

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ХАСАНОВ Расуль Ринатович**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
НОВЫХ СТРАТЕГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ЛЕЧЕНИЯ ДЕТЕЙ  
С СИНДРОМОМ КОРОТКОЙ КИШКИ**

14.01.19 – детская хирургия

Диссертация на соискание ученой степени доктора  
медицинских наук

Научные консультанты:

д.м.н., профессор Гумеров А.А.

д.м.н., профессор Вессель Л.М.

Уфа – 2021

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Общая характеристика синдрома короткой кишки (этиология, эпидемиология, летальность, парентеральное питание, принципы терапии, социально-экономическая значимость) .....	15
1.2 Патоморфологические изменения мышечных слоёв тонкой кишки при синдроме короткой кишки .....	22
1.3 Участие нервной системы кишечника в кишечной адаптации при синдроме короткой кишки .....	24
1.4 Применение лучевых методов исследования при синдроме короткой кишки .....	26
1.5 Хирургическое лечение синдрома короткой кишки .....	31
1.6 Нутритивная поддержка и факторы, влияющие на восстановление полного энтерального питания после удлиняющих кишечник операций .....	40
1.7 Тканевая инженерия кишечника. Роль нервной системы в кишечнике .....	42
1.8 Тканевая инженерия мышечного слоя тонкой кишки .....	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	49
2.1 Материалы и методы первого экспериментального исследования .....	49
2.1.1 Изучение мышечных слоёв и межмышечных нервных сплетений при синдроме короткой кишки .....	49
2.2 Материалы и методы клинического исследования .....	55
2.2.1 Общая характеристика клинического материала .....	55
2.2.2 Определение эффективности лучевых методов диагностики при синдроме короткой кишки .....	62
2.2.3 Характеристика процессов кишечной адаптации в мышечных слоях и нервной системе кишечника в тонкокишечных биоптатах пациентов с синдромом короткой кишки .....	63
2.2.4 Методы исследования клинического материала .....	63
2.2.5 Методики удлиняющих кишечник операций .....	66
2.2.6 Исследование тонкокишечных биоптатов пациентов с синдромом короткой кишки .....	71
2.3 Материалы и методы второго экспериментального исследования .....	73
2.3.1 Культивирование межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе как ключевого элемента для тканевой инженерии тонкой кишки....	73
2.3.2 Создание иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям для тканевой инженерии кишечника .....	79
2.4 Статистический анализ .....	82

ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ АДАПТАЦИИ В МЫШЕЧНЫХ СЛОЯХ И МЕЖМЫШЕЧНЫХ НЕРВНЫХ СПЛЕТЕНИЯХ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ)	83
3.1 Анализ патоморфологических изменений мышечных слоёв тонкой кишки.	83
3.2 Исследование стволовых клеток (окрашенных антителами к нестину) в межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки .....	89
3.3 Исследование стволовых клеток (окрашенных антителами к нестину) в мышечных слоях тонкой кишки.....	94
3.4 Корреляция между толщиной мышечных слоёв, долей стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и выраженностью экспрессии стволовых клеток в мышечных слоях стенки тонкой кишки.....	95
ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ КИШЕЧНОЙ АДАПТАЦИИ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ КОРОТКОЙ КИШКИ.....	98
ГЛАВА 5 ЛУЧЕВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ.....	105
5.1 Эффективность лучевых методов исследования для определения длины тонкой кишки .....	105
5.2 Эффективность лучевых методов исследования при диагностике дилатации тонкой кишки .....	108
5.3 Эффективность лучевых методов исследования для определения стенозов тонкой кишки .....	112
ГЛАВА 6 УДЛИНЯЮЩИЕ КИШЕЧНИК ОПЕРАЦИИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ.....	119
6.1 Предоперационная подготовка.....	119
6.2 Хирургическое лечение (операция LILT и операция STEP) .....	121
6.3 Комбинированная операция LILT и STEP (LILT+STEP).....	126
6.4 Послеоперационное ведение .....	127
6.5 Релапаротомии по поводу осложнений в раннем и отдалённом послеоперационных периодах.....	129
6.6 Повторные удлиняющие операции .....	132
6.7 Летальность .....	133
6.8 Показания и противопоказания для операции LILT и STEP.....	134
ГЛАВА 7 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА НУТРИТИВНУЮ ПОДДЕРЖКУ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ УДЛИНЯЮЩИХ КИШЕЧНИК ОПЕРАЦИЙ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ КОРОТКОЙ КИШКИ.....	138

ГЛАВА 8 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЖМЫШЕЧНОГО НЕРВНОГО СПЛЕТЕНИЯ В ТРЁХМЕРНОМ МАТРИКСЕ КАК КЛЮЧЕВОГО ЭЛЕМЕНТА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ТОНКОЙ КИШКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ) .....	151
ГЛАВА 9 СОЗДАНИЕ ИННЕРВИРОВАННОГО МЫШЕЧНОГО СЛОЯ ТОНКОЙ КИШКИ, СПОСОБНОГО К СОКРАЩЕНИЯМ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ТОНКОЙ КИШКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ) .....	160
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	175
ВЫВОДЫ.....	206
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	209
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	212
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	214

## ВВЕДЕНИЕ

Синдром короткой кишки (СКК) остается серьезной медицинской и социальной проблемой современности.

СКК развивается в результате обширной резекции тонкой кишки, проведенной при оперативном лечении врожденных пороков развития и заболеваний кишечника, и приводит к хронической кишечной недостаточности, проявляющейся мальабсорбцией, мальдигестией, мальнутрицией и расстройствами гомеостаза (Сухотник И.Г., 2017; Парфенов А.И. и др., 2017; Pakarinen M.P. et al., 2015; Raphael B.P., 2020).

Частота случаев СКК среди новорождённых составляет 24,5 на 100000 живорожденных, причем среди детей, рождённых до 37 недели гестации, СКК развивается значительно чаще, по сравнению с доношенными новорождёнными: 353.7/100000 живорождений и 3.5/100,000 живорождений соответственно (Аверьянова Ю.В. и др., 2016; Wales P.W. et al., 2004; Wales P.W. et al., 2010).

Компенсация хронической кишечной недостаточности у таких пациентов осуществляется с помощью парентерального питания (ПП). ПП является важнейшей и первостепенной основой терапии, которая проводится на протяжении нескольких лет, а у некоторых пациентов всю жизнь. Однако, длительное применение ПП связано с риском развития таких серьёзных осложнений, как поражение печени, катетер-ассоциированный сепсис и катетер-индуцированный венозный тромбоз с потерей сосудистого доступа (Ерпулёва Ю.В. и др., 2017; O'Keefe S.J. et al., 2010; Rege A.S. et al., 2013).

Стратегической целью лечения СКК является наиболее раннее восстановление функции кишечника с переводом пациентов на полное энтеральное питание, что определяет перспективы благоприятного прогноза лечения у данного контингента больных (Ерпулева Ю.В. и др., 2014; Nucci A. et al., 2008; Weih S. et al., 2012).

Среди различных видов хирургического лечения СКК наиболее часто используют продольное кишечное удлинение и сшивание (LILT), и серийную поперечную энтероластику (STEP) (Аверьянова Ю.В., 2016; Сухотник И.Г., 2017; Frongia G., 2013; Shah A.A., 2019). Однако, несмотря на достигнутые успехи, проблема лечения данной патологии ещё далека от своего окончательного решения, о чём свидетельствует небольшой процент восстановления полного энтерального питания у больных (45-70%) (Аверьянова Ю.В., 2018; Coletta R., 2019; Shah A.A., 2019), высокая частота послеоперационных осложнений (до 42,8%) (Frongia G. et al., 2013) и летальных исходов (до 37,5% у детей и до 55% у взрослых) (Messing et al., 1999; Weih S. et al., 2012; Pederiva F., 2018).

До сих пор малоизученными остаются этиопатогенетические механизмы формирования дилатации тонкой кишки, патоморфологические изменения мышечных слоёв тонкой кишки и нервной системы кишечника (энтеральной нервной системы) при СКК, что позволило бы обосновать целесообразность применения удлиняющих кишечник операций.

В литературе недостаточно описаны методы предоперационной диагностики сохранившихся участков тонкой кишки. Отсутствует единое мнение о влиянии остаточной длины тонкой кишки, илеоцекального клапана, остаточной длины толстой кишки и редилатации тонкой кишки на нутритивный статус пациентов, и переход на полное энтеральное питание (Аверьянова Ю.В., 2016; Pakerinen M.P., 2015; Martin L.Y., 2018; Colletta R., 2019).

Трансплантация кишечника с показателями пятилетней выживаемости трансплантата (44-57%) и пациента (56%) имеет неудовлетворительные результаты лечения (Grant D. et al., 2015; Lacaille F. et al., 2017) и используется только в случаях неэффективности остальных методов лечения, и отсутствия другого альтернативного способа сохранения жизни пациента (Celik N. et al., 2018; Kaufman S.S. et al., 2019; Lauro A. et al., 2019). Всё перечисленное диктует необходимость совершенствования существующих и разработки новых методов лечения синдрома короткой кишки. Перспективным направлением является тканевая инженерия тонкой кишки, которая может стать инновационным методом

лечения таких пациентов, а применение органоспецифических клеток самого пациента позволит реализовать персонифицированный подход (Косулин А.В., 2018; Martin L.Y., 2018; Clevers H., 2019).

Высокая инвалидизация и смертность, значительное снижение качества жизни, сложные социально-экономические аспекты и неэффективность современных методов лечения у ряда пациентов, свидетельствуют об актуальности проблемы и необходимости поиска новых методов хирургического лечения данного заболевания (Кокорина А.А. и др., 2018; Косулин А.В. и др., 2018; Dosh R.H. et al., 2018; Martin L.Y. et al., 2018).

Все вышеизложенное, определило несомненную актуальность, теоретическую и практическую значимость данной проблемы и явилось основанием для проведения экспериментально-клинического исследования.

**Цель работы:** обосновать применение тканевой инженерии тонкой кишки при хирургическом лечении детей с синдромом короткой кишки на основании экспериментально-клинического исследования.

**Задачи исследования:**

1. Изучить в эксперименте на лабораторных животных патоморфологические изменения мышечных слоёв тонкой кишки, исследовать стволовые клетки в межмышечных нервных сплетениях и в мышечных слоях тонкой кишки при СКК, и определить взаимосвязи между ними.

2. Изучить изменения нейронов и стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки у пациентов с синдромом короткой кишки и морфологически обосновать целесообразность проведения удлиняющих кишечник операций у детей.

3. Провести сравнительный анализ диагностической эффективности ультразвукового исследования (УЗИ), рентгенконтрастного исследования (РКИ) и магнитно-резонансной томографии (гидро-МРТ) для выявления дилатации,

стенозов и измерения длины сохранившейся тонкой кишки при синдроме короткой кишки.

4. Провести сравнительное изучение удлиняющих кишечник операций (продольное кишечное удлинение и сшивание (LILT), и последовательная поперечная энтеропластика (STEP)), определить и систематизировать показания и противопоказания к ним.

5. Изучить влияние удлиняющих кишечник операций, длины тонкой кишки, наличия илеоцекального клапана и толстой кишки, и развития редилатации (повторной дилатации) тонкой кишки на восстановление полного энтерального питания у пациентов с СКК, клинически обосновать необходимость создания биоинженерной тонкой кишки методом тканевой инженерии для лечения детей с СКК.

6. Разработать в эксперименте метод выращивания культуры клеток межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе, необходимого для создания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки при помощи тканевой инженерии.

7. Разработать в эксперименте метод выращивания иннервированного, способного к сокращениям мышечного слоя тонкой кишки, являющегося ключевым элементом в тканевой инженерии кишечника, выявить взаимодействия между нервными и мышечными клетками в полученной иннервированной гладкомышечной ткани.

### **Научная новизна**

1. Впервые в эксперименте на животных выявлены морфофункциональные закономерности адаптационной трансформации мышечных слоёв и нервной системы кишечника, характеризующиеся развитием дилатации и гипертрофии мышечных слоёв сохранившейся тонкой кишки. Выявленные изменения являются результатом кишечной адаптации и патофизиологичны для синдрома короткой кишки.



2. Впервые в эксперименте на животных установлено, что при синдроме короткой кишки увеличивается количество межмышечных нервных сплетений, содержащих стволовые клетки, а также возрастает доля стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях во всей тонкой кишке (тощая кишка и подвздошная кишка).

3. Впервые проведены морфологические исследования стволовых и нервных клеток в биоптатах тонкой кишки у пациентов с СКК, которые выявили достоверное увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях при СКК.

4. Впервые морфологически обоснована целесообразность проведения удлиняющих кишечник операции у детей с СКК на основании того, что дилатация, служащая источником аутологичной кишечной стенки, необходимой для удлиняющих кишечник операции, является неотъемлемым компонентом кишечной адаптации при СКК и вместе с гипертрофией мышечных слоёв развивается у всех пациентов с СКК.

5. Впервые определена роль гидро-МРТ при исследовании тонкой кишки при СКК у детей, как наиболее информативного неинвазивного метода диагностики, по сравнению с УЗИ органов брюшной полости и рентгенконтрастного исследования ЖКТ.

6. Определены и систематизированы показания и противопоказания к удлиняющим кишечник операциям в зависимости от места, формы и протяжённости дилатации тонкой кишки.

7. Впервые показано, что наличие более половины сохранённой толстой кишки у пациента с СКК статистически достоверно ускоряет сроки восстановления энтерального питания у детей с СКК.

