

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ БИОЭКСПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТИ АНАСТОМОЗОВ ПОЛЫХ ОРГАНОВ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**Роман Маратович ИБРАГИМОВ***Башкирский государственный медицинский университет
450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3*

В статье представлены результаты экспериментального применения биоэксплантата на основе модифицированной гиалуроновой кислоты, используемого для профилактики несостоятельности швов анастомозов желудочно-кишечного тракта. В эксперименте на 84 белых крысах изучены биологические свойства биоэксплантата, эффективность его применения, в том числе в агрессивных условиях перитонита. В ходе экспериментов выяснено, что биоэксплантат повышает надежность линии анастомоза и может способствовать профилактике несостоятельности сформированного соустья.

Ключевые слова: применение, биоэксплантат, защита, желудочно-кишечные анастомозы.

Несостоятельность швов кишечной стенки является одной из самых актуальных проблем в хирургии желудочно-кишечного тракта, она наблюдается в 1,5–3% случаев при операциях на желудке и двенадцатиперстной кишке, в 2,8–8,7% случаев при операциях на тонкой и в 4–32% случаев при операциях на толстой кишке [1–4]. Большинство послеоперационных перитонитов, абсцессов брюшной полости, кишечных свищей, а также связанных с этими грозными осложнениями повторных операций и летальных исходов обусловлено, прежде всего, несостоятельностью швов [1]. Применение новых шовных материалов [5], аппаратного шва [6, 7], мощных антибактериальных средств, укрепление позиций однорядного прецизионного кишечного шва [8, 9] позволили снизить частоту несостоятельности, но эти результаты более заметны в плановой хирургии [7]. В неотложной хирургии при наличии инфицирования брюшной полости, отека и воспалительных изменений кишечной стенки, резкого снижения репаративных резервов организма продолжает доминировать двухрядный шов [8, 9]. Шовные материалы не могут полностью решить проблему биологической герметичности кишечного шва и существенно повлиять на характер процессов заживления в области анастомоза [2, 10]. Попытки укрепления линии швов, связанные с применением синтетических клеев, не нашли широкого клинического применения из-за токсичности цианакрилатов, их способности замедлять репарацию и образовывать обширные гранулемы [1, 8, 10].

Более перспективным в этой области оказывается применение биологических стимуляторов регенерации и биологических адгезивов, позволяющих влиять на скорость репаратив-

ных процессов, в частности пленок на основе коллагена [10–12]. Однако поликомпонентная коллагеновая пленка оказывает положительное действие на течение раневого процесса в зоне кишечного анастомоза лишь за счет механической изоляции от перитонеального экссудата и антисептического действия содержащихся в ней антибиотиков, незначительно влияя на процессы регенерации [10]. В результате она практически не влияет на скорость достижения анастомозом биологической герметичности и не препятствует микробной контаминации из просвета кишечника. Для фиксации коллагеновой пленки требуются дополнительные швы или клеевая композиция [10, 12]. Однако моделирование пленки в условиях отека и воспалительных изменений кишечной стенки, особенно брыжеечного края кишки, трудоемко и не всегда эффективно [10], поэтому такой способ для дополнительной защиты кишечного соустья не нашел широкого клинического применения.

Применение для укрепления линии швов препаратов фибринового клея оказалось одним из весьма перспективных направлений [4, 5, 11, 12]. В то же время использование для укрепления анастомоза фибрин-коллагеновых пластин ТахоКомб [11] является экономически не рентабельной процедурой, а моделирование пластины неудобно, что имеет особое значение в области брыжеечного края, где обычно и развивается несостоятельность швов. Необходимость и преимущества применения фибринового клея для укрепления линии кишечного шва не нашли до настоящего времени должного научного обоснования с точки зрения изучения тонких механизмов регенерации в зоне анастомозов «высокого риска».

Ибрагимов Р.М. — аспирант каф. хирургических болезней, e-mail: Goboy3@rambler.ru

Целями настоящего исследования явились повышение биологической герметичности кишечного шва (путем дополнительного укрепления биоэксплантатом), определение устойчивости биоэксплантата к агрессивным условиям перитонита.

