицинского образования в Крыму, Симферополь, 2018; 10th International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (ISCAA), Moscow, 2018; XX международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке» «Отечественная медицина как основа развития современного здравоохранения» (в аспектах модернизации технологии, информации, науки и системы образования), Москва, 2018; VI межвузовском форуме студентов и молодых специалистов «Aescular medical science and skills», Москва, 2018.

Личный вклад автора

Автором предложена идея и детально разработан план настоящего диссертационного исследования. Автор провел обзор отечественных и иностранных научных источников, сформировал дизайн исследования. Автором лично выполнены все инвазивные вмешательства на животных, смоделированы варианты ТКН, проведено формирование межкишечного анастомоза. Автор лично регистрировал изменения микроциркуляции и оценивал структурно-функциональное состояние микрососудистого русла поврежденных участков кишки у экспериментальных животных, проводил наблюдение и регистрацию летальности крыс в различных половозрастных группах. При непосредственном и деятельном участии автора выполнено гистологическое исследование участков кишки. Автор активно участвовал в написании публикаций и подготовке заявки на получение патента на изобретение Российской Федерации. Автором лично написаны данная рукопись исследовательского труда и автореферат диссертации.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных научных работ: 3 статьи в изданиях из перечня Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 6 работ в сборниках научно-практических конференций, а также 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, шести глав (обзор литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав с описанием результатов собственных исследований, заключения), выводов и библиографического списка из 239 источников (167 – иностранных, 72 – отечественных). Работа иллюстрирована 10 таблицами и 29 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах массой 90-260 г (48 самок, 268 самцов, всего – 316 особей), полученных в виварии ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии. За 12 часов до воспроизведения острой кишечной непроходимости животных депривировали от пищи при сохранении свободного доступа к питьевой воде. Каждая группа животных включала не менее 6 голов; но, при этом, во избежание необоснованно высоких затрат лабораторных животных, их максимальное количество в группе не превышало 10 особей. Вместе с тем, поскольку животные групп 8 и 9 выводились из эксперимента в разные сроки, фрагменты брыжейки и кишечной стенки были необходимы для проведения морфологических исследований и микроциркуляции, общая численность групп составила 63 и 67 животных соответственно (с соблюдением вышеописанного принципа необходимости и достаточности).

Все инвазивные манипуляции, хирургические вмешательства, сопровождающиеся возникновением болевых ощущений, осуществляли под наркозом. Анестезиологическое пособие выполняли путем внутримышечного введения 8% раствора хлоралгидрата из расчета 0,6 г/кг массы животного.

Характеристика объекта исследования

В качестве регулятора МЦ, воздействующего на эндогенные системы опиоидергического контроля функций микрососудистого русла использовали опиоидный пептид, агонист дельта-опиатных рецепторов, аналог лейэнкефалина и даларгина, синтезированный в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (структурная формула пептида: Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu, лабораторный шифр учреждения-разработчика – пептид-171). Пептид использовали местно, интраоперационно, в виде орошения на поверхность брыжейки и стенки ТК, содержащих ЛМ, в концентрации 40,0 мкг/кг веса в 1,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Моделирование тонкокишечной непроходимости у крыс и описание экспериментальной интервенции

В работе использовали различные модели ОКН у крыс с целью выявления наиболее тяжелых нарушений микроциркуляции и их последствий, которые сопровождались самой низкой выживаемостью животных. Избранные модели соответствовали наиболее часто встречаемым в клинической практике формам поражения ТК (тромбоз сосудов брыжейки, дивертикулы кишки, спаечный процесс после травмы, сдавление просвета опухолью и др.), требующих обязательного и своевременного оперативного вмешательства в течение первых 24 часов после появления симптомов КН и перитонита.