8. Впервые в эксперименте доказана возможность и разработан метод выращивания энтерального нервного сплетения в трёхмерной среде *in vitro* для целей тканевой инженерии тонкой кишки.

9. Впервые в эксперименте разработан метод выращивания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям *in*

in vitro и экспериментально обоснована целесообразность совместного культивирования гладкомышечных клеток и клеток нервной системы кишечника для создания иннервированного мышечного слоя, способного к перистальтике.

10. Экспериментально обосновано, что тканевая инженерия тонкой кишки является перспективным направлением, так как современные технологии позволяют успешно создавать ключевые элементы биоинженерной кишки, в частности, иннервированную мышечную ткань, что приближает клиническое использование этой методики при лечении детей с СКК.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Установлено, что дилатация и гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки при СКК являются результатом кишечной адаптации и развиваются с разной степенью выраженности у всех пациентов с СКК, тем самым, обоснована необходимость регулярного обследования тонкой кишки у пациентов с СКК с интервалом в 6 месяцев.

2. Внедрено в клиническую практику применение комплекса лучевых методов исследования тонкой кишки, что позволяет своевременно диагностировать дилатацию тонкой кишки более 5 см, выявить стенозы тонкой кишки и установить показания к применению удлиняющих кишечник операций.

3. Определено, что гидро-MPT является наиболее чувствительным методом, позволяющим определить дилатацию, длину тонкой кишки и идентифицировать стенозы тонкой кишки при синдроме короткой кишки.

4. На основании сравнительного анализа определены и систематизированы показания и противопоказания к удлиняющим операциям (продольное кишечное удлинение и сшивание (LILT) и последовательная поперечная энтеропластика (STEP)).

5. Определены положительные прогностические факторы для восстановления полного энтерального питания после удлиняющих кишечник операций: длина тонкой кишки, наличие илеоцекального клапана, наличие не

менее половины толстой кишки и отсутствие редилатации (повторной дилатации) тонкой кишки.

6. Разработаны методы выращивания энтерального нервного сплетения и иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, которые закладывают основы для создания бионженерной тонкой кишки, способной к перистальтическим сокращениям, что является новым стратегическим подходом лечения пациентов с СКК.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Морфологические изменения мышечных слоёв и увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки являются результатом кишечной адаптации, патофизиологичной для СКК, встречаются как у животных, так и у человека и проявляются дилатацией и гипертрофией мышечных слоёв тонкой кишки.

2. Комплекс лучевых методов диагностики (РКИ, УЗИ, гидро-МРТ) у детей с СКК позволяет получить достоверную информацию о наличии дилатации, стеноза и измерить длину сохранившейся тонкой кишки. Наиболее информативным методом диагностики при СКК является гидро-МРТ.

3. Разработанная программа хирургической реабилитации пациентов с СКК (определены и систематизированы показания и противопоказаний к удлиняющим кишечник операциям) позволила улучшить результаты лечения.

4. Положительными прогностическими факторами восстановления полного энтерального питания, помимо длины тонкой кишки, являются наличие илеоцекального клапана, наличие не менее половины толстой кишки и отсутствие редилатации тонкой кишки.

5. Разработанные методы выращивания культуры клеток межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе и иннервированного мышечного слоя, способного к сокращениям, являются ключевым элементом тканевой инженерии тонкой кишки и новым подходом к лечению детей с СКК и хронической

кишечной недостаточностью, что позволит решить такие проблемы трансплантации органов, как недостаток доноров и отторжение тканей.

**Внедрение результатов работы в практику.** Разработанные практические рекомендации используются в работе хирургических отделений Республиканской детской клинической больницы (г. Уфа), Городской детской клинической больницы № 17 (г. Уфа). Теоретические положения и практические рекомендации диссертации используются в процессе обучения студентов педиатрического и лечебного факультетов и клинических ординаторов на кафедре детской хирургии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов диссертации подтверждена достаточным объемом клинических и экспериментальных исследований, использованием сертифицированных расходных материалов и приборов, контролем всех иммуногистологических исследований при помощи негативного контроля, корректным анализом и интерпретацией полученных результатов, статистической обработке данных, исходя из принципов доказательной медицины.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на конгрессе немецкого общества детской гастроэнтерологии и питания (Гайдельберг, Германия, 2013), конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2014), 18-ом немецком конгрессе хирургических научных исследований (Ганновер, Германия, 2014), XIII Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2014), съезде детских хирургов России (Москва, 2015), 2-ой конференции международной Федерации по нейрогастроэнтерологии (Сан-Франциско, США, 2016), 20-ой конференции «Дни исследований в хирургии» от немецкого общества по Хирургии (Магдебург, Германия, 2016), 82-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных «Вопросы

теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017), 24-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2017), серии избранных лекций медицинского факультета Мангейм (Мангейм, Германия, 2017), 3-м конгрессе детских хирургов России (Москва, 2017), 47-ом международном симпозиуме по детской хирургии (Обергургль, Австрия, 2018), 25-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2018), 5-ом международном симпозиуме «Развитие энтеральной нервной системы: сигналы, гены, терапия» (Бостон, США, 2018), 3-ей конференции международной Федерации по нейрогастроэнтерологии (Амстердам, Нидерланды, 2018), 56-ой конференции по детской хирургии в рамках немецкого конгресса по детской и подростковой медицине (Лейпциг, Германия, 2018), 26-ой Конференции немецкого общества нейрогастроэнтерологии (Берлин, Германия, 2019), 5-ом Форуме детских хирургов России (Уфа, 2019), 57-ом Конгрессе немецкой ассоциации детских хирургов в рамках конгресса по педиатрии (Мюнхен, Германия, 2019), 27-ом ежегодном конгрессе немецкого общества по нейрогастроэнтерологии (Фрайзинг, Германия, 2020), круглом столе по синдрому короткой кишки организованном Российской ассоциацией детских хирургов (Москва, 2020).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе, 16 публикаций в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации для публикации материалов диссертационных работ, из них 10 статей в журналах, входящих в перечень ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus и 1 статья, и 3 тезиса в журналах, индексируемых в международной базе данных Web of Science. Всего опубликовано 8 научных работ в зарубежных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Pubmed, Web of Science. Изданы 2 федеральные клинические рекомендации, одна рецензируемая монография (глава в книге) на английском

языке, опубликованная в издательстве Springer (Швейцария) и индексируемая в международной базе данных Scopus.

**Личный вклад автора.** Автором проведен анализ отечественной и иностранной литературы, сформулирована цель и задачи исследования, определена методология исследования. Автор проводил осмотр, сбор анамнеза, курацию больных, участвовал при оперативных вмешательствах. Осуществлял обследование и ретроспективный анализ 54 пациентов с синдромом короткой кишки, в том числе 42 пациентов в отдалённом периоде.

Самостоятельно проведены подготовка тканей к гистологическим исследованиям, все гистологические исследования препаратов тонкой кишки крыс, биоптатов пациентов с синдромом короткой кишки, а также исследования выращенных клеточных культурах: залив парафиновых блоков, работа на микротоме, все виды окрашивания препаратов, в том числе иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное окрашивание препаратов, подготовка препаратов для электронной микроскопии, микроскопирование препаратов на световом, флюоресцентном и конфокальном микроскопах.

Самостоятельно проведены выделение клеток нервной системы из кишечника у новорожденных крыс, культивация культур клеток нервной системы кишечника и мышечных клеток в 2-хмерных и 3-х мерных средах. Разработка протоколов культивации иннервированного мышечного слоя тонкой кишки в 3-х мерном матриксе, способного к сокращениям.

Самостоятельно проведен математический и статистический анализ полученных данных. Автор готовил к публикации, научные статьи и клинические рекомендации, представлял результаты диссертационной работы на научно-практических симпозиумах и конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, 9 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 256 страницах машинописного текста, содержит 33 таблицы и 65 рисунков.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика синдрома короткой кишки (этиология, эпидемиология, летальность, парентеральное питание, принципы терапии, социально-экономическая значимость)

Развитие детской хирургии, анестезиологии – реаниматологии, интенсивной терапии, нутрициологии позволило спасти до этого инкурабельных пациентов, но, однако поставило новые задачи дальнейшего лечения детей, у которых после обширной резекции кишечника развивается синдром короткой кишки [29, 37, 48, 49, 51, 60, 66, 71, 218].

Синдром короткой кишки (СКК) – тяжёлое заболевание, обусловленное уменьшением всасывательной поверхности тонкой кишки, возникающее в результате обширных резекций тонкой кишки, приводящее к хронической кишечной недостаточности, проявляющееся мальабсорбцией, мальдигестией и мальнутрицией, а также расстройствами гомеостаза [7, 16, 18, 19, 21, 28, 30, 32, 38, 47, 54, 55, 59, 63, 66, 71, 77, 142, 218].

Авторы неоднозначны в трактовке понятия кишечной недостаточности. [158, 228, 230, 281, 289]. Два наиболее обоснованных определения приведены ниже.

Pakarinen M.P. с соавторами [281] считают, что основными критериями СКК являются массивная резекция тонкой кишки (более 70%) и хроническая кишечная недостаточность более 3 месяцев, требующая проведения парентерального питания. Demehri F.R. с соавторами [158] определяют СКК, как потерю пациентом более 50% от нормальной длины тонкой кишки в результате врожденного порока развития или хирургической резекции или зависимость от парентерального питания, как минимум 60 дней.

Этиология. Причинами массивной резекции кишечника, приводящей к развитию СКК в периоде новорожденности являются некротический энтероколит,

атрезия кишечника, гастрошизис, заворот кишки, осложненная мекониальная кишечная непроходимость, синдром Цюльцера-Уилсона [12, 31, 52, 54, 62, 64, 66, 70, 128, 150, 191, 312, 359]. Течение СКК, развившегося у пациентов с синдромом Цюльцера-Уилсона (болезнь Гиршпрунга с длинным аганглионарным сегментом, включающим помимо всей толстой кишки и сегмент тонкой кишки) осложняется тем, что у данных пациентов, помимо короткой резидуальной тонкой кишки, имеется ещё нарушение её иннервации, что усугубляет течение заболевания [72].

У детей более старшего возраста наиболее распространенными причинами СКК являются заворот кишки и травмы [388]. У взрослых пациентов — болезнь Крона, мезентеральный тромбоз, злокачественные новообразования и т.д. [4, 17, 41, 44, 48, 61].

Эпидемиология. Сведения о частоте СКК у детей довольно противоречивы, сильно варьируются и зависят от многих факторов:

- от того, как ставится диагноз и регистрируются случаи СКК (статистические территориальные различия);
- регистрируются ли случаи СКК во всей популяции, среди доношенных детей или среди недоношенных детей;
- в какие годы было проведено исследование, так как совершенствование интенсивной терапии новорожденных, нутритивной поддержки и хирургических техник улучшили выживаемость детей с тяжелой абдоминальной патологией, ведущей к развитию СКК, и, таким образом, увеличилось число таких пациентов [259]. Оценивать распространенность СКК затруднительно, так как не все случаи регистрируются медицинской статистикой [56, 77, 124]. Синдром короткой кишки ежегодно обсуждается на всероссийских конгрессах и форумах, организованных Российской ассоциацией детских хирургов начиная с 2014 года по настоящее время. В результате данных дискуссий в 2016 году Российская ассоциация детских хирургов выступила инициатором создания «Российского регистра детей с синдромом «короткой кишки», для повышения доступности и качества медицинской помощи пациентам с СКК, для обоснования рациональных управленческих решений и эффективного использования имеющихся ресурсов.



Одной из задач которого, явилось изучение распространённости СКК на территории Российской Федерации. Через год, в 2017 году, коллектив авторов в составе: Розина М.В., Чубаровой А.И., Ерпулевой Ю.В., Аверьяновой Ю.В., Демуры С.А., Косова Д.А. [54] опубликовали первые результаты работы регистра, которые показали, что распространённость СКК составила 6,31 случая на 1000 000 детей в возрасте до 18 лет, где большинство (63,5%) больных — дети раннего возраста. Однако следует отметить, что на момент публикации в регистре были представлены далеко не все пациенты с СКК в России, а именно информация лишь о 126 детях с СКК, из 42 регионов России [54].

Эпидемиологические сведения о СКК в зарубежной литературе разнообразны и противоречивы. Одни авторы указывают частоту заболевания от 2 до 5 случаев на миллион человек [128, 142, 184]. По данным консорциума шестнадцати крупных неонатальных центров в Соединенных Штатах Америки уровень заболеваемости СКК, вызванного хирургическими причинами, составил 0,7% (7/1000) среди 12316 новорожденных с очень низкой массой тела при рождении [384, 388]. Частота развития СКК среди представленных исследовательских центров колебалась от 0,1% до 1,6%. Среди 5657 новорожденных с экстремально низкой массой тела СКК развился у 1,1% (11/1000) [384, 388]. По данным ученых Канады частота развития СКК у новорожденных составила 24,5 на 100 000 живорожденных, при этом СКК развивался почти в 10 раз чаще у детей, родившихся до 37 недели беременности, по сравнению с доношенными новорождёнными (353,7/100 000 живорожденных против 3,5/100 000 живорожденных) [162, 262, 388]. По сведениями итальянских нутрициологов частота развития кишечной недостаточности составила 0,1% среди всех живорождённых и 0,5% среди новорожденных, лечившихся в отделении интенсивной терапии [260, 388]. По данным исследователей в Германии частота встречаемости СКК составляет 34 пациента на 1 миллион населения [332].