Совместно с институтом нефтехимии и катализа г. Уфы разработан биоэксплантат на основе модифицированной гиалуроновой кислоты (который представляет собой окисленную гиалуроновую кислоту с 5-аминосалициловой кислотой) для профилактики несостоятельности швов линии анастомоза. Эта пленка применяется как барьер на пути микроорганизмов, способствуя процессам регенерации и ангиогенеза (дата публикации патента 10.11.2002 г., регистрационный номер заявки 200124165/14).

Материал и методы

В ходе эксперимента на 84 белых половозрелых крысах-самках линии Вистар массой 190 ± 20 г. были исследованы микробная проницаемость и особенности заживления кишечного анастомоза в стерильных условиях и при перитоните, с укреплением линии анастомоза биоэксплантатом и без укрепления.

Особенности заживления укрепленных и неукрепленных, тонко- и толстокишечных соустьев изучали, проведя 2 серии экспериментов. В 1-й серии экспериментальных животных разделили на 2 группы: у крыс 1-й группы (опытной) анастомозы формировали в стерильных условиях, дополнительно укрепляя путем аппликации биоэксплантата; у крыс 2-й группы (контрольной) анастомозы формировали в тех же условиях, но без биоэксплантата. Во 2-й серии экспериментальных животных также разделили на 2 группы: у крыс 1-й группы (опытной) анастомозы формировали в условиях калового перитонита, дополнительно укрепляя биоэксплантатом; у крыс 2-й группы (контрольной) анастомозы формировали в тех же условиях, но без биоэксплантата.

Экспериментальный перитонит моделировали общепринятым методом — внутрибрюшинным введением 30% каловой взвеси (из расчета 1 мл взвеси на 1 кг массы тела животного), которая готовилась из экскрементов экспериментального животного [13]. Через 24 ч проводили средне-срединную лапаротомию для наложения анастомозов, у животных констатировали явления распространенного серозно-фибринозного перитонита: после вскрытия брюшной полости наблюдался характерный неприятный запах, при ревизии сосуды брыжейки были полнокровны, на поверхности внутренних органов имелись фибринозные отложения, сальник сморщен и гиперемирован.

Анастомозы формировали по единой методике. В просвет раны выводилась тонкая или толстая кишка. Далее по противобрыжечному краю в поперечном направлении пересекали кишечник с сохранением брыжейки. Следующим этапом было формирование соустья узловым однорядным швом (Пирогова—Матешука) нитью Викрил (0000). Аппликацию биоэксплантата в опытных группах производили в один слой с перекрыванием линии анастомоза на 5 мм, пленка за счет высоких адгезивных свойств в дополнительной фиксации не нуждалась.

Микробную обсемененность анастомозов исследовали путем взятия смывов с линии шва через 24 и 72 ч после операции. Животным из опытной и контрольной группы без перитонита с соблюдением правил асептики и антисептики производили релапаротомию и стерильной ватной палочкой брали смывы с анастомозов в стерильную пробирку. Культивирование микроорганизмов осуществляли на среде Эндо. У животных с моделированным перитонитом характер и микробная обсемененность не исследовались. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего арифметического значения. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Для морфологической оценки изменений в моделях анастомозов производили забор части кишечника с различными сроками заживления (7-е, 14-е и 30-е сутки) размером 1,5 см с захватом сформированного соустья, фиксировали в 10% формалине. Всего приготовлено 2050 микропрепаратов.

Из эксперимента животных выводили путем передозировки ингаляционного анестетика (хлороформ) в замкнутом пространстве.

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с международными принципами Хельсинкской декларации от 2000 г. о гуманном отношении к животным и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.).

Результаты и обсуждение

В послеоперационном периоде осложнений и летальных исходов, связанных с применением эфирного наркоза, не наблюдалось. Двигательная активность восстанавливалась в течение первых 12 часов после оперативного вмешательства.

Взятие материала на микробиологическое исследование провели у 21 крысы через сутки и у 20 крыс на третьи сутки после операции.