В работе были использованы две группы контроля: первой внутрибрюшинно после проведения лапаротомии вводили пептид, растворенный в изотоническом растворе хлорида натрия в концентрации 40,0 мкг/на кг веса в объеме 1 мл раствора (в качестве растворителя использовали изотонический 0,9% раствор хлорида натрия). Животные второй контрольной группы получали плацебо в виде пропорционального объема физиологического раствора, вводимого интраперитонеально. У животных первой группы после наркотизации проводили срединную лапарото-

мию с последующим ушиванием раны. Во второй группе дополнительно накладывали лигатуру на участок ТК, расположенный на расстоянии 5-7 см проксимальнее илеоцекального перехода. У животных третьей группы лигатуру накладывали на одну сегментарную брыжеечную артерию. Животным четвертой группы лигировали три артерии брыжейки. В пятой группе животных лигатура на одной артерии брыжейки сочеталась с перекрутом кишки. Имело место комплексное сочетание нарушения кровообращения на небольшом участке стенки ТК и проходимости ТК. В шестой группе интактную кишку пересекали с последующим созданием ЭЭА. В седьмой группе животных производили резекцию фрагмента неповрежденной кишки на протяжении 6-8 см с последующим наложением ЭЭА. Участок резекции кишки в других опытах соответствовал месту наложения лигатуры. В восьмой группе после лапаротомии накладывали лигатуру на стенку ТК с последующим ушиванием операционного отверстия.

Через 24 часа производили повторную лапаротомию под наркозом (8% раствор хлоралгидрата 0,6 г/кг массы крысы), резекцию поврежденного лигатурой участка кишки на расстоянии 4-6 см от лигатуры в проксимальном и на 2-3 см в дистальном направлениях. Животных девятой группы подвергали манипуляциям, аналогичным восьмой группе. Отличие заключалось в орошении поверхности анастомоза и прилежащих тканей лимфостимулирующим пептидом-171 (в концентрации 40 мкг/кг веса животного в 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия) непосредственно перед ушиванием операционной раны.

Методы исследования:

Биомикроскопию микрососудов брыжейки и стенки ТК крысы проводили по общепринятой методике [Чернух А.А., 1984] с использованием стереомикроскопа ЛЮМАМ И2.

Регистрация моторики стенки и клапанов ЛМ брыжейки в условиях биомикроскопии проводили с помощью фотометрического метода [Хугаева В.К., 1990].

Микроциркуляцию стенки ТК крысы изучали наряду с прямым методом с помощью биомикроскопии также косвенным – с помощью лазерного анализатора капиллярного кровотока ЛАКК-02 фирмы НПП Лазма (Россия).

Для изучения процесса восстановления структурно-функциональной организации ТК после проведения хирургической операции и при использовании пептида-171 применяли гистологический метод исследования, окраска гемотоксином и эозином, РАС-реакция.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась в многофункциональной программе статистического анализа «Statistica 6.0». Нормальность распределения признака в статистической совокупности изучали с помощью одно- или двумерного дисперсионного анализа (ANOVA). В случае нормального распределения признаков применялся t-критерий Стьюдента, при наличии необходимости сравнений трех и более признаков использовали парный критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, а также критерий Даннета. Для анализа выживаемости животных с острой кишечной непроходимостью, в зависимости от этиопатогенетического варианта развития, пола и возраста животных строили кривую выживаемости. Анализ кривых проводили с использованием критерия Гехана с поправкой Йейтса. Статистически достоверными считали вероятность ошибки $p \leq 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В первой группе без наложения лигатуры на кишку не наблюдали гибели животных, что свидетельствовало, в первую очередь, о грамотной хирургической технике выполнения лапаротомии и удовлетворительных санитарно-гигиенических условиях проведения манипуляции и содержания крыс. Продолжительность жизни крыс групп 2-9 зависела от тяжести повреждения, площади нарушенного кровоснабжения стенки кишки, способности восстановления проходимости кишечного содержимого через 24 часа после моделирования ОКН и наложения ЭЭА. Полное прекращение пассажа в кишке при наложении лигатуры,

перекрута кишки и нарушения кровоснабжения в стенке ТК после перевязки трех брыжеечных артерий вызывали гибель у 100% животных (группы № 2,4,5). При анализе времени гибели обращает на себя внимание то, что наиболее тяжелым повреждением, вызывающим гибель в течение первых суток, является механическая перевязка кишки. Перекрут тонкой кишки с брыжеечной артерией вызывала гибель крыс в среднем на 1,9 сутки после операции, что не имело статистической значимости при сравнении с животными 2 группы (2,3 сут.). Субтотальная ишемия/некроз кишки, вызванные перевязкой 3 брыжеечных артерий также сопровождался гибелью животных, однако в среднем время жизни крыс увеличивалось до 3,7 суток. Незначительное снижение кровоснабжения стенки ТК при перевязке одной брыжеечной артерии вызывало гибель 10% животных.