Летальность. Несмотря на то, что у новорождённых СКК встречается редко, данное заболевание характеризуется высокой смертностью [130]. Летальность

детей с СКК варьирует от 11% до 37,5% и является одной из самых высоких в младенчестве и детстве. Кроме того, смертность новорожденных с СКК в три раза выше, чем у младенцев, с такими же диагнозами при рождении, но без СКК [150, 223, 262, 277, 388]. У взрослых пациентов с остатком тонкой кишки менее 50 см летальность составляет 55% [142, 242], что в 2 раза выше, чем у детей. Энтеральное питание крайне важно для пациентов с СКК, так пятилетняя выживаемость у детей с СКК, которые в течение 2,5 лет перешли на полное энтеральное питание составила 95%, тогда как среди детей, находившихся только на парентеральном питании, составила лишь 52% [142, 210]. Другие авторы показали похожие результаты, где уровень пятилетней выживаемости для больных СКК, находящихся на ПП составил 63% [142, 175].

Нутритивная поддержка и принципы терапии. Правильная сбалансированная нутритивная поддержка играет основную роль у пациентов с СКК [8, 13, 15, 20, 23, 26, 40, 45, 46, 66, 74, 394]. Парентеральное питание (ПП) пациентов с СКК является важнейшей и первостепенной основой терапии, которая длится на протяжении нескольких лет, а у некоторых пациентов всю жизнь [24, 39, 45, 53, 75, 130, 187, 247, 252, 270]. У детей с кишечной недостаточностью, являющейся результатом синдрома короткой кишки, функциональная способность тонкого кишечника меньше минимального уровня, необходимого для обеспечения адекватного питания и поддержания водного баланса для нормального роста и развития ребёнка [14, 25, 84, 142, 184, 329]. У большинства пациентов после массивных резекций кишечника парентеральное питание применяется с раннего послеоперационного периода и регулярно корректируется [26, 42, 48, 66, 75, 230, 272, 272, 280, 285, 394].

Для обеспечения длительного парентерального питания у пациентов с синдромом короткой кишки важно обеспечить адекватный венозный доступ, который достигается установкой центрального венозного катетера. В настоящее время «золотым» стандартом в этом вопросе является установка центрального туннелированного венозного катетера по типу Бровиак (Brogia) или Хикман (Hickman) в *v. subclavia* или *v. jugularis* [310]. Если же сравнивать применение

туннелированных катетеров и портов по типу Портокат (Port-A-Cath), то применение последних менее предпочтительно [163]. Парентеральное питание должно быть сбалансированным и включать в себя белки (аминокислоты), жиры, углеводы (калории), электролиты, витамины, микроэлементы и жидкость, которые призваны удовлетворить индивидуальные потребности пациентов. Современные растворы для парентерального питания представляют собой один пакет (сосуд), в котором находятся все необходимые ингредиенты («all-in-one» — все-в-одном) или двойные пакеты, где жировая эмульсия находится в отдельном отсеке и смешивается с остальными компонентами парентерального питания непосредственно перед применением [11, 14, 34, 115, 310]. Парентеральное питание применяют как в условиях клиники, так и в домашних условиях. Парентеральное питание на дому у пациентов с синдромом короткой кишки является основой ведения данных пациентов во многих странах и считается более выгодным с медицинской, социальной и экономической точек зрения [74, 191, 188, 233, 278, 350, 391, 389]. В то же время ряд авторов отмечают, что, несмотря на то, что ПП является жизненно важным элементом лечения пациентов с СКК, длительное применение ПП сопровождается риском развития серьёзных осложнений [6, 35, 48, 66, 71, 119, 120, 121, 125, 142, 147, 168, 176, 175, 186, 236, 282, 283, 286, 344, 345, 351, 361, 388].

Поражение печени, ассоциированное с длительным парентеральным питанием (PNALD – Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease, IFALD- Intestinal Failure Associated Liver Disease) является тяжёлым и потенциально опасным для жизни осложнением [48, 66, 71, 121, 125, 142, 147, 175, 186, 236, 282, 283, 286, 344, 361, 388]. Длительное применение парентерального питания вызывает гепатобилиарную дисфункцию [243], поражение печени развивается за счет утраты гепатопротекторного эффекта энтерального питания, что может привести к тяжелому стеатозу (более типичному для взрослых), холестазу (более характерному для детей), прогрессирующему фиброзу, и, в конечном итоге, циррозу печени [292, 361, 382]. Лечение данного осложнения является сложной задачей и, в исключительных случаях, может привести к необходимости

трансплантации печени [125, 142, 183]. Не менее тяжёлыми осложнениями ПП, являются катетер-ассоциированный сепсис, катетер-индуцированный венозный тромбоз [63, 119, 120, 168, 176, 274, 294, 303, 345, 351]. Характерным осложнением является так же метаболическое поражение костей [6, 35, 36, 386, 391].

Стратегической целью терапии пациентов с СКК является восстановление функции кишечника и ранний перевод пациентов на частичное, а потом на полное энтеральное питание [65, 73]. Это определяет перспективы благоприятного прогноза у данного контингента больных [122, 142, 210]. В настоящее время для достижения данной цели используются хирургические методы [64, 66, 71, 209, 218, 336, 96, 112, 150, 241, 290, 358], а также терапия аналогами глюкагоноподобного пептида 2 (GLP-2), которые имеют стимулирующее воздействие на эпителий кишечника и показывают хорошие результаты [114, 142, 185, 250, 271, 302, 315, 356].

К экспериментальным методам лечения СКК, которые еще исследуют *in vitro* и на животных относят методику механического растяжения кишечника [216] и создание искусственной кишки при помощи тканевой инженерии [3, 68, 142, 181, 196, 347, 368, 369].

В соответствии с современными научными взглядами, существенное значение имеют мультидисциплинарный подход к терапии и специализированные программы реабилитации пациентов с СКК. Лечение таких пациентов требует тесного междисциплинарного взаимодействия всего медицинского персонала: участковых врачей и медсестер, семейных врачей, неонатологов, детских гастроэнтерологов, детских хирургов [32, 54, 76, 123, 127, 219, 226, 353].

#### Социально-экономические аспекты синдрома короткой кишки

СКК является не только сложной медицинской проблемой, но и оказывает социальное влияние на членов семьи больного ребёнка и подразумевает значительное ресурсное обеспечение [66, 331].

Ежедневные медицинские манипуляции, нередко на протяжении ряда лет, в условиях домашнего парентерального питания в форме внутривенных инфузий

длительностью более 10 часов в сутки, связаны со значительной социально-экономической нагрузкой на семьи детей с СКК [66, 331]. Кроме этого, имплантированный центральный венозный катетер требует специального ухода и ограничивает некоторые виды деятельности у пациентов. Клинические проявления основного заболевания, такие как частый жидкий стул, боли в животе, вздутие живота, D-лактат ацидоз, наличие энтеростом, а также периодические госпитализации, связанные с ухудшением состояния пациента значительно снижают качество жизни детей с СКК. Так Olieман J.F. и соавторы [201] оценили качество жизни 31 ребенка, у которых в младенчестве развился СКК. Они показали, что дети с историей младенческого СКК имеют более низкое качество жизни, чем их здоровые ровесники. Эта разница продолжает наблюдаться в детстве и после периода кишечной реабилитации [201].

Применение парентерального питания сопряжено с большими финансовыми затратами [66, 136, 289]. Существенное, а нередко критическое значение, для бюджета семьи ребенка с СКК, применяющей домашнее лечение, имеют, прежде всего, финансовые затраты, связанные с ежедневным и долгосрочным применением дорогостоящих препаратов для парентерального питания. В отечественной литературе нет данных о стоимости проведения парентерального питания, однако, если обратиться к зарубежным исследованиям, то в США Spencer с соавторами [289] оценили общую стоимость первого года лечения пациента с СКК в 505 250 долларов, 82% из которых приходилось на лечение пациента в клинике, при этом затраты на парентеральное питание больных с СКК ежегодно увеличивались на 184 520 долларов в год. Они отмечают, что, несмотря на то, что домашнее парентеральное питание является дорогостоящей формой внебольничной терапии, это единственно возможная альтернатива длительной госпитализации, которая является на 50-75% экономически более затратной [289]. По данным других авторов в Великобритании ежегодная стоимость домашнего парентерального питания для взрослого пациента, включая питательные вещества, насосы и одноразовое

оборудование составляет 60000 фунтов (100000 долларов США), а в США колеблется от 60000 до 250000 долларов [289].

Вышеперечисленные данные о высокой смертности и неэффективности терапии у большой доли пациентов, большой социально-экономической нагрузке на пациентов и государство, диктуют необходимость разработки новых стратегических подходов лечения детей с синдромом короткой кишки.

## 1.2 Патоморфологические изменения мышечных слоёв тонкой кишки при синдроме короткой кишки

У пациента с СКК, как ответная реакция организма на данное патологическое состояние, развивается кишечная адаптация, характеризующаяся появлением функциональных и структурных изменений в кишечнике в виде гипертрофии слизистого слоя кишки, за счет усиленной пролиферации энтероцитов, увеличения высоты ворсинок и глубины крипт, а также изменением обмена белков [16, 22, 298, 308]. Всё вышеперечисленное увеличивает абсорбционную поверхность и проницаемость оставшегося кишечника. Известно, что наиболее активные изменения в тонкой кишке происходят в течение первых 4-24 месяцев [183]. Существует мнение, что они затрагивают не только слизистую кишечника, а также и мышечный слой кишки. Так у пациентов с СКК наблюдается патологическое расширение оставшегося участка тонкой кишки, «формирование резервуара» и стаз кишечного содержимого. Клинически эти изменения проявляются усилением мальабсорбции и мальдигестации, чрезмерным количественным разрастанием бактериальной микрофлоры в тонкой кишке, что ведет к таким осложнениям, как D-лактат ацидоз, транслокация кишечных бактерий во внекишечные органы, изъязвление слизистой с развитием кишечных кровотечений [1, 27, 33, 142, 337]. Эти состояния требуют хирургической и медикаментозной коррекций. С другой стороны, наличие дилатированного участка тонкой кишки дает возможность использования у таких больных операций, удлиняющих кишечник, таких, как продольное

интестинальное удлинение (Longitudinal interstinal lengthening and tailoring (LILT)) и последовательная трансверсальная энтеростомия (Serial transversal enterostomy procedure (STEP)) [221]. Основой для дилатации тонкой кишки являются изменения в мышечном слое тонкой кишки. Chen J. с соавторами [124] в экспериментах на крысах показали, что у них с СКК развивается гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки. Хотя Martin С.А. и соавторы [308 **Ошибка! Источник ссылки не найден.**] утверждали, что в результате проведения экспериментов на мышах при СКК, несмотря на увеличение длины и диаметра тонкой кишки, гипертрофия мышечных слоёв отсутствует. Более детальный сравнительный анализ данных работ показывает, что в экспериментах использовались разные животные и был выполнен разный объем резекции тонкой кишки, что могло оказать влияние на выраженность изменений, характерных для кишечной адаптации. В эксперименте на собаках, у которых моделировался синдром короткой кишки, путём резекции 50% тонкой кишки, наблюдались удлинение тонкой кишки, а также гипертрофия продольного и поперечного слоёв и мышечных слоёв тонкой кишки, однако диаметр не изучался [365].

Несмотря на то, что дилатация тонкой кишки является важным патофизиологическим механизмом при СКК, так как, с одной стороны, является источником тяжёлых осложнений, в то же время, с другой стороны, позволяет применять удлиняющие кишечник операции, в литературе нет единого мнения о характере морфологических изменений мышечного слоя тонкой кишки при СКК. Анализ литературы показал отсутствие единого мнения, является ли расширение тонкой кишки результатом сформированного межкишечного анастомоза или вызвано кишечной адаптацией. Данный вопрос нуждается в изучении в эксперименте на лабораторных животных.

### 1.3 Участие нервной системы кишечника в кишечной адаптации при синдроме короткой кишки

В изученных нами литературных источниках очень поверхностно освещена роль энтеральной нервной системы кишечника в развитии кишечной адаптации при СКК [114, 111, 155, 178, 195, 222, 266, 293, 309, 314, 393]. Известно, что у здоровых взрослых энтеральные нейроны подвергаются апоптозу, однако уменьшения количества нейронов в межмышечных сплетениях не наблюдается, что может быть обусловлено образованием новых нейронов в процессе нейрогенеза [93].

Известно, что базовые функции кишки, такие как перистальтика, секреция электролитов и кровоснабжение, регулируются нервной системой в кишечнике [178], которая, в свою очередь, тесно взаимодействует с иммунной системой кишечника [393]. Описано, что на дифференцировку и развитие нервной системы кишечника выраженное влияние оказывают изменение микробиома кишечника и воспалительные процессы, связанные с персистенцией патогенных микроорганизмов [293, 393]. Кроме того, в течение жизни желудочно-кишечный тракт должен постоянно приспосабливаться к изменяющимся диетическим привычкам, потребляемым токсинам и инфекционным стимулам. Было показано, что энтеральная нервная система (нервная система кишечника) играет ключевую роль в регуляции многих функций слизистой оболочки кишечника [178] и постоянно находится под влиянием различных факторов, таких как изменение характера питания, перистальтики кишки [114] и микрофлоры кишечника [155]. Воспаление и нервная система в кишечнике также тесно взаимосвязаны [266]. Вышеперечисленное подтверждает, что нервная система в кишечнике вовлечена в реализацию многих процессов в кишечнике, очень пластична и вынуждена постоянно адаптироваться к изменяемым условиям внешней среды, кишечные нейроны регулируют рост и восстановление эпителия и, как предполагается, участвуют в адаптационном ответе после резекции кишечника [114, 155, 178, 195, 266, 293, 393].