За основу взята микробная обсемененность просвета кишечника — $144,3 \pm 19,1$ КОЕ/г. После сравнения степени микробной обсемененности анастомозов в опытной и контрольной группе без перитонита получено достоверное различие результатов: в опытной группе через сутки после операции она в среднем составляла $45,0 \pm 12,7$ КОЕ/г, будучи в 3 раза ниже, чем в контрольной группе ($130,0 \pm 13,4$ КОЕ/г), а на 3-и сутки была в 16 раз ниже, чем в контрольной группе ($10,0 \pm 3,8$ и $85,0 \pm 7,1$ КОЕ/г соответственно, $p < 0,001$). Таким образом, количественная обсемененность опытных анастомозов, укрепленных биополимером, через 1 и 3 суток после операции значительно ниже, чем в контрольных соустьях.

Качественный состав микрофлоры, высеянной с поверхности опытных и контрольных анастомозов, без перитонита был следующим: в 6 сериях получены комбинации *E. coli*, *St. aureus*, а также *Str. viridans*, *Str. epidermitis*, *Citrobacter*, *Pr. mirabius*, а в 9 сериях — *St. aureus* и *E. coli*, что косвенно может свидетельствовать о чистоте эксперимента.

Изучение особенностей заживления тонкой и толстокишечных анастомозов в эксперименте на крысах в условиях моделированного перитонита и без него позволило выявить эффект стимуляции биополимером репаративных процессов в стенке кишки. Биоэксплантат способствовал более быстрой регенерации кишечной стенки по сравнению с контрольными анастомозами, где его не наносили.

У животных из контрольной группы без перитонита на 7-е сутки после операции наблюдали диапедез эритроцитов за пределы сосудистого русла, определялось формирование клеточного экссудата. К 14-м суткам во всех тканевых структурах тонкой и толстой кишки отмечали пролиферативные процессы и признаки ангиогенеза. В зоне расположения шовного материала наблюдали выраженную макрофагическую реакцию. Наряду с макрофагами и лимфоцитами встречаются фибробласты, которые активно синтезируют межклеточное вещество, т. е. идет формирование грануляционной ткани, образование и рост кровеносных капилляров.

Для крыс опытной группы без перитонита на 7-е сутки после операции (рис. 1) была характерна менее выраженная воспалительная инфильтрация зоны шовного материала, активный синтез межклеточного вещества, частичная эпителизация дефекта слизистой оболочки. С 6-х суток наблюдалась ранняя активация фибропластических процессов, завершающаяся

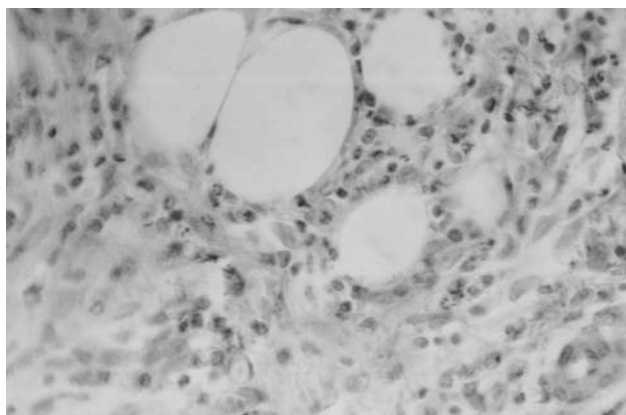


Рис. 1. Воспалительная реакция зоны шовного материала тонкой кишки через 7 дней после операции у животных опытной группы без перитонита. Окраска гематоксилином-эозином. Ок. 10, об. 40.

формированием нежного рубца к 13–14-м суткам, также к этим срокам отмечена регенерация железистого аппарата в слизистой оболочке толстой и тонкой кишки. После укрепления анастомозов биоэксплантатом воспалительная реакция вокруг шовного материала в ранние сроки была выражена меньше, чем у животных из контрольной группы, что проявлялось слабой лейкоцитарной инфильтрацией из полиморфноядерных лейкоцитов. Реакция на шовный материал в укрепленном биоэксплантате кишечном шве чаще имела характер асептического воспаления и не приводила к абсцедированию вокруг лигатур.