В связи с тем, что лигирование ТК оказалось одной из самых тяжелых среди моделей, а также легко воспроизводимой, которым создавали межкишечный анастомоз, она была избрана в качестве контроля сравнения с предполагаемым более эффективным способом лечения КН. Все последующие результаты, связанные с применением пептида (группа № 9), сравнивали с данными группы № 8. Наибольший показатель выживаемости 66% был получен в группе №9 за счет локального одноразового использования пептида-171 в концентрации 40,0 мкг/кг веса при завершении операции (рис.1). Позитивный эффект локального воздействия синтетического пептида подчеркивается также и тем, что в процессе операции не использовали антибиотики и другие противомикробные и противовоспалительные лекарственные средства. Имел значение еще один факт улучшения прогноза выживаемости: удаление поврежденных тканей кишки около лигатуры способствует увеличению выживаемости от 0% до 43%. Следовательно, дополнительное устранение продуктов распада, создающих повышенный локальный уровень интоксикации вокруг лигатуры, устраняемый механически, эффективен.

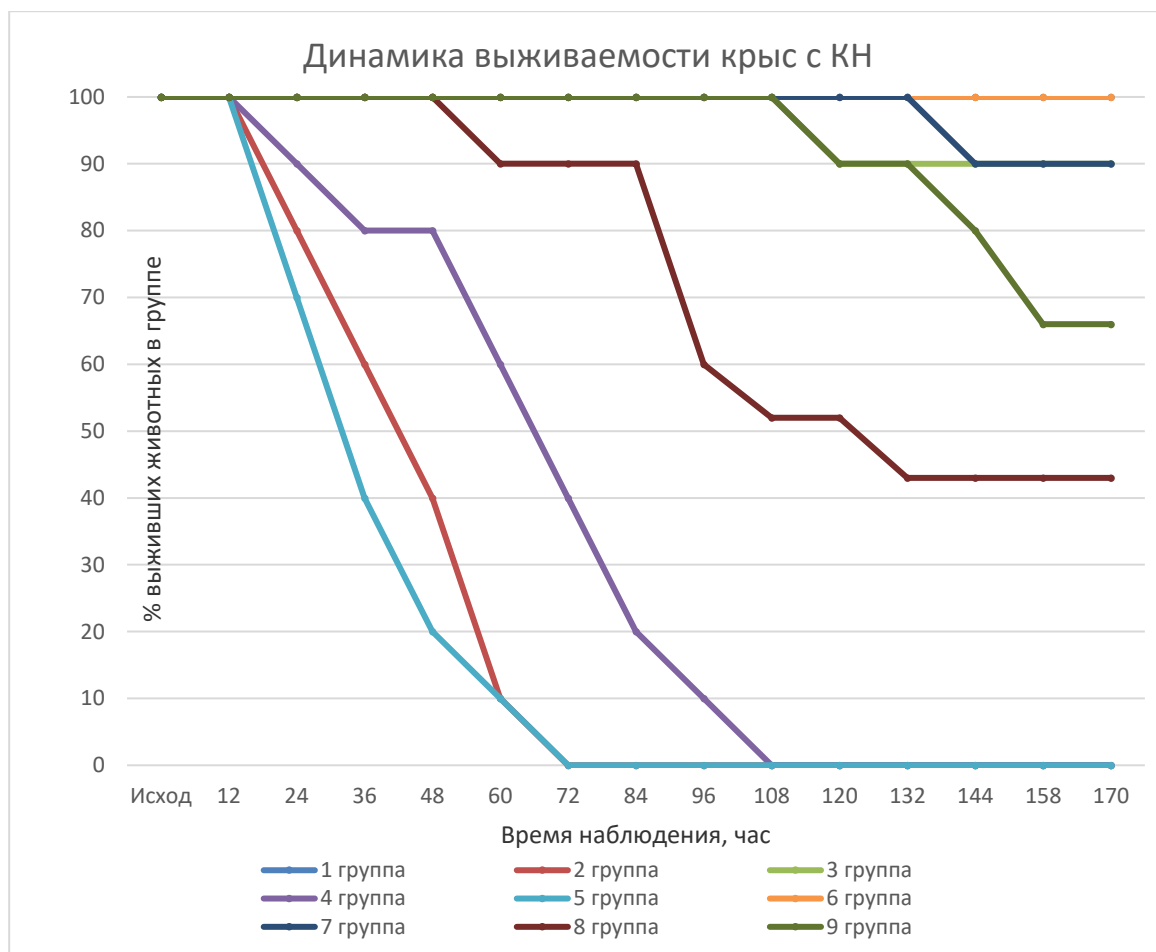


Рисунок 1 – Кривые выживаемости крыс с различными вариантами ТКН и воздействием пептида-171 (наблюдение в течение 7 суток после проведения вмешательства)

Для определения возрастной зависимости между тяжестью воспроизведенной ТКН и выживаемостью животных в рамках настоящей работы в исследование брали крыс, находящихся в 4 возрастных группах: инфантильной, препубертатной, пубертатной и ранней половозрелой, обоих полов (по 6 крыс в каждой группе каждого пола). При анализе полученных результатов мы установили, что наиболее чувствительными к патологическому воздействию острой ТКН животные вне зависимости от половой принадлежности являются в инфантильный период жизни. Очевидно, подобные результаты являются следствием особенностей формирования ЖКТ в данный период, а также особенностей вскармливания крыс в указанном возрасте. Локальное воздействие пептида не оказывает модулирующего действия на последствия вмешательства по поводу КН.