В ходе ряда экспериментальных работ было показано, что на выраженность кишечной адаптации при СКК оказывают влияние различные медиаторы нервной системы в кишечнике. Так Bjercknes M. с соавторами [111] описали, что глюкагонподобный пептид-2 (glucagon-like peptide 2 (GLP-2)), являющийся кишечным гормоном, оказывает свой эффект на эпителиальные клетки через энтеральные нейроны, которые экспрессируют рецепторы к GLP-2. На клетках слизистой оболочки кишечника подобные рецепторы не обнаружены [111]. GLP-2 способствует увеличению переваривающей и абсорбтивной способности кишечника, благодаря расширению площади поверхности слизистой оболочки [314]. В эксперименте на крысах, которым предварительно была проведена резекция 80% тонкой кишки, было доказано, что при деиннервации кишечника, проведенной при помощи бензалколиумхлорида, наблюдалось увеличение поверхности слизистой и веса крыс [222]. В своей работе Hitch M.C. и соавторы [309] показали, что массивная резекция тонкой кишки у крыс, у которых генетически была нарушена функция нервной системы в кишечнике, приводила к увеличению длины кишечных ворсинок и углублению кишечных крипт, а также более высокой экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста в сравнении с крысами без нарушения функциональной активности нервной системы в кишечнике. Уровни глюкагонподобного пептида-2 и амфирегулина после резекции тонкой кишки также были выше у крыс с нарушением функции нервной системы в кишечнике [309]. Вышеприведённые данные позволяют предположить, что нарушение функциональной активности нервной системы в кишечнике изменяет адаптацию слизистого слоя кишки после резекции тонкой кишки [111, 222, 309, 314]. Toumi F. и соавторы [195] показали, что энтеральные нейроны человека регулируют рост и восстановление кишечного эпителия, участвуя, таким образом, в кишечной адаптации в ответ на резекцию тонкой кишки. На моделях мышей было показано, что повышение уровня нестина является также признаком нейрональной адаптации и пластичности [293]. Нестин (nestin) – это средний филамент, относящийся к протеинам 4 класса. Lendahl U., Zimmerman L.B., McKay R.D. [237] в 1990 году впервые описали

последовательность гена нестина (nestin), специфически экспрессирующегося в нейроэпителиальных стволовых клетках. Экспрессия этого гена позволяла отличить стволовые клетки от других более дифференцированных клеток в нервной трубке. Белок нестин был впервые идентифицирован Hockfield S. и McKay R.D. еще в 1985 году [189]. В последующем нестин был обнаружен и в других типах клеток и тканях [264]. В настоящее время нестин – широко известный маркер нейрональных стволовых клеток, как в эмбриональных тканях, так и в тканях взрослых животных и человека. Клетки, экспрессирующие нестин, имеют следующие характеристики: высокую пролиферативную активность, мультипотентность, способность к самообновлению и регенерации в ответ на повреждение [237, 264, 293].

В отечественной и зарубежной литературе до настоящего времени не изучены патоморфологические особенности нервной системы в тонкой кишке, в том числе её стволовых клеток, после резекции значительной части тонкой кишки. Это диктует необходимость изучения стволовых клеток в межмышечных сплетениях и в мышечных слоях тонкой кишки при синдроме короткой кишки в эксперименте на лабораторных животных, а также изучение возможности интерполирования полученных данных на пациентов с СКК, путём проведения сравнительного анализа адаптации нервной системы в биоптатах тонкой кишки пациентов с синдромом короткой кишки и с нормальной длиной тонкой кишки.

#### 1.4 Применение лучевых методов исследования при синдроме короткой кишки

У пациентов с СКК наблюдается расширение оставшегося участка тонкой кишки, проявляющееся риском развития осложнений, с одной стороны, но в то же время, дающее возможность проведения у таких больных удлиняющих кишечник операций [1, 27, 33, 142, 213, 221, 338, 355]. Кроме того, у таких пациентов, в оставшейся после резекции тонкой кишке, могут развиваться стенозы, свищи, воспалительные изменения [137, 171, 275, 303, 360, 387]. Поэтому исследование тонкой кишки является важной задачей лечения таких пациентов.

Исследование тонкой кишки у детей сопряжено с большими трудностями, так как этот отдел тонкой кишки труднодоступен для инструментальных методов исследования. Эндоскопическое исследование кишечника, в том числе энтероскопия, представляет собой инвазивную методику, которая сопряжена с риском травмирования кишечника и требует предварительной подготовки пациента, в том числе седации, кроме того, отсутствуют энтероскопы, которые возможно применять в детском возрасте [5, 80]. На протяжении многих лет у детей для диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) успешно применяются такие методы, как ультразвуковое исследование (УЗИ) [88, 182], рентгеноконтрастное исследование кишечника (РКИ) [5, 165] и магниторезонансная томография (МРТ) [78, 244, 245].

УЗИ является широко распространённым и доступным методом исследования брюшной полости, позволяющим обнаружить свободную жидкость, в брюшной полости, заподозрить непроходимость кишечника и диагностировать острый аппендицит, дивертикулит, псевдомембранозный колит, туберкулез кишечника, болезнь Крона, опухоли толстой кишки и др. [88, 113, 235, 380, 383]. Отсутствие вредного излучения, необходимости в седации пациента и относительная дешевизна метода делают УЗИ первоначальным и предпочтительным исследованием в педиатрии [113, 182], оптимальным методом для динамического наблюдения за пациентами [80, 383]. С другой стороны, несмотря на высокую чувствительность, УЗИ не всегда даёт исчерпывающую полноценную информацию. К недостаткам УЗИ следует отнести зависимость полученных результатов от опыта и навыков оператора, а также технические сложности выполнения исследования у больных с избыточным весом и пациентов с метеоризмом [9]. В литературе имеются единичные публикации посвящённые применению УЗИ для диагностики патологии печени у пациентов с СКК, однако исследование самой тонкой кишки у данных пациентов не описано [296, 378, 379].

Рентгеноконтрастное исследование тонкой кишки широко используется для изучения анатомии и физиологии ЖКТ. С этой целью в качестве контрастного

вещества используются сульфат бария, гастрोगрафин и др. [165, 276]. Существует два метода введения контрастного вещества при РКИ ЖКТ: через зонд, проведенный через желудок и двенадцатиперстную кишку за связку Трейца и при глотании пациентом контрастного вещества. Первая методика позволяет более чётко заполнить все отделы тонкой кишки, однако, в связи с инвазивностью и трудоемкостью тяжело переносится пациентом. Недостатком данного вида исследования является невозможность оценки моторики тонкой кишки. Вторая методика более щадящая. Основными недостатками РКИ являются длительность процедуры и лучевая нагрузка на пациента. При этом дозы облучения пациента при РКИ являются достаточно низкими [5, 276]. Чувствительность РКИ может быть снижена из-за наложения контрастированных петель тонкой кишки, наслаивающихся друг на друга при визуализации. В связи с этим, исследователи часто сталкиваются с невозможностью получения отчетливого снимка тонкой кишки, что, в свою очередь, может приводить к диагностическим ошибкам [5, 276, 300]. Тем не менее, ряд авторов считает, что в случае, если ожидаемый результат перевешивает риск, а также при условии надлежащей оптимизации процедуры, проведение данного вида исследования считается оправданным [165, 313]. Несмотря на широкое использование и совершенствование таких методов диагностики, как УЗИ, компьютерная томография, МРТ, эндоскопия и т.д., РКИ до сих пор востребована и имеет уникальную диагностическую ценность [165]. Данные о применении РКИ для измерения длины тонкой кишки у детей с СКК противоречивы: Velazco C.S. с соавторами [300] утверждают, что РКИ занижает длину тонкой кишки по сравнению с реальной её длиной и этот метод не подходит для предоперационного планирования, тогда как Lodwick D. с соавторами [90] считают, что РКИ позволяет измерить длину тонкой кишки и подходит для предоперационного планирования. Таким образом, в доступной литературе имеются лишь единичные противоречивые публикации о применении РКИ у пациентов с СКК [90, 300, 367].

По данным литературы магнитно-резонансная томография для исследования кишечника используется уже более 20 лет, а методика МРТ

постоянно совершенствовалась [5, 9, 78, 232, 245]. Важным преимуществом данного метода является отсутствие ионизирующего излучения, особенно при использовании его у больных с хроническими заболеваниями, что позволяет проводить на протяжении всей жизни многократное МРТ-обследование [78, 138, 304].

На сегодняшний момент современные высокопольные магнитно-резонансные томографы позволяют проводить качественное исследование тонкой кишки и окружающих мягких тканей [5, 9, 304]. В последние годы МРТ все чаще используется для диагностики заболеваний кишечника, как у детей, так и у взрослых. Для исследования кишечника применяется гидро-МРТ. При этом для заполнения тонкой кишки используется контраст, который вводится перорально [78, 232, 256, 276, 392]. Гидро-МРТ кишечника является высокоинформативным методом, позволяющим выявить патологические процессы в тонкой кишке, а также обнаружить различные врожденные аномалии развития тонкой и толстой кишки [5, 9, 304, 392]. Показано, что гидро-МРТ является эффективным диагностическим методом при болезни Крона - возможности данного метода позволяют изучить протяженность поражения тонкой кишки, наличие экстрамуральных проявлений при пенетрирующей форме заболевания, а также определить выраженность воспалительных изменений [78, 89, 139, 244, 256]. Кроме того, применение гидро-МРТ обусловлено растущим беспокойством по поводу радиационного облучения, особенно у детей [276]. Контрастность ткани на T1- и T2-взвешенных изображениях позволяет эффективно отображать петли тонкой и большой кишки в нормальных и патологических условиях. Таким образом, стриктуры, свищи и абсцессы, а также активность воспаления могут быть хорошо оценены при помощи этой методики [9, 78, 244, 245, 392].

Особенностью применения МРТ у детей младшего возраста является необходимость проведения исследования под наркозом. Кроме того, при проведении наркоза некоторые МРТ-протоколы необходимо корректировать [255].

В целом проведение МРТ сопряжено со следующими дополнительными рисками и проблемами: биологические эффекты используемых неионизирующих

электромагнитных полей (ЭМП), механизмы взаимодействия которых с тканями человека представляют собой поляризацию, индуцированный ток и тепловой нагрев; риски, связанные с шумами во время МРТ; опасности от внешних ферромагнитных и/или имплантированных устройств; риски, связанные с седацией или общей анестезией, существенная проблема при выполнении МРТ у очень молодых пациентов из-за длительного обследования; риски, связанные с контрастными веществами на основе гадолиния. Однако, несмотря на перечисленные проблемы, МРТ в детском возрасте, при правильном его проведении, является безопасным методом диагностики [91, 109, 143, 156, 179, 224].

В работах, посвященных сравнению МРТ с РКИ, показано, что МРТ имеет более высокую чувствительность и специфичность при выявлении терминальной патологии подвздошной кишки [276]. Преимуществами МРТ при сравнении с компьютерной томографией являются отсутствие радиационного облучения, а также возможность частого использования данного метода для мониторинга состояния пациента и оценки эффективности проводимой терапии [5, 9, 78, 232, 256, 276, 392]. К достоинствам МРТ перед эндоскопией можно отнести малую инвазивность процедуры, а также возможность изучения внеклеточного пространства, например, при лечении трансмуральных воспалительных заболеваний, таких как болезнь Крона, и при оценке локальных и отдаленных метастазов кишечных опухолей. Кроме того, МРТ тонкой кишки является объективным методом и результат исследования не зависит от наблюдателя [245]. Несмотря на широкое применение МРТ в диагностике патологии ЖКТ, в том числе болезни Крона, в доступной литературе отсутствуют публикации, в которых изучалось бы применение МРТ у пациентов с СКК.

Анализ литературных данных свидетельствует о недостаточном использовании методов лучевой диагностики у пациентов с СКК, особенно МРТ, не определены диагностическая значимость и возможности каждого из этих методов исследования для определения показаний для удлиняющих кишечника

операций, мониторинга состояния пациентов и выявления осложнений, при СКК, а также оценки эффективности проводимой терапии.

### 1.5 Хирургическое лечение синдрома короткой кишки

Проблема хронической кишечной недостаточности у пациентов с СКК решается при помощи парентерального питания, которое является жизненно необходимым компонентом лечения пациентов с СКК [180], однако сопряжено с риском развития тяжёлых осложнений [180, 229, 274, 303, 361]. Поэтому важным принципом лечения пациентов с СКК является как можно более быстрое сокращение доли парентерального питания и более ранний переход на полное энтеральное питание. Опубликованные данные свидетельствуют, что методики аутогенной хирургической реконструкции (АХР) тонкой кишки являются эффективным лечением СКК, позволяя снизить зависимость от парентерального питания [19, 100, 121, 131, 190, 239, 246, 281, 303, 333]. Основной их целью является увеличение контакта питательных веществ со слизистой оболочкой кишечника, что достигается увеличением длины кишечника, сужением его просвета [66, 142, 303].