У животных контрольной группы с перитонитом на 7-е сутки после операции наблюдалась выраженная воспалительная реакция в тонкой и толстой кишке, где определялось большое скопление клеток макрофагальной системы, а также вокруг шовного материала со скапливанием лимфоидных клеток. К 14-м суткам у крыс контрольной группы с перитонитом сохранялась выраженная воспалительная реакция всех трех оболочек, наблюдалось скопление макрофагов и эозинофилов. Четкое различие между криптами и ворсинками тонкой кишки определить было не возможно, тогда как крипты толстой кишки имели широкий просвет, однако ее слизистая оболочка была полностью покрыта однослойным цилиндрическим эпителием в сочетании с бокаловидными клетками. Образование грануляционной ткани с большим содержанием различных клеточных элементов приводит к образованию значительного количества коллагеновых волокон, что указывает на формирование грубой рубцовой структуры.

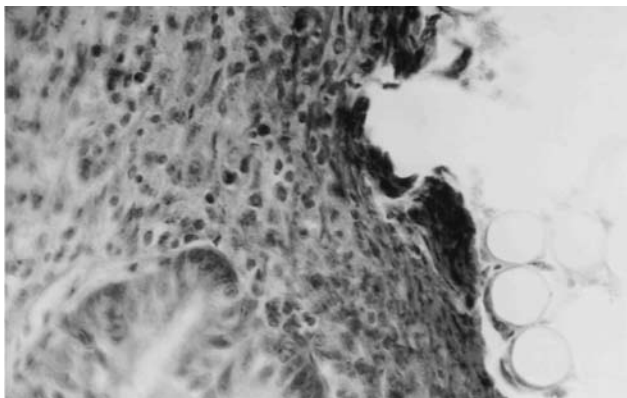


Рис. 2. Умеренная воспалительная реакция собственного слоя слизистой оболочки тонкой кишки через 7 дней после операции у животных опытной группы с перитонитом. Окраска гематоксилином-эозином. Ок. 10, об. 40.

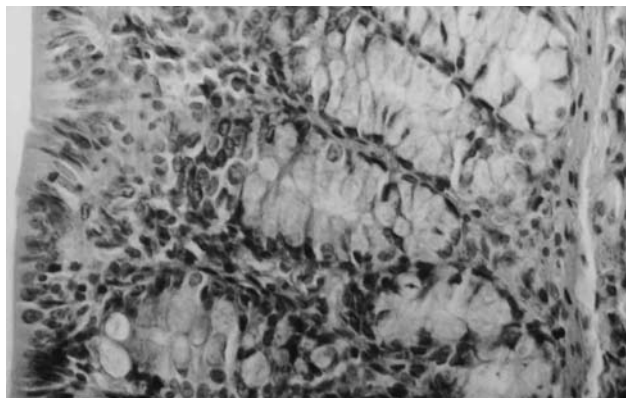


Рис. 3. Диффузная инфильтрация лимфоидных клеток вокруг крипт толстой кишки через 14 дней после операции у животных 2-й подопытной группы. Окраска гематоксилином-эозином. Ок. 10, об. 40.

У животных опытной группы с перитонитом на 7-е сутки после операции воспалительная реакция была умеренной (**рис. 2**) определялись взаимосвязанные процессы регенерации. В зоне травмы мышечной оболочки шли активные пролиферативные процессы, миобласты митотически делились, приобретали веретеновидную форму и смещались к противоположному краю травмы.

На 14-е сутки после операции в рыхлой соединительной ткани крыс опытной группы с перитонитом наблюдалось диффузное расположение лимфоидных клеток. Лимфоидные клетки также встречались между мышечной и серозной оболочками и вокруг крипт толстой кишки (**рис. 3**). В мышечной оболочке наблюдалось значительное развитие гладкомышечной ткани. Воспалительная реакция была выражена меньше, чем у животных контрольной группы с перитонитом.

На 30-е сутки у животных контрольной группы с перитонитом наблюдались остаточные признаки мощного воспалительного процесса, о чем свидетельствует наличие в зоне анастомоза значительного количества иммунокомпетентных клеток, в опытной группе процессы регенерации к этому сроку были завершены.