В препубертатном возрасте установили мощное корригирующее влияние местного использования раствора пептида-171, позволившего достичь 100% и 83% выживаемости в группах самцов и самок соответственно. Возможно, полученные результаты могут быть связаны с формированием и созреванием эндогенной системы пептидергической регуляции функций ЖКТ у животных и, в частности, системы опиатный пептидов, что согласуется с имеющимися в периодической литературе данными о данной системе. В пубертатном периоде самцы и самки по-разному переживали моделирование КН: так, в группе самок выживаемость превышала таковую в группе самцов. Нами отмечено положительное однонаправленное воздействие аппликации пептида-171 в обеих подгруппах. В половозрелом периоде местное применение пептида-171 у самок сопровождалось выживанием всех крыс, включенных в опытную группу, выживаемость в группе самцов была ниже – 83%, однако половые различия не достигали статистической значимости (таблица 1).

Таблица 1. Выживаемость лабораторных крыс различных возрастных групп с ТКН и на фоне местного воздействия пептидом-171.

Возрастной период	Пол	Условия постановки опыта	Число животных в группе	
			В группе	Выжило (%)
Инфантильный (30-90 гр)	М	Контроль	6	0 (0)
		Пептид-171	6	1 (17)
	Ж	Контроль	6	1 (17)
		Пептид-171	6	1 (17)
Препубертатный (90-120 гр)	М	Контроль	6	2 (34)
		Пептид-171	6	6 (100)*
	Ж	Контроль	6	2 (34)
		Пептид-171	6	5 (83)*
Пубертатный (120-180 гр)	М	Контроль	6	0 (0)
		Пептид-171	6	4 (67)*
	Ж	Контроль	6	2 (34)
		Пептид-171	6	5 (83)*
Половозрелый (180 гр и более)	М	Контроль	6	2 (34)
		Пептид-171	6	4 (67)
	Ж	Контроль	6	3 (50)
		Пептид-171	6	6 (100)*

Примечание: * – различия при сравнении с соответствующими значениями в контроле статистически достоверны при $p < 0,05$ (точный критерий Фишера).