Фундаментальным принципом хирургии СКК является максимально возможное сохранение резорбтивной поверхности кишечника при операциях [218]. При реконструктивных операциях на кишечнике необходимо использовать все возможные участки кишечника для создания кишечной трубки: кишечные фистулы, отключенные сегменты, стенозы [132, 246, 281, 348]. У таких пациентов предпочтительнее применять сохраняющие стриктуропластики, реконструктивные техники и по возможности избегать резекций [281]. При ведении пациентов с синдромом короткой кишки важным является как можно более раннее закрытие стом, если таковые имеются, и восстановление непрерывности кишечника [225]. Целесообразно, как можно раньше включить дистальный участок кишечника для переработки кишечного содержимого и секрета, который выпадает из процесса пищеварения из-за расположенной

проксимально стомы [225, 311, 348]. Необходимость в задействовании в пищеварении всего кишечника заключается еще и в том, что взаимодействие нутриентов со слизистой кишечника является необходимым условием для выработки пептидных гормонов и факторов роста, стимулирующих кишечную адаптацию, кроме того, предупреждает развитие атрофии слизистой и нарушение эпителиальной барьерной функции [66, 132, 160, 354].

Хирургические методы лечения СКК начали внедряться в практику с середины прошлого столетия и многие из них постепенно уступили место более современным техникам [101, 303, 340]. На сегодняшний день методики АХР можно разделить на две большие группы: 1) операции, направленные на замедление кишечного транзита; 2) удлиняющие кишечник операции [101, 132, 142, 212, 303, 340].

Первая группа методов АХР активно развивалась в пятидесятие-шестидесятие годы прошлого века, но, в целом, не получила большого развития. К этим методам относятся создание антиперистальтических («развернутых») сегментов тонкой кишки, интерпозиция сегмента толстой кишки в тонкую кишку, создание петель или «карманов» тонкой кишки, создание искусственных клапанов [106, 142, 145, 167, 212, 366].

Антиперистальтические или «развернутые» сегменты тонкой кишки призваны увеличить абсорбцию питательных веществ в случаях, когда кишечное содержимое слишком быстро проходит по кишечнику. Необходимым условием применения данной методики является наличие достаточного количества слизистой оболочки в кишечнике для полноценной абсорбции питательных веществ [142, 360]. Ряд исследований подтверждает, что в 80% случаев применения данной методики наблюдалось замедление кишечного транзита и повышение кишечной абсорбции [142, 317, 366]. Важное значение имеет длина «развернутого» сегмента. Если сегмент слишком короткий, то операция может быть неэффективной. Слишком длинный «развернутый» сегмент может привести к выраженной обструкции [118, 142, 212]. По мнению одних авторов, идеальной длиной является 10 см у взрослых и 3 см у детей [103, 142, 366], другие авторы



полагают, что оптимальная длина развёрнутого сегмента по-прежнему остается неизвестной [303]. Опыт применения «развернутых» тонкокишечных сегментов описывался чаще у взрослых пациентов. В течение 5 лет после перенесённой операции 45% пациентов отказались от парентерального питания [318]. Однако данная методика не получила широкого распространения из-за большой частоты тяжёлых осложнений, таких как кишечная непроходимость [317] и несостоятельность анастомоза [142].

В 1973 году Hutcher N.E. с соавторами была предложена изоперистальтическая интерпозиция сегмента толстой кишки в тонкую кишку, в позиции перед тощей кишкой. Данное решение было основано на концепции, что питательные вещества будут концентрироваться в сегменте толстой кишки, где будут всасываться жидкость и электролиты, затем содержимое кишечника будет продвигаться в тощую кишку. Были получены положительные результаты [197]. Подобные же исследования публиковались в более поздние сроки [303]. Было показано, что в интерпозиционированном сегменте толстой кишки происходят адаптивные изменения, свидетельствующие о трансформации его в тонкую кишку [211]. При исследованиях на моделях крыс было показано, что сократительная активность в пересаженном сегменте толстой кишки становится такой же, как и в оставшейся тонкой кишке [167]. Несмотря на то, что данная методика позволяет оставить нетронутой самую ценную тонкую кишку, эта методика сопряжена с риском развития специфичных осложнений, таких как дилатация сегмента толстой кишки и развитие энтероколита [303].

Рециркуляторная петля тонкой кишки разрабатывалась, как метод увеличения времени кишечного транзита [303]. Рециркуляторные петли и кишечные «карманы» при синдроме короткой кишки описывались в 1960-х годах [103, 142, 251, 295, 366]. Результаты лечения были неудовлетворительными, улучшения интестинальной абсорбции доказано не было [366], у пациентов развивались множественные осложнения, такие, как заворот кишки, непроходимость, стеноз и бактериальный рост [303], а исход у 2/3 пациентов был летальным [142, 366]. От применения данной методики отказались [303].

Для замедления транзита кишечного содержимого также применялись методики «Выкраивание и сшивание» (Tailoring and plication) тонкой кишки и создание складок в тонкой кишке, которые позволяли увеличить время транзита кишечного содержимого одновременно, уменьшая застой в тонкой кишке. Однако, большим недостатком данной методики является использование и резекция тонкой кишки, поэтому применение данной методики оправдано только при достаточном запасе тонкой кишки [103, 142].

По данным ряда авторов искусственные клапаны в тонкой кишке создают частичную механическую обструкцию и замедляют физиологическую моторику кишечника, что проявляется в замедлении транзита кишечного содержимого [117, 140, 142, 299, 366]. Были описаны инвагинационный, подслизистый туннельный и сосковый клапаны, применение которых демонстрировало некоторое улучшение в функции кишечника [118, 303, 320]. Однако Bianchi [103] утверждает, что необходимо принимать во внимание тот факт, что для создания кишечного клапана необходимо пожертвовать участком тонкой кишки, а в случае развития выраженной кишечной непроходимости, сочетающейся с застоем и энтероколитом, может потребоваться удаление клапана [103].

В зарубежной литературе описан метод частичной контролируемой обструкции тонкой кишки, для стимуляции её дилатации, которая в дальнейшем использовалась при проведении удлиняющих кишечник операций у детей с синдромом ультракороткой кишки [103, 141, 217]. При использовании этой методики трубка соединяла проксимальный и дистальный отделы кишечника (выше и ниже резекции) и выводилась на переднюю брюшную стенку. Проксимальная часть трубки перекрывалась на промежутки времени, которые постепенно увеличивались. Для получения контролируемого, вызванного обструкцией, расширения тонкой кишки данная процедура проводилась в течение 5-6 месяцев. Дети кормились через рот, при этом содержимое кишечника из проксимального отдела кишки через трубку поступало в дистальный отдел, чем достигалось сохранение кишечной непрерывности [141, 217]. Murphy F. с соавторами [141] описали, что у 10 новорождённых с остатком тонкой кишки

менее 30 см, после контролируемого расширения кишечника, была проведена удлиняющая кишечник операция. В результате 9 пациентам удалось отказаться от парентерального питания. Применение подобного принципа было описано Wales P.W. [144] у 5 новорожденных, у которых применяли кормление через гастростомические трубки. За три месяца применения данной методики средняя длина тонкой кишки увеличилась с 18 до 51 см и расширилась до 5 см. У всех пациентов на расширенном участке кишки была проведена удлиняющая кишечник операция. В результате первоначальная длина кишечника увеличилась в 3 раза, и 2 пациентам удалось отказаться от парентерального питания. Несмотря на описанные выше результаты, до сих пор неизвестно, улучшает ли контролируемая обструкция кишечника кишечную адаптацию сильнее, чем спонтанная кишечная адаптация при наложении первичного анастомоза [218].

Второй большой группой аутогенных хирургических реконструкций тонкой кишки являются удлиняющие кишечник операции. В настоящее время они являются наиболее часто применяющимися операциями при СКК. К операциям данного типа относятся метод продольного кишечного удлинения (Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT)) [102], серийная поперечная энтеропластика (Serial Transverse Enteroplasty (STEP)) [137, 214, 323] и метод спирального кишечного удлинения (Spiral Intestinal Lengthening and Tailoring (SILT)) [363].

В 1980 году Bianchi представил метод продольного кишечного удлинения (LILT) [103]. Принцип данной операции заключается в том, что дилатированный участок тонкой кишки разделяется вдоль и создаются 2 кишечные трубки, которые анастомозируются между собой с остальной частью кишечника конец в конец [104, 303]. Операция LILT позволяла достичь удлинения кишечника в среднем на 48% (от 25% до 100%) [137].

При использовании метода продольного кишечного удлинения (LILT) общая выживаемость варьировала от 30% до 100% [102, 103, 170, 303, 364]. У пациентов СКК и фиброзом печени, которые после проведения LILT смогли отказаться от парентерального питания, происходила нормализация уровня

печеночных ферментов [240]. По сообщениям Waag K.L. с соавторами [387], анализ отдалённых результатов применения LILT показал, что из 25 прооперированных пациентов выжило 18. Причинами смерти всех пациентов после LILT явились осложнения, связанные не с проведенной операцией, а с основным заболеванием пациента. Длина тонкой кишки до удлинения составила 28 см (от 6 до 48 см), после удлинения - 45,5 см (от 11 до 73 см). У 13 пациентов из 18 общие результаты лечения были признаны приемлемыми. Операция LILT при лечении СКК, улучшает кишечную абсорбцию, уменьшает кишечный застой и рост патогенных бактерий, однако сопряжена с риском осложнений, таких, как некроз одного из созданных сегментов кишки, стриктуры анастомоза, спаечная тонкокишечная непроходимость, формирование свищей между удлинёнными петлями кишки, печеночная недостаточность, и рецидивирующее расширение кишечника [171, 303, 360]. По данным Waag K.L. с соавторами [387] в отдалённом периоде у пациентов может наблюдаться гиперфагия, гипохлоремия, гипонатриемия, мочекаменная, желчнокаменная болезнь, желудочно-пищеводный рефлюкс, дистрофия и симптомы, вызванные вторичным расширением удлинённой петли кишечника: выступающим животом, кишечным застоем, приводящим к запору или диарее, выраженным бактериальным ростом в кишечнике, метаболическим ацидозом, в том числе D-лактат ацидозом. По данным Вуено J. с соавторами [95] и Iyer K.R. [225] LILT следует применять с осторожностью у пациентов с ультракороткой тонкой кишкой и при наличии патологии печени.

Серийная поперечная энтероластика (СТЕР) – удлиняющая кишечник операция, описанная 2003 году Kim [321]. Данная операция выполняется путем наложения линейного степлера на расширенный участок кишечника, перпендикулярно оси кишечника с противоположных сторон, образуя зигзагообразный канал [321]. Операция СТЕР позволяет удлинить тонкую кишку кишечника в среднем на 63% (от 40% до 120%) [204, 206, 346, 349, 362], и может применяться при дилатации двенадцатиперстной кишки [148, 149]. По мнению Cserni T. [363] операция СТЕР изменяет физиологическое направление мышечных

слоёв. Mutanen A. [328] обнаружил, что у пациентов, которым проводилась повторная операция STEP (reSTEP), первичная операция STEP нарушала физиологическую гипертрофию слизистой оболочки. В своей работе Barrett M. с соавторами [352] описали, что повторная операция STEP (reSTEP) не привела к значительному уменьшению доли парентерального питания ни у одного из пациентов.

Frongia G. [334] описал в экспериментальном исследовании, что операция STEP может применяться совместно с трансплантацией кишечника.

Среди отечественных работ Аверьянова Ю.В. с соавторами [51], описали 10-летний опыт аутологических интестинальных реконструкций при СКК у 14 детей, включавших в себя операции STEP, в том числе в модификации авторов, которая заключалась в обязательной интубации созданных анастомозов через гастростому по Штамму-Кадеру ( $n = 12$ ) или цекостому ( $n = 1$ ), формировании антирефлюксной манжеты по Ниссену ( $n = 5$ ), формировании антирефлюксных клапанов при создании тонко-толстокишечных анастомозов ( $n = 6$ ). Трём пациентам с сопутствующим аганглиозом толстой кишки одновременно со STEP авторы выполнили тотальную колэктомию с созданием энтероанального анастомоза. В 2 случаях у пациентов с ультракороткой тонкой кишкой авторы дополнили операцию STEP интерпозицией участка толстой кишки в центр удлиненной тонкой кишки, что было возможно у пациентов с ультракороткой зоной тонкой кишки и сохранной толстой кишкой. Авторы описали увеличение длины тонкой кишки в среднем на 60% и считают, что аутологичные интестинальные реконструкции являются перспективным не трансплантологическим видом лечения СКК у детей.

Эта же группа исследователей опубликовала в 2018 году результаты лечения 45 детей с СКК. Из них 32 детям была проведена операция STEP, в том числе 5 детям выполнена повторная энтеропластика (reSTEP). Выживаемость составила 89%. Причиной летальных исходов после успешно выполненных операций была катетер-ассоциированная инфекция крови [64].

По данным реестра STEP послеоперационные осложнения встречались у 7 из 38 пациентов, а смертность составила 3 из 38 пациентов [142, 174]. Другие авторы также отмечали осложнения после операции STEP в отдаленном периоде, в том числе и повторная дилатация кишечника с рецидивирующим ростом патогенных бактерий и последующим нарушением всасывания [275, 303, 327].

Frongia G. с соавторами [137] провели систематический анализ 24 статей, посвящённых LILT и 15 публикаций, посвящённых операции STEP, сделали вывод, что кишечные кровотечения в послеоперационном периоде встречались после операции LILT у 16,1% пациентов, после операции STEP у 22%, кишечная непроходимость после операции LILT в среднем 17,7%, доходя до 42,8%, после операции STEP в среднем в 17,5% случаев, несостоятельность швов встречалась у 13,2% пациентов после операции LILT и у 12,1% после операции STEP. Некрозы кишки, перфорации и фистулы описаны у 7,4-10,6% пациентов только после LILT. Повторная дилатация тонкой кишки, по поводу которой была произведена ReSTEP развилась у 1/3-1/4 пациентов [206, 323, 327]. Несмотря на риск послеоперационных осложнений LILT и STEP, по мнению многих авторов, является безопасным методом для удлинения кишечника [171, 275, 303, 322, 323, 305, 327, 360].