Сравнительная оценка воздействия биополимера на швы анастомозов в условиях перитонита и без него показала косвенное преимущество методики дополнительного укрепления шва анастомоза биоэксплантатом. Были проанализированы исходы, осложнения в виде несостоятельности швов, а также сроки заживления.

Опытная группа, с перитонитом и без него, составила 60 (71,4%) крыс, а контрольная — 24 (28,6%) крысы. В контрольной группе без перитонита пала 1 (8,3%) крыса на 12 сутки после операции, при вскрытии швы состоятельны,

наблюдаются грубые рубцовые изменения, непроходимость тонкого кишечника; в опытной группе без перитонита летальных исходов не наблюдалось. В опытной группе с перитонитом несостоятельность швов возникла у 3 (9,9%) крыс, в контрольной — у 5 (41,5%) крыс, у 2 (16,6%) из них была несостоятельность тонкой кишки, у 3 (24,9%) — толстой кишки.

Умерших животных вскрывали для визуального контроля анастомоза и выяснения причин летального исхода, гистологическое исследование анастомозов у них не проводилось.

Выводы:

1) Экспериментальные исследования показали, что биоэксплантат сохраняет свои свойства в агрессивных условиях перитонита.

2) Аппликация биоэксплантата способствует снижению микробной обсемененности в зоне соустья с $130,0 \pm 13,4$ до $45,0 \pm 12,7$ КОЕ/г через сутки и с $85,0 \pm 7,1$ до $10,0 \pm 3,8$ КОЕ/г через трое суток после операции.

3) Морфологические исследования зоны кишечных анастомозов в динамике показали, что применение биоэксплантата улучшает регенераторные процессы в зоне соустьев даже в условиях перитонита.

Таким образом, применение биоэксплантата в пластических целях обосновано в сложных, нестандартных ситуациях. Наиболее целесообразно использовать его в неблагоприятных условиях — перитонит, кишечная непроходимость различного генеза, выраженные воспалительно-инфильтративные изменения органов и тканей.

Данный биополимер можно использовать также для закрытия дефектов серозной оболочки и профилактики перфорации кишки при нанесении случайной электротравмы при лапароско-

пических вмешательствах. В подобных случаях аппликацией биоэксплантата можно предупредить развитие серьезных осложнений и снизить риск повторного оперативного вмешательства.