Поскольку половозрелый период у крыс также протекает стадийно, для изучения выживаемости животных с КН, в том числе при локальном воздействии пептидом-171, мы решили стратифицировать крыс в соответствии с их весом. Данный подход, с нашей точки зрения, вполне обоснован тем, что при прочих равных условиях одинаковый доступ к корму и воде, сопоставимый двигательный режим, сопровождаются устойчивой прибавкой веса крыс, являющейся в данном случае временной функцией. Динамика выживаемости животных, получавших пептид, резко отличается от результатов контрольной группы высоким уровнем выживаемости в каждой возрастной группе (в среднем по всем подгруппам больше на 32%). Более того, пептид максимально увеличивал выживаемость самых мелких животных (увеличение в 2,4 раза в первой подгруппе с массой 180-200 г). Минимальная выживаемость совпала также, как и в контроле, с подгруппой массой 240 г. Однако, предшествующая весовая подгруппа с массой 220-240 г отличалась 100% выживаемостью при использовании пептида. В группах самок наблюдали некоторые отличительные особенности: наибольшая выживаемость животных регистрировалась в группах, соответствующих весу 180-200 и 220-240 г. У животных с этим же весом отмечали и максимальную эффективность местного использования опиоидного пептида с точки зрения его влияния на выживаемость крыс-самок. Возможным объяснением подобных различий между подгруппами самцов и самок может быть связь с фертильной функцией, обуславливающей расширение нормы реакции самок, в том числе и на повреждающие внешние воздействия.

Описанная возрастная динамика выживаемости имеет анатомо-физиологическое основание. Хорошо известно о интенсивном развитии лимфатической системы у новорожденных млекопитающих и человека. Ребенок при рождении имеет 2000 лимфатических узлов, взрослый человек – только 200. Естественная деградация лимфатической системы происходит одновременно с интенсивным развитием кровеносной системы. Поскольку максимальная плотность

лимфатических микрососудов отмечается в раннем возрасте, исследованные крысы с минимальным возрастом имели максимальную плотность лимфатических сосудов, что способствовало большей эффективности лимфостимулирующего пептида при активации большого числа ЛМ.

Одним из важнейших процессов, участвующих в поддержании гомеостаза кишечной стенки, сохранении ее структурно-функциональной целостности является состояние микроциркуляции. Формирование ОКН сопровождается первичными или вторичными микроциркуляторными нарушениями, во многом определяющими прогноз и исходы острой хирургической патологии. Все это делает оценку состояния микроциркуляторного бассейна не просто важной, но и необходимой как для суждения о глубине и тяжести повреждения органа, так и для прогнозирования течения заболевания.

На основе обобщения результатов измерения ПМ в первую минуту после повреждения ТК в зависимости от модели КН с последующим сравнительным анализом полученных результатов при КН по критериям степени снижения ПМ с частотой смертности этих животных позволил разделить все виды экспериментальной КН на три варианта взаимной зависимости. Применяв метод отношения шансов, мы установили, что первый вариант (группы 3, 6, 7) отличался низкой смертностью, не превышающей 10% при минимальном снижении ПМ в начале КН. Второй вариант реакции микрососудов почти в 2 раза превышал снижение ПМ, а летальность животных в группах 2, 4, 5, 8 росла в 5-10 раз по сравнению с первым групповым вариантом. Третий вариант, включавший только одну 9-ю группу, животные которой получали местное воздействие пептидом-171 с лимфостимулирующей активностью, занимала промежуточное место между первым и вторым вариантом реакции как по снижению ПМ, так и по показателю смертности животных. При этом, динамика ПМ во всех группах до момента введения пептида 9-ой группе была одинаковой. Таким образом, определяющим фактором, обуславливающим увеличение выживаемости животных, является позитивное влияние

местной аппликации пептида-171 на область брыжейки поврежденного фрагмента кишки, улучшение и восстановление микроциркуляции (таблица 2).

Таблица 2. Связь гибели животных со степенью снижения ПМ в стенке ТК в течение первой минуты после моделирования КН (метод отношения шансов)

№ групп	Модели	Диапазон снижения ПМ (%) после моделирования патологии	Средний ПМ групп	Диапазон летальности (%)	Средне-групповая летальность, %
3 6 7	Лиг 1Арт, ПересК+ЭЭА РезК+ЭЭА	22-45	37	0-10	6,7
V=0,284, p=0,002					
2 4 5	ЛигК, Лиг 3 Арт, Лиг1Арт+ПерекК	46-75	56	57-100	89
V=0,267, p=0,016					
8	ЛигК+РезК+ЭЭА		53	-	57
V=0,245, p=0,027					
9	ЛигК+РезК+ЭЭА+ Пептид		47	-	34
V=0,193, P=0,038					

Примечание: Лиг – лигатура; ЛигК – лигатура кишечника; Арт – артерия брыжейки; ПересК – пересечение кишки; ПерекК – перекрут кишки; РезК – резекция кишки; ЭЭА – энтеро-энтероанастомоз.

В этой связи, можно допустить заключение, что стимуляция лимфотока способна восстанавливать нарушенную микроциркуляцию не только в лимфатических, но и в кровеносных микрососудах. Причем, нами не было установлено возрастно-весовых различий по данному показателю.

При проведении биомикроскопии брыжейки и поврежденных отделов ТК нами было обнаружено снижение полнокровия и застоя в венулах и мелких венах. В большей степени застой и полнокровие снижались у животных, получавших

лимфостимулирующий пептид (на 10% и более). В наших экспериментах небольшая доза пептида-171 (40 мкг/мл), оказывала регулирующее венотоническое действие на сосудистую венозную сеть брыжейки, сохраняющееся на протяжении 7 суток, препятствуя развитию венозного полнокровия и застойных явлений, которые вызывают нарушения микроциркуляции в венозном и позже в артериальном русле в послеоперационном периоде (таблица 3).

Таблица 3. Диаметр мелких вен брыжейки ТК выживших крыс в контроле и на 7 сутки после резекции поврежденного лигатурой фрагмента кишки и создания межкишечного анастомоза у животных 8-ой и 9-ой групп.

Группа животных	Количество животных	Диаметр вен M±m(мм)			
		Контроль (а)	%	На 7 сутки опыта (б)	%
8	27	1,71±0,05	100	1,45±0,04 P _{а-б} <0,001	85
9	41	1,99±0,04 P ₈₋₉ <0,01	100	1,50±0,06 P ₈₋₉ >0,1 P _{а-б} <0,001	75

Примечание: контроль – исходный диаметр мелких вен до наложения лигатуры; одномерный дисперсионный анализа (ANOVA), критерий Даннета.

Рассуждая о возможных механизмах формирования венотонического эффекта опиоидного пептида, возможно предположить, что он может быть следствием прямого активирующего влияния пептида на дельта-опиатные рецепторы ГМК сосудистой венозной стенки, так и обусловлен опосредованной активацией подслизистых и брыжеечных нервных образований симпатической нервной системы, оказывающих длительное активирующее влияние на циркулярно ориентированные гладкомышечные структуры венул. Кроме того, нами также было установлено, что локальная аппликация опиатного пептида приводит к повышению количества и активности лимфатических сосудов брыжейки при сравнении с животными группы №8, не получавшими пептид.

Для оценки влияния стимуляции эндогенной пептидергической системы сосудистых и нервных элементов брыжейки поврежденного отдела кишечника на восстановление структуры и функций межкишечного анастомоза использовали микроскопическое исследование. На 7-е сутки после устранения кишечной непроходимости морфологически остаются признаки острых сосудистых изменений в микроциркуляторном русле кровеносных и лимфатических сосудов, кишечной стенки, а также интерстициальный отек всех слоев стенки кишки с нарушением дренажной функции лимфатических сосудов. Структурные изменения всасывающего эпителия мышечных ворсин с истончением щеточной каемки клеток и гиперфункцией слизистых (бокаловидных) клеток указывают на возможное замедление всасывательной функции кишечного эпителия и пристеночного пищеварения. Отек мышечных слоев стенки кишки с очаговыми повреждениями миоцитов (миоцитоллизис) обуславливают нарушение сократительной способности, приводящие к дилатации просвета кишки. В опытной (9-й) группе на 7-е сутки после устранения обтурационной кишечной непроходимости и применения лимфостимулирующего пептида морфологически четко прослеживается восстановление нарушенного кровообращения и лимфообращения в стенке ТК с восстановлением лимфодренажа, регресс интерстициального отека, структурных повреждений всасывающего эпителия и гладкомышечных клеток мышечных слоев, ответственных за сократительную функцию и моторику кишечника.

ВЫВОДЫ

1. Анализ зависимости выживаемости крыс при ТКН от тяжести воспроизводимой патологии (количество перевязанных брыжеечных артерий, комплексное воздействие на сосуды и кишку), наличия последующего оперативного вмешательства (резекция поврежденных тканей с наложением энтероэнтеро анастомоза) и возраста (пола) животных позволил разработать оптимальную экспери-

ментальную модель острой кишечной непроходимости с самой высокой (57%), но не абсолютной летальностью животных. Наибольшей выживаемостью обладали животные наименьшего возраста (массы).

2. Исследование микроциркуляции в стенке ТК методом лазерной доплеровской флоуметрии позволило установить наличие однонаправленной динамики ПМ при ТКН вне зависимости от возраста и массы животных. Степень снижения ПМ на первой минуте после перевязки ТК позволяет прогнозировать последующую летальность животных: незначительное снижение ПМ на 22–45% вызывает гибель не более 10% крыс ($M=6.7\%$); снижение ПМ на 46–75% вызывает гибель 70–100% крыс ($M=89\%$).

3. Биомикроскопия стенки ТК у выживших животных с КН на 7-й день после операции (8-я группа, контроль) позволила выявить нарушения микроциркуляции в мелких венах и венулах (замедление скорости кровотока, венозное полнокровие, расширение венул), а также расширение лимфатических микрососудов (ЛМ). Однократное орошение операционного поля в области наложения межкишечного анастомоза небольшой дозой лимфостимулятора прямого действия пептидной природы (40,0 мкг/кг в 1,0 мл) способствовало на 7-е сутки после операции восстановлению микроциркуляции в кровеносных и лимфатических сосудах, снижению полнокровия и диаметра венул на 25% (в контроле на 15%), активации всех исследованных ЛМ, увеличению на 28% их сократительной активности по сравнению с контролем.

4. При морфологическом изучении стенки ТК у выживших животных с КН на 7-е сутки после операции (8-я группа, контроль) остаются признаки острых сосудистых изменений в микроциркуляторном русле кровеносных и лимфатических сосудов кишечной стенки, интерстициальный отек, нарушение структуры всех слоев стенки кишки, дренажной функции лимфатических сосудов, дилатации просвета кишки. Применение пептида по результатам морфологического исследования на 7-е сутки после операции свидетельствуют не только об улучшении, но и

о восстановлении нарушенного кровообращения и лимфообращения в стенке ТК, восстановлении лимфодренажа, регресса интерстициального отека, структурных повреждений всасывающего эпителия и гладкомышечных клеток мышечных слоев, ответственных за сократительную функцию и моторику кишечника.

5. Использование лимфостимулирующего пептида при ТКН по данным биомикроскопии, ЛДФ, морфологического исследования свидетельствует о его высокой эффективности, которая увеличивает выживаемость на 23% по сравнению с контролем (летальность 57%). У молодых животных, обладающих хорошо развитой лимфатической системой, пептид увеличивает выживаемость в среднем на 42%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1 Перевязка тонкой кишки с последующей резекцией поврежденного участка и наложением межкишечного анастомоза может быть использована как соответствующая условиям реальной клинической практики экспериментальная модель острой хирургической патологии для исследования местных и системных патологических процессов, обусловленных формированием КН.

2. Регистрация микроциркуляторных нарушений в участке кишки, расположенном проксимальнее места ее обтурации, методом лазерной доплеровской флоуметрии в сочетании с учетом экспериментальной летальности может быть использована в качестве метода оценки эффективности методов хирургического лечения КН при доклинической разработке новых оперативных подходов лечения данного заболевания.

3. Местные эффекты активации и подавления опиоидной пептидергической системы регуляции функций кишечника могут быть использованы для патофизиологического обоснования возможного применения агонистов и антагонистов системы в комплексном лечении острой кишечной непроходимости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лимфостимулирующая активность препаратов, улучшающих микрогемодинамику / Коваленко А.А. // Тезисы итоговой научной конференции молодых исследователей с международным участием «Татьянин день» Москва. - 2010. – С.76.
2. Влияние пептидного лимфостимулятора на заживление энтероэнтероанастомоза конец в конец при резекции тонкой кишки крысы после обтурации (экспериментальное исследование) / Коваленко А.А., Хугаева В.К., Харнас С.С., Полунин Г.В. // Вестник лимфологии. - 2013. - № 3. - С. 19.
3. Стимуляция лимфотока опиоидными пептидами при острой тонкокишечной обтурационной непроходимости / Коваленко А.А., Хугаева В.К., Полунин Г.В., Харнас С.С., Ананичук А.В. // Сборник: Успенские чтения. Материалы научно-практической конференции врачей России с международным участием, посвященной 60-летию кафедры общей хирургии Тверского государственного медицинского университета. - 2015. - С. 51-52.
4. Использование ЛДФ для изучения микроциркуляции и раннего прогнозирования выживаемости крыс при операциях на кишечнике / Коваленко А.А., Хугаева В.К. // XI Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» (Посвященная 100 –летию со дня рождения академика А.М. Чернухи). – Ярославль/ - 2017. – С.135.
5. Модель обтурационной тонкокишечной непроходимости у экспериментальных животных / Коваленко А.А., Крючко П.В. // Материалы 90-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Теоретические и практические аспекты современной медицины», посвященной 100-летию медицинского образования в Крыму. – Симферополь. - 2018. - С. 661 – 663.
6. Managing microcirculatory disorders in mouse model of ileus with opioid peptide/ Kovalenko A. A., Kryuchko P. V. // Morphology. – 2018. - V.153. - № 3 (Supplement). – P. 67.
7. Гистологическое исследование тонкой кишки крысы после хирургического устранения обтурационной тонкокишечной непроходимости и стимуляции лимфотока пептидом / Коваленко А.А., Титова Г.П., Хугаева В.К. // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** - 2018 - 62(4)- С. 151 – 156.
8. Изучение микроциркуляторного русла брыжейки и стенки тонкой кишки при комплексном хирургическом лечении острой кишечной непроходимости с использованием синтетического пептида / Коваленко А.А., Хугаева В.К., Пахомов Д.В., Караханян К.М. // **Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.** - 2018. - №12. – С. 87 – 92.
9. Экспериментальное обоснование применения синтетического пептида в комплексном хирургическом лечении острой кишечной непроходимости / Коваленко А.А., Хугаева В.К. // **Патогенез.** - 2018. - Т. 16. N. 4. – С.138 – 140.

Патент

1. Способ профилактики несостоятельности межкишечного анастомоза при операциях на брюшной полости с помощью пептида.: пат. №2664702 Рос. Федерация. Патентообладатель Морозов С.Г./ Морозов С.Г., Хугаева В.К., Коваленко А.А., Ардасенов А.В– 2016131670/16, заявл. 01.08.2016, опубликовано 21.08.2018 – Бюл. №24. – 8 с.

Список использованных сокращений:

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КН - кишечная непроходимость

ЛДФ - лазерная доплеровская флоуметрия

ЛПС - липополисахариды
ЛМ – лимфатические микрососуды
МА – молекулы адгезии
МЦ - микроциркуляция
КН - кишечная непроходимость
ОП - опиоидные пептиды
ОР - опиоидные рецепторы
ТКН – тонкокишечная непроходимость
ПМ - показатель микроциркуляции
СА - сократительная активность
ТК – тонкая кишка
ЭМ - эндоморфин
ЭЭА -энтеро-энтероанастомоз