Метод спирального кишечного удлинения (Spiral Intestinal Lengthening and Tailoring (SILT)) впервые был продолжен Cserni T. с соавторами в 2011 году [267]. Он заключается в том, что на расширенном участке тонкой кишки стерильным карандашом наносится спиральная линия под углом 45-60° к оси кишки. Кишка разрезается по линии с помощью диатермокоагуляции и ножниц, затем вытягивается и скручивается вдоль катетера. В таком положении кишка сшивается [342]. Первое исследование на животных проводилось на вьетнамских свинках. Методом SILT удалось удлинить тонкую кишку на 74,8%±29,5% и сузить её просвет на 56,25%±18,8%. В 2-х случаях из 6 у животных развилась кишечная непроходимость из-за сужения просвета кишки, более чем на 70% [342].

Первый клинический опыт применения SILT был опубликован Cserni T. с соавторами [363], у 3-х летнего пациента с остатком тощей кишки 15 см. В течение первого года жизни тонкая кишка выросла до 22 см. При помощи операции SILT удалось удлинить 11 см тонкой кишки до 20 см и получить общую длину тонкой кишки 31 см. У пациента не было послеоперационных осложнений, и он перешёл на полное энтеральное питание. Операция SILT также была применена у 10-ти месячного пациента с СКК. Операция SILT удлинила 9 см тощей кишки до 14 см, позволив достигнуть общую длину тонкой кишки пациента до 19 см. Через год после операции пациент получал 82% суточной потребности калорий энтерально и 18% парентерально, находясь между 15 и 25 перцентилями [341]. Cserni T. с соавторами [363] утверждают, что операция SILT требует меньше манипуляций с брыжейкой кишки, по сравнению с методикой LILT, в то же время не нарушает ориентации мышечных пучков относительно просвета кишечной трубки, в отличие от операции STEP. Есть мнение, что операцию SILT возможно выполнять на менее дилатированной кишке, которая может не подходить для операций LILT и STEP [133]. В исследовании Coletta R. с соавторами [131] описаны результаты лечения 5 пациентов методом SILT, доказано, что потребность в парентеральном питании у прооперированных пациентов через 6 месяцев после операции снизилась, однако через 25 месяцев ещё ни один из пациентов не был переведён на полное энтеральное питание. Необходимы дальнейшие исследования для изучения отдаленных результатов после операции SILT в педиатрической практике. На настоящем этапе накоплен небольшой опыт проведения данной операции, что не позволяет оценить эффективность данной методики и риски осложнений.

В начале 2021 года опубликована работа, в которой был представлен метод двуствольной энтероластики (Double barrel enteroplasty) для лечения синдрома короткой кишки у детей. В данной работе был обобщён опыт лечения 10 детей с СКК. Авторами исследования показано, что двуствольная энтероластика технически осуществима и безопасна. Данный метод хирургической коррекции по эффективности сопоставим с другими методами аутологичной реконструкции

кишечника, но может иметь меньше осложнений. В настоящее время накоплен небольшой опыт проведения данной операции [146].

Таким образом, удлиняющие кишечник операции улучшают кишечную абсорбцию, уменьшают кишечный застой и рост патогенных бактерий, однако сопряжены с риском осложнений. Кроме того, в настоящее время не стандартизированы подбор пациентов к тому или иному типу удлиняющей кишечник операции, что диктует необходимость определения показания и противопоказаний к операции LILT и STEP, а также разработки подходов и методик, уменьшающих частоту таких послеоперационных осложнений.

#### 1.6 Нутритивная поддержка и факторы, влияющие на восстановление полного энтерального питания после удлиняющих кишечник операций

Опубликованные данные свидетельствуют, что удлиняющие кишечник операции являются эффективным методом лечения СКК, позволяя снизить зависимость от парентерального питания [218, 303]. Однако в литературе описанная эффективность хирургических методов лечения сильно отличается как для операции LILT, так и операции STEP.

Bianchi, основатель методики LILT, в обзорной статье [103, 303] описывает, что при использовании метода продольного кишечного удлинения (LILT) доля пациентов, перешедших на полное энтеральное питание, в различных статьях сильно варьировала и составляла от 28-100%. Так Georgeson с соавторами [320] описали отказ от парентерального питания после проведённой операции LILT у 2 из 9 пациентов (22,2%). Walker [360] опубликовал 20-летний опыт применения операции LILT, в котором описал восстановление полного энтерального питания у 44% пациентов. Vonnard с соавторами [166], изучая результаты лечения 7 пациентов с СКК отметил, что 57% пациентов после операции LILT перешли на полное энтеральное питание. Khalil с соавторами [217], на основании 10-летнего опыта применения методики LILT описал, что 91% пациентов с СКК смогли перейти на полное энтеральное питание. Waag [387] отмечает, что доля ПП у



пациентов после LILT прогрессивно уменьшалась в течение нескольких недель и у 17 из 18 пациентов было восстановлено полное энтеральное питание. Он также отмечает, что всех у пациентов присутствовал илеоцекальный клапан и толстая кишка.

В большинстве опубликованных работ отмечается, что STEP эффективно снижает зависимость от ПП [64, 137, 215]. Аверьянова с соавторами [51] на основе 10-летнего опыта аутологичных интестинальных реконструкций при СКК у детей, включавших в себя операции STEP, создание антирефлюксных клапанов, интерпозиции участка толстой, опубликовали, что у 5 из 14 пациентов удалось полностью восстановить энтеральное питание, другие 5 пациентов нуждались в частичном парентеральном питании. Пациенты, которые остались на парентеральном питании были с ультракороткой резидуальной тонкой кишкой, либо с отсутствием толстой кишки. Процент энтеральной толерантности у пациентов составил 56% [51]. В исследовании этой же исследовательской группы, опубликованном в 2018 году среди 32 пациентов после операции STEP энтеральная автономия была достигнута в 45% случаев [64]. Важно отметить, что авторы отмечают, то, что длина тонкой кишки до операции влияет на достижение энтеральной автономии. Ни один из пациентов с длиной тонкой кишки менее 30 см не достиг полной энтеральной автономии. Доля достигших ее среди пациентов с длиной тонкой кишки более 30 см составила 56,5%. Авторы не выявили влияние наличия толстой кишки на формирование энтеральной автономии [64]. Miyasaka E.A. и соавторы [253] описали переход на полное энтеральное питание у 4 из 7 пациентов (57%) после операции LILT и 3 из 9 пациентов (33%) после операции STEP. Также было выявлено, что после операции STEP 6 из 16 пациентов (38%) перешли на полное энтеральное питание. Данные, опубликованные из международного регистра STEP указывали, что 47% пациентов (37 из 97 пациентов) отказались от парентерального питания после операции STEP [306].

В одном из последних исследований, опубликованных в 2019 году перейти на полное энтеральное питание удалось 5 пациентам из 9 после LILT, 1 пациенту из 7 после операции STEP [98]. Большой разброс данных об эффективности

отказа от парентерального питания у пациентов с СКК после удлиняющих кишечник операций также подтверждается систематическим обзором, в котором рассматривались 24 публикации, посвящённые операции LILT и 15 публикаций, посвящённых операции STEP. Данный обзор показал, что после операции LILT отказываются от парентерального питания и переходят на полное энтеральное питание от 4% до 100% пациентов, после операции STEP - от 20% до 100% [137].

Всё вышперечисленное свидетельствует, о том, что на результаты хирургического лечения пациентов с СКК, помимо оперативного вмешательства влияют и другие факторы. Есть мнение ряда авторов, что в развитии и прогнозе СКК, помимо длины тонкой кишки, важную роль могут играть: индивидуальные абсорбтивные возможности кишечника, наличие подвздошной кишки и илеоцекального клапана, состояние сохранённого участка кишки, наличие или отсутствие толстой кишки, количество инфекций в анамнезе, количество перенесенных абдоминальных операций, наличие поражения печени и т.д. [10, 142, 230, 281, 354]. Есть мнение, что отсутствие илеоцекального клапана увеличивает необходимость проведения повторных операций STEP [86].

Анализ литературы показал, что эффективность отказа от парентерального питания и перехода на полное энтеральное питание после удлиняющих кишечник операций сильно варьирует. Дискутируется, но остается недоказанным влияние остаточной толстой кишки, илеоцекального клапана и редилатации тонкой кишки на результаты хирургического лечения пациентов с СКК. Всё это диктует необходимость изучения сроков восстановления полного энтерального питания, в зависимости от наличия или отсутствия толстой кишки и илеоцекального угла и редилатации тонкой кишки.

### 1.7 Тканевая инженерия кишечника. Роль нервной системы в кишечнике

Эффективность применения современных терапевтических и хирургических методов лечения СКК не превышает 45-70% [292]. Трансплантация кишечника даёт неудовлетворительные результаты. Так, по данным крупнейшего

европейского центра по трансплантации кишечника у детей пятилетняя и десятилетняя выживаемость трансплантата после пересадки кишечника составляют 44-57% и 31-44% соответственно [376]. Согласно данным отчета американского регистра по трансплантации кишечника, на основании анализа данных 2699 пациентов пятилетняя выживаемость пациентов составила лишь 56% [221]. В связи с этим, количество трансплантаций кишечника в последние 10 лет неуклонно уменьшается [221], а показания к трансплантации очень ограничены [87, 150, 290]. Таким образом, среди пациентов с СКК есть группа больных, у которых применение современных методов лечения, в том числе трансплантация кишечника, неэффективны и требуется разработка новых стратегических подходов лечения.

Тканевая инженерия раскрывает принципиально новый подход к лечению пациентов с СКК и хронической кишечной недостаточностью [3, 68, 142], и необходимо дальнейшее проведение научных исследований в этом направлении для того, чтобы кишечник, полученный с помощью тканевой инженерии, можно было применить и у людей [142].

Косулин А.В. с соавторами [68] утверждают, что для обеспечения персонифицированного подхода в хирургии в будущем, именно тканевая инженерия, способна предложить новые типы протезов для тонкого кишечника с оптимально подобранными матрицей и органоспецифическими клетками самого пациента.

Martin L.Y. с соавторами [368] констатируют, что целью культивации искусственного кишечника является создание кишечной трубки, содержащей эпителий, способной к абсорбции и обладающей барьерной и иммунной функциями, а также мышечного слоя, обладающего физиологической моторикой. В тканевой инженерии используется матрица, заменяющая внеклеточный матрикс тканей, заполняемая необходимыми клетками, рост и развитие которых регулируется и стимулируется с помощью различных факторов роста. Кроме этого, важным условием является васкуляризация новых тканей.

Современная эра тканевой инженерии началась в 1988 году, когда Vacanti J.P. с соавторами [319] впервые культивировал ткань поджелудочной железы и кишечника. В последние годы исследователи достигли определенных результатов в моделировании отдельных компонентов кишки [369]. Были изучены возможности различных матриксов в роли основы для создания искусственного кишечника.

Матрикссы можно разделить на три группы:

1. Децеллюляризованные матрикссы – матрикссы, основанные на биологических тканях, из которых были удалены клетки. К этой группе можно отнести бесклеточный кожный матрикс, подслизистый слой тонкой кишки [157, 388], бесклеточный матрикс из кишечника [319]. Многие бесклеточные матрикссы могут поддерживать эпителиальные клетки тонкой кишки, а некоторые из них обладают ангиогенными свойствами. Однако при использовании децеллюляризованных матриксов необходимо учитывать ткань, из которой сделан матрикс, так как для каждого типа клеток оптимальным является матрикс, созданный из определённой ткани [368]. Кроме того, Finkbeiner S.R. с соавторами [181181] доказали, что эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) не растут на децеллюляризованной свиной ткани, а кишечные органоиды человека (ГИО) теряют свой кишечный фенотип в децеллюляризованной свиной ткани *in vivo*.

2. Матрикссы, основанные на элементах биологических тканей. Это, например, матрикссы из коллагена, шёлка или хитозана, или других натуральных материалов. Преимуществом коллагена является его природное происхождение. Хитозан обладает хорошей биосовместимостью и дегидратацией. Потенциальными преимуществами шелка являются низкая иммуногенность, механические свойства (можно регулировать жёсткость матрикса) и возможность регулировать деградацию [368].

3. Синтетические матрикссы – наиболее распространенный класс матриксов, применяемых в тканевой инженерии. В частности, используются полигликолевая кислота (PGA), полилактатная кислота (PLA), поли-ε-капролактон (PCL),

гликолевая кислота (PLGA) и другие комбинации, часто покрытые вторым полимером или матриксным белком, таким как коллаген, фибронектин или матригель. Основным преимуществом синтетических полимеров является возможность синтезировать их практически в неограниченных количествах и регулировать механические (жесткость матрикса), структурные и деградационные свойства, на основе рациональной конструкции полимера. К их недостаткам относится риск хронического воспаления.

Матрикс исследовались с различными типами клеток, такими как энтеральные стволовые клетки, органотипические культуры, мышечные клетки и др. Изучались модели *in vitro* и *in vivo* (животные модели). Авторы показывали преимущества тех или иных комбинаций матриксов и клеток для создания определённых тканей кишечника [81, 203, 369, 375].

Было показано, что мезенхимальные клетки могут дифференцироваться в энтероциты cells [343]. Levin D.E. и соавторы [196] создали органотипические культуры с четырьмя типами клеток кишечника, в которых обнаружили глиальные клетки. Авторы считают, что для нормального функционирования кишки, созданной при помощи тканевой инженерии, необходимым условием является наличие энтеральной нервной системы [196]. Другие исследователи также сходятся во мнении, что способность иннервировать искусственно выращенный мышечный слой, является ключевым элементом для создания функционального кишечника [110, 147]. Чтобы достичь этого, различные лаборатории сосредоточились на том, чтобы вырастить нервную систему кишечника. Группа Pachnis [257] идентифицировала гетерозиготные клетки по RET-гену (RET + -), служащие мультипотентными предшественниками, способными индуцировать колонизацию аганглионарной кишки нейронами и глией. Schafer K.H. и соавторы [316] опубликовали методику выделения нейросфер из ENS. При выделении и трансплантации нейросфер аганглионарным мышам было установлено, что они дифференцировались в нейрональные и глиальные клетки с образованием синапсов, способных к сокращению [193]. Исследователями также продемонстрировано образование нейрональных

компонентов в искусственном кишечнике после имплантации небольшого участка матрикса в кишку [368]. Однако описания межмышечного или подслизистого сплетений, выращенных при помощи тканевой инженерии до настоящего времени нет [147, 157].

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что до сих пор не существует работ, в которых были бы сконструированы компоненты кишечной нервной системы, способные функционировать, это диктует необходимость разработки методики культивирования клеток нервной системы кишечника, обладающих способностью образовывать взаимосвязи друг с другом в трехмерной среде и формировать нервные сплетения.

### 1.8 Тканевая инженерия мышечного слоя тонкой кишки

Желудочно-кишечный тракт представляет собой сложную систему с несколькими типами клеток, организованными в разных слоях. Гладкомышечный слой является основной единицей мускулатуры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Взаимное расположение и фенотип гладких мышц кишечника [220], а также иннервация имеют решающее значение для правильного функционирования [110, 147]. ЖКТ имеет свой собственный внутренний регуляторный аппарат, который включает кишечную нервную систему и интерстициальные клетки Кахаля (ИСС) [347]. Гладкомышечная ткань получает и интерпретирует сигналы от регулирующего аппарата, необходимые для правильного функционирования [110]. Другой важный компонент желудочно-кишечного тракта включает эпителий, который необходим для секреции ферментов, поглощения питательных веществ и защитного барьера. Все эти функции выполняются разными специализированными типами клеток, в биоинженерном кишечнике должны быть представлены все эти клетки в функциональных взаимосвязях [347]. Функциональный иннервированный мышечный слой является важной составной частью, как нативной стенки тонкой кишки, так и биоинженерной тонкой кишки. Чтобы искусственный кишечник

функционировал, как автономный, он должен обладать перистальтической активностью [368]. Межмышечные нервные сплетения являются ключевой составной частью мышечных слоёв тонкой кишки, позволяющей мышечным слоям, координированно сокращаться и продвигать содержимое по кишечнику.

В предыдущих попытках разработки сегментов кишечника использовались каркасы, заполненные органоидными единицами, выделенными из разных частей желудочно-кишечного тракта [83, 194, 372, 373]. Массивная резекция кишечника была выполнена у крыс с последующим анастомозом с биоинженерно-созданным элементом тонкой кишки [374]. Была получена ткань с дифференцированными эпителиальными, мышечными и нервными компонентами [137]. Органоидные единицы, как было показано, успешно генерируют мышечный слой, нервные клетки и дифференцированный функциональный эпителий в исследованиях на малых и крупных животных. В работах других исследователей, где применялся хитозан в роли матрикса для клеток, производилось совместное культивирование клеток гладких мышц и нейральных предшественников были получены хорошие результаты [108, 291]. Авторам удалось получить гладкомышечные листы, содержащие нервные клетки, сконструированные трубчатые нервно-мышечные ткани стали васкуляризированными и сохранили свои миогенные и нейрогенные характеристики, и реагировали на воздействие экзогенных сократительных/релаксантных трансммиттеров [347].

Однако в полученных структурах не были выявлены межмышечные нервные сплетения и полученные структуры не обладали спонтанной сократительной активностью, что крайне важно для целей моторики.

Raghavan S. с соавторами [107] выращивали монокультуру мышечных клеток на покрытой ламинином поверхности Sylgard с волнистыми микротопографиями. Выращенные мышечные биоинженерные ткани реагировали на физиологически значимые вещества, функционально аналогично продольной ткани, выделенной от животного, что указывало на сохранение структурных рецепторов для агонисто-посредованных путей сокращения/расслабления, связанных с G-белком. Полученные биоинженерные ткани поддерживали

характеристику нативных продольных гладкомышечных тканей, в зависимости от концентрации внеклеточного кальция. Эти эксперименты позволяют утверждать, что биоинженерные мышцы обладают автоматической функциональностью на раздражения [107]. Однако, таким образом, полученная функциональность, проявляющаяся без наличия нервных сплетений, не является скоординированной и нервно опосредованной, и не способна создавать перистальтику в биоинженерной кишке.

В исследованиях по имплантации коллагеновых матриц с мышечными клетками в кишечную стенку животных показали, что, несмотря на то, что образовывался слой мышечных клеток, межмышечное и подслизистое сплетения не наблюдались даже через 24 недели после имплантации [370]. Кроме того, было показано отсутствие правильного роста и взаимного расположения гладких мышц или изменение фенотипа клеток [172, 369, 370].

Grant C.N. и соавторы [194] опубликовали работы по экспериментам с выращиванием органоидных единиц, полученных из кишечника мыши и человека, и имплантированных генетически идентичным или иммунодефицитным мышам на 4 недели. Они описали, что выращенный участок тонкой кишки вырос в форме сферы, имел эпителий, обращенный в просвет, также были обнаружены мезенхимные, мышечные и стволовыми клетки. Эпителий продемонстрировал основные ультраструктурные компоненты, в том числе плотные соединения между клетками, микроворсинки, белки транспортеры и функциональные пограничные, и пищеварительные ферменты. Однако в данной работе не было обнаружено иннервированных мышечных слоёв, содержащих межмышечные нервные сплетения, способные к сокращениям.

Анализ литературы показал, что до сих пор не существует работ, в которых был бы выращен иннервированный мышечный слой, содержащий нервные сплетения. Всё это диктует необходимость разработки метода выращивания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки *in vitro*, способного к сокращениям и выявление взаимосвязей между энтеральной нервной системой и гладкомышечными клетками.



## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационная работа выполнена на кафедре детской хирургии с физической и медицинской реабилитацией детей с курсом ИДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и включает четыре клинических, и два экспериментальных исследования.

Дизайн клинического материала носит ретроспективный и проспективный характер с историческим контролем. Дизайн экспериментальных исследований - проспективное, контролируемое.

### 2.1 Материалы и методы первого экспериментального исследования

#### 2.1.1 Изучение мышечных слоёв и межмышечных нервных сплетений при синдроме короткой кишки

Экспериментальное исследование на лабораторных животных проводилось при строгом соблюдении правил асептики, антисептики, этических норм и положений приказов МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», № 791 от 27 июня 1978 г. «О внесении дополнений в приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.», положениями Хельсинкской декларации по вопросам медицинской этики и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных от 1989 г. и в соответствии с немецким законом о защите животных, и с разрешения комитета по работе с животными медицинского факультета Мангейм университета Гайдельберг (Германия) и университета Любек (Германия).

Экспериментальное исследование выполнено на 22 крысах породы Wistar со средней массой тела 260-360 г. Обезболивание достигалось интраоперационной инъекцией кетамина из расчета 40 мг/кг и ромбуна – 4 мг/кг.

Для выполнения поставленной задачи животные были распределены на 2 группы. В основной группе 12 крысам после лапаротомии моделировали синдром короткой кишки путем субтотальной резекции с сохранением 5 см проксимальной части тощей кишки и 5 см дистальной части подвздошной кишки. Наложена анастомоз конец в конец. Крысам контрольной группы (10 животным) сделана лапаротомия без резекции тонкой кишки. После операции животным антибактериальная терапия не проводилась. Через 2 недели животные выведены из опыта при помощи усыпления углекислым газом. После выведения животных из опыта производили забор всей тонкой кишки, фиксировали в растворе нейтрального формалина в течение суток при комнатной температуре, материал заливали парафином на аппарате для создания парафиновых блоков HistoCore Arcadia H Leica (Leica, Германия). Полученные парафиновые блоки нарезали толщиной 5 микрон при помощи микротомы Leica RM 2245 (Leica, Германия). Далее препараты располагали на предметном стекле и высушивали при температуре 60 градусов в течение 2-х часов.

#### Окрашивание мышечных слоёв и стволовых клеток

Окрашивание препаратов проводилось гематоксилином и эозином, а также проводилось иммуногистохимическое окрашивание и иммунофлюоресцентное окрашивание нестином (маркером стволовых клеток). Применялся непрямой метод иммунофлюоресценции.

Для изучения морфологии мышечных слоёв тонкой кишки методом световой микроскопии гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином на аппарате Leica AutoSTAINAER XL (Leica, Германия).

Для исследования стволовых клеток энтеральной нервной системы применяли иммуногистохимическое окрашивание нестином с двумя методиками

визуализации. Для визуализации стволовых клеток при этом эксперименте по первой методике применялась пероксидаза (ENVISION KIT (DAKO)). Данная методика идентифицирует нервные сплетения в толще мышечных слоёв, содержащие стволовые клетки при небольшом увеличении. Преимуществом данной методики является то, что специфическая окраска не выцветает со временем и препараты можно исследовать с помощью светового микроскопа.

Вторую методику окрашивания проводили с помощью иммунофлюоресцентного метода, позволяющего более детально, по сравнению с первой методикой, изучить нервное сплетение при более высоком увеличении и точно определить долю, занимаемую стволовыми клетками внутри нервного сплетения. Для микроскопирования этих препаратов необходим флюоресцентный микроскоп. При использовании такого окрашивания препараты выцветают при исследовании, при попадании на препараты прямых солнечных лучей, а также со временем. Поэтому эти биоптаты хранились в тёмном боксе при температуре +4°C и микроскопировались по возможности, как можно быстрее.

Протокол окрашивания с применением пероксидазы был следующим: сначала проводилось демаскирование антигенов в цитратном буфере (Sigma-Aldrich) в термостате при 95°C в течение одного часа. Неспецифическое окрашивание блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином (Bovine serum albumin, BSA (Serva 11930)) в течение одного часа. Далее препараты инкубировали с первичными антителами к нестину (mouse-antinestin antibody, Chemicon Int) в разведении 1:200 в TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO)). Затем после обработки биоптатов 3% раствором пероксида водорода в течение 5 минут их инкубировали со вторичным антителом – с Envision Mouse Polimer HRP (DAKO K4000) и визуализировали с помощью набора DAB Substrat-Chromogen (DAKO K 3468). Потом полученные препараты обезвоживали при помощи последовательного погружения препаратов в 70%, 80%, 90% этанол, затем дважды в 100% этанол, потом трижды в ксилол. Каждое погружение длилось 30 секунд. Далее на препараты наносили 100 мкл Mounting Medium (Sigma-Aldrich) и препараты накрывали покровным стеклом.

Вторую методику с применением иммунофлюоресцентного окрашивания нестином проводили в соответствии со следующим протоколом: препараты были обезвожены при помощи последовательного погружения препаратов в 70%, 80%, 90% этанол, потом дважды в 100% этанол, потом трижды в ксилол. Каждое погружение длилось 30 секунд. Демаскирование антигенов проводилось цитратным буфером (Sigma-Aldrich) в термостате при 95°C в течение одного часа; неспецифическое окрашивание блокировали с помощью 10% нормальной козьей сыворотки (Normal Goat Serum (NGS); DAKO). Далее препараты инкубировали с первичными антителами к нестину (mouse-antinestin antibody, Chemicon Int) в разведении 1: 200 в TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO) в течение ночи при температуре +4 градуса. Затем препараты инкубировали со вторым антителом, которое было маркировано флюорохромом с длиной волны 488 нм (Alexa Flour® goat-antimouse 488 (Thermo Fisher Scientific)) в разведении 1:500 в TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO) в течение одного часа при комнатной температуре. На следующем этапе проводили окрашивание ядер клеток при помощи 6-диамино-2-фенилиндолоа (DAPI, Invitrogen) в разведении 1: 1000 в натрий-фосфатном буфере (Phosphate-buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich) в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее на препараты наносили 100 мкл Fluorescent Mounting Medium (Sigma-Aldrich) и препараты накрывали покровным стеклом. Для того, чтобы исключить возможность ложноположительного окрашивания иммуногистохимическая и иммунофлюоресцентная окраска всегда сопровождалась покраской и анализом контрольных образцов, в которых вместо первого антитела использовался натрий-фосфатный буфер (Phosphate-buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich).

Для морфометрического и флюоресцентного анализа использовали инвертированный световой и фазово-контрастный микроскоп Olympus IX 70 (Olympus) с камерой и программным обеспечением AnalySIS (Olympus), а также флюоресцентный микроскоп (Keyence VM9000X) с функцией фотографической документации и со встроенным программным обеспечением для анализа полученных фотографий.

### Методики гистологических и иммунофлюоресцентных измерений

На срезах тонкой кишки изучался её диаметр. Полученные препараты имели округлую или овальную форму. Чтобы овальная форма препарата не искажала длину диаметра, диаметр тонкой кишки рассчитывался как среднее из двух взаимно перпендикулярных измерений диаметров (Рисунок 1).

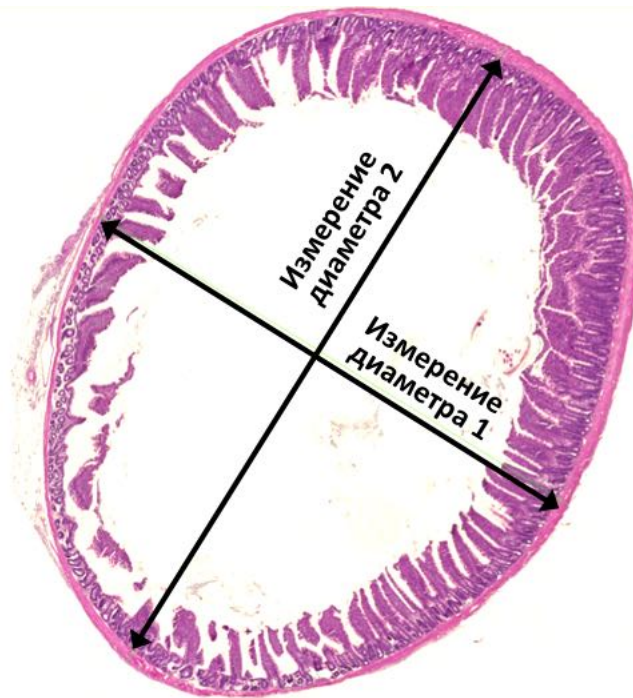


Рисунок 1 – Поперечный срез тонкой кишки крысы. Измерение диаметров тонкой кишки. Диаметр рассчитывается по формуле: Диаметр тонкой кишки = (Измерение диаметра 1 + Измерение диаметра 2)/2. Окраска гематоксилином эозин. Световая микроскопия. Увеличение 20х.

Толщина мышечных слоев тонкой кишки измерялась отдельно для циркулярного и продольного мышечных слоёв при помощи программного обеспечения микроскопа Keyence VM9000X через каждые 500 мкм (Рисунок 2).

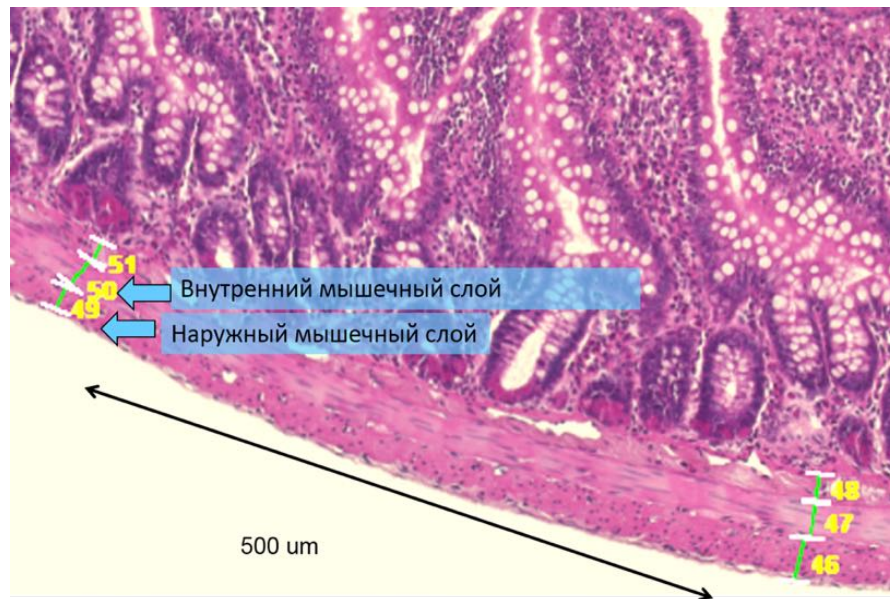


Рисунок 2 – Фрагмент стенки тощей кишки крысы в поперечном разрезе. Измерение толщины мышечных слоёв. Окраска гематоксилином эозин. Световая микроскопия. Увеличение 400х.

Для определения площади мышечной ткани в поперечном срезе тонкой кишки использовалась следующая формула:

площадь мышечного слоя =  $\pi$  x диаметр x толщина мышечного слоя (1).

Нестин – это специфически маркер нейрональных стволовых клеток в межмышечном нервном сплетении. По наличию специфического иммуногистохимического и иммунофлюоресцентного окрашивания нестином определялось наличие и экспрессия стволовых клеток.

Препараты, окрашенные нестином с пероксидазой, изучались в световом микроскопе. Для препаратов с иммунофлюоресцентным окрашиванием нестином была использована следующая методика анализа:

На первом этапе производилась фотография переэкспонированного (пересвеченного) препарата. Это делалось для того, чтобы отчётливо увидеть фоновое свечение препарата и идентифицировать границы межмышечного сплетения. Затем измерялась площадь межмышечного сплетения. На втором этапе выставляли стандартные настройки экспонирования образца, при котором были видны только участки со специфической флюоресценцией (окрашенные

антителами к нестину), а фоновое свечение пропадало. На третьем этапе рассчитывалось отношение участков со специфической флюоресценцией (нестинположительных участков) к общей площади межмышечного сплетения (Рисунок 3).

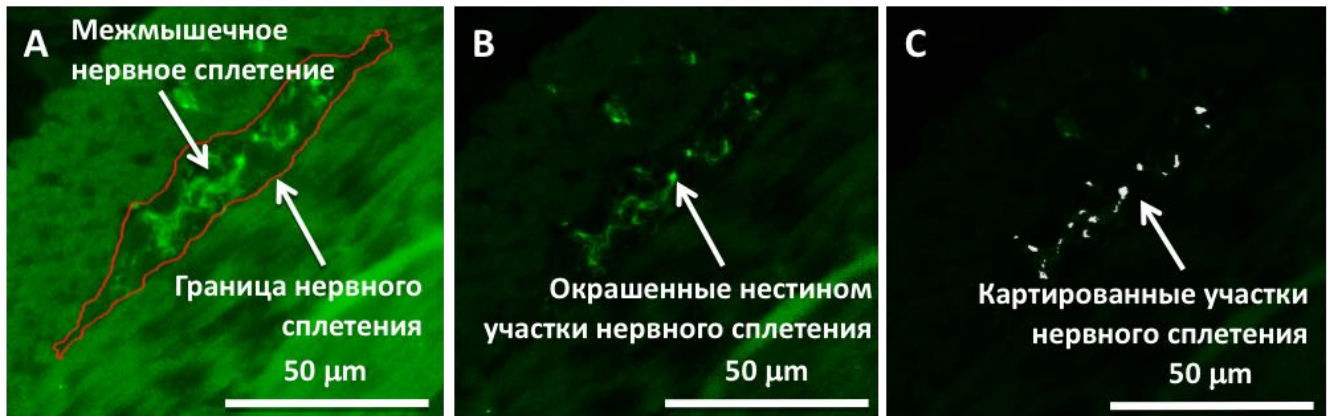


Рисунок 3 – Фрагмент стенки тощей кишки крысы в поперечном разрезе. Межмышечное нервное сплетение крысы. Иммунофлюоресцентное окрашивание нестина флюорохромом с длиной волны 488 нм (зелёный цвет). А – переэкспонированный препарат. В – нормальное экспонирование препарата, С – картирование окрашенных нестином участков.

## 2.2 Материалы и методы клинического исследования

### 2.2.1 Общая характеристика клинического материала

На кафедре детской хирургии с физической и медицинской реабилитацией детей с курсом ИДПО ФГБУ ВО БГМУ Минздрава России (г. Уфа) и в университетской клинике детской хирургии Мангейм университета Гайдельберг (Германия) были обследованы 54 ребенка с синдромом короткой кишки, которым проводились удлиняющие кишечник операции с 1996 по 2019 годы. Удлиняющие кишечник операции проводились в клинике детской хирургии университетской клиники Мангейм университета Гайдельберг (Германия).

Критерии включения:

- пациенты в возрасте от 6 месяцев до 15 лет,
- диагноз синдром короткой кишки, т.е. пациенты, перенёвшие резекцию

тонкой кишки более 50% и находившиеся на парентеральном питании более 3-х месяцев,

-пациенты, которым были проведены удлиняющие кишечник операции.

Критерии исключения:

- пациенты с нормальной длиной тонкой кишки,

- пациенты, которым не проводились удлиняющие кишечник операции,

- пациенты с врожденными энтеропатиями (врожденная атрофия микроворсин),

- пациенты с нарушенной иннервацией тонкой кишки (синдром Цюльцера-Уильсона).

Для включения в исследование у пациента должны были быть все критерии включения и ни одного критерия исключения.

Результаты лечения оценивались в раннем и отдалённом послеоперационном периодах.

В связи с тем, что конечная точка должна быть клинически важной, легко измеряемой, основанной на объективной оценке и чувствительной к предполагаемому эффекту лечения [231], жёсткими конечными точками исследования являлись отказ пациента от парентерального питания и переход на полное энтеральное питание, осложнения после удлиняющих кишечник операций, и смерть пациента.

Синдром короткой кишки наблюдался после обширной резекции тонкой кишки при врождённых пороках развития и заболеваниях кишечника (Таблица 1). Наиболее частой причиной развития синдрома короткой кишки явился гастрошизис, который встречался у 21 пациента, что составило 38,9%. Гастрошизис сопровождался в пяти случаях атрезией тонкой кишки и в трёх случаях заворотом тонкой кишки. Второй по частоте причиной СКК был некротический энтероколит, он встречался у 14 пациентов с СКК, что составило 25,9%.

Третьей наиболее частой причиной развития СКК явилась атрезия тонкой кишки. Она встречалась у 10 пациентов, что составило 18,5%. В одном случае



атрезия тонкой кишки сочеталась с заворотом кишки. Заворот кишки являлся причиной развития СКК у 8 пациентов (14,8%). У 1 пациента (1,9%) первопричиной СКК явился некроз тонкой кишки, развившийся в результате тромбоза мезентеральных сосудов. У данного пациента после рождения была выявлена левосторонняя диафрагмальная грыжа, содержащая петли кишки, желудок и селезёнку. Диафрагмальная грыжа была прооперирована на 3 день после рождения. На второй день после операции из-за клиники острого живота ребёнку была произведена релапаротомия, в ходе которой был обнаружен некроз тонкой и части толстой кишки.

Резекция тонкой кишки проводилась в различных клиниках России и Германии. В последующем дети с СКК регулярно получали комплексное лечение необходимыми специалистами (детскими хирургами, педиатрами и т.д.) по месту жительства, в том числе в Уфе, Москве и Мангейме.

Таблица 1 – Распределение пациентов с СКК в соответствии с первичными заболеваниями по поводу которых была произведена обширная резекция кишечника

Заболевания	Количество пациентов	Доля пациентов (%)
Гастрошизис	21	38,9
Некротический энтероколит	14	25,9
Атрезия тонкой кишки	10	18,5
Заворот	8	14,8
Другое	1	1,9
Всего	54	100,0

У всех пациентов в возрасте от 6 месяцев до 15 лет были проведены удлиняющие кишечник операции.

Длина оставшейся тонкой кишки до проведения удлиняющих кишечник операций от 11 до 150 см и в среднем составила  $48,4 \pm 32$  см (распределение данных имело признаки ненормального, поэтому для описательной статистики мы также использовали медиану и 25 и 75 перцентили: медиана 37,5 (25;66,25)) (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение пациентов с СКК в зависимости от возраста и длины оставшейся тонкой кишки до проведения удлиняющих кишечник операций

Возраст	Длина тонкой кишки, см					Итого
	от 11 до 20 см	от 21 до 40 см	от 41 до 60 см	от 61 до 100	от 101 до 150	
от 6 мес. до 1 года	2	9	1	1	-	13
от 1 года до 3-х лет	4	10	5	3	-	22
от 3-х до 6-лет	1	4	1	2	-	8
от 6 до 13 лет	-	2	2	4	3	11
Всего	7	25	9	10	3	54

В таблице 3 представлена нормальная длина тонкой кишки в разных возрастных периодах, измерение которой производилось в постмортальном периоде, по данным Weaver L.T., Ausfin S., Cale T. (1991) [390].

Таблица 3 – Нормальная длина тонкой кишки в разных возрастных периодах по данным Weaver L.T., Ausfin S., Cale T., 1991

Возраст	Длина тонкой кишки, см
20 недель гестации	125
30 недель гестации	200
При рождении 38-40 недель	275
Год жизни	380
5 лет	450
10 лет	500
20 лет	575

При сопоставлении данных в таблицах 2 и 3 видно, что у 41 из 54 пациентов длина тонкой кишки до операции составляла не более 60 см, то есть менее 15% от нормальной длины тонкой кишки. При сопоставлении с данными Struijs M.C. с соавторами [164], которые измеряли длину тонкой кишки у живых пациентов при лапаротомии, установлено, что длина тонкой кишки у всех включённых в наше

исследование пациентов составила менее 50% от нормальной длины тонкой кишки и соответствовала критериям включения в исследование.

В зависимости от вида удлиняющей кишечник операции, все дети были подразделены на 2 группы. В первую группу (группа LILT) вошло 36 пациентов, которым проводилась операция продольного кишечного удлинения и ушивания (Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT)). Вторую группу (группа STEP) составили 15 пациентов, которым