Литература

1. Воробьев Г.И., Минц Я.В., Веселов В.В., Мушников В.Н. Комплексная оценка заживления кишечных анастомозов в раннем послеоперационном периоде // Хирургия. 1989. (2). 47–51.
Vorobyev G.I., Minc Ya.V., Vecelov V.V., Mushnikova V.N. A complex assessment of an adhesion of intestinal anastomoses in the early postoperative stage // Khirurgiya. 1989. (2). 47–51.
2. Лохвицкий С.В., Дарвин В.В. Профилактика несостоятельности швов ободочной кишки при ее повреждениях // Khirurgiya. 1992. (9). 51–55.
Lohvickiy S.V., Darvin V.V. Prophylaxis of an incompetence of junctures of a colonic intestine at its damages // Surgery 1992. (9). 51–55.
3. Милоков В.Е., Санин М.Р., Ефименко Н.А. Морфофункциональные особенности заживления кишечной раны при формировании различных энтеро-энтероанастомозов // Хирургия. 2004. (1): 38–41.
Milukov V.E., Sanin M.R., Efimenko N.A. Morfofunctional of feature of an adhesion of an intestinal wound at formation of various enteroanastomoses // Khirurgiya. 2004. (1): 38–41.
4. Хоробрых Т.В. Лечение травматических повреждений печени с использованием аналога фибринового клея: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1995.
Khorobrykh T.V. Treatment of traumatic damages of a liver with use of analogue of fibrinous glue: Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. M., 1995.
5. Хоробрых Т.В., Соловьев Г.М., Антонов А.Н. и др. Опыт использования фибринового клея для укрепления линии швов кишечных анастомозов «высокого риска» // Гастроэнтерология. 2002. (2–3). 139.
Khorobrykh T.V., Soloviyv G.M., Antonov A.N. Etc. Experience of use of fibrinous glue for strengthening a line of junctures of intestinal anastomoses of «high risk» // Gastroenterologiya. 2002. (2–3). 139.
6. Егоров В.И., Турусов Р.А., Счастливцев И.В., Баранов А.О. Кишечные анастомозы. Физико-механические аспекты. М.: Видар-М, 2004. 192 с.
Egorov V.I., Turusov R.A., Schastlivtsev I.V., Baranov A.O. Intestinal anastomoses. Physical-mechanical aspects. M.: Vidar-M, 2004. 192 p.
7. Левчик Е.Ю., Абоянц Р.К., Истратов Л.П. Способ защиты швов на желудке и кишечнике // Хирургия. 1999. (9). 13–15.
Levchik E.U., Aboyance R.K., Istranov L.P. A method of protection of junctures on a stomach and intestine // Khirurgiya. 1999. (9). 13–15.
8. Васильев А.П., Шотт А.В., Запорожец А.А. Использование биологических клеевых композиций при наложении кишечного шва // Здравоохранение Белоруссии. 1989. (5). 14–18.
Vasshevich A.P., Shott A.V., Zaporozhets A.A. Use of biological glutinous compositions at applying an intestinal juncture // Zdravookhranenie Belorussii. 1989. (5). 14–18.
9. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Антонов О.Н. Профилактика недостаточности анастомозов желудочно-кишечного тракта // Хирургия. 2005. (12). 25–29.
Chernousov A.F., Khorobrykh T.V., Antonov O.N. Prophylaxis of failure of anastomoses of a gastrointestinal path // Khirurgiya. 2005. (12). 25–29.
10. Антонов А.И. Роль биологической стимуляции регенерации в защите кишечных анастомозов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1993.
Antonov A.I. A role of a biological stimulation of neogenesis in protection of intestinal anastomoses // Avtoref. diss. ... kand. med. nauk. M., 1993.
11. Шуркалин Б.К., Горский В.А., Воленко А.В. и др. Возможности, результаты и перспективы укрепления кишечных швов фибрин-коллагеновой субстанцией ТахоКомб // Хирургия. 2004. (2). 53–55.
Shurkalin B.K., Gorskiy V.A., Volenko A.V. et al. Opportunity, results and prospects of strengthening of intestinal junctures by a fibrin-collagenic substance TahoKomb // Khirurgiya. 2004. (2). 53–55.
12. Yilmaz H.G., Odabasi M., Buyukbayram H., Bac B. Effectiveness of fibrin tissue adhesive for colocolic anastomosis reliability // Ulus Travma Derg. 2001. 7. (2). 87–90.
13. Ашурметов Р.И., Хоршаева В.А., Кассымов А.Х., Баченов Л.Г. Моделирование разлитого перитонита // Хирургия. 1992. (4). 77–80.
Ashurmetov R.I., Horoshaeva V.A., Kassimov A.Kh., Bacshenov L.G. Modeling of a poured peritonitis // Khirurgiya. 1992. (4). 77–80.

EXPERIENCE OF APPLICATION OF BIOEXPLANT ON THE BASIS OF THE MODIFIED GYALURONIC ACID FOR PROPHYLAXIS OF HOLLOW ORGAN ANASTOMOSES FAILURE (EXPERIMENTAL RESEARCH)

Roman Maratovich IBRAGIMOV

Bashkir state medical university
3, Lenin str., 450000, Ufa

The article presents the results of the experimental application of the bioexplant on the basis of a modified gyaluronic acid used for gastrointestinal anastomosis protection. In the experiments on 42 white rats the biological properties of the bioexplant and the effectiveness of its application in the aggressive conditions of the peritonitis were studied. The experiments shows, that the bioexplant increases the reliability, of the gastrointestinal anastomosis and that this bioexplant preserves its properties in the unfavorable conditions of a peritonitis.

Keywords: application, bioexplant, protection, gastrointestinal anastomoses.

Ibrogimov R.M. — the post-graduate student of faculty of surgical disease, e-mail: Goboy3@rambler.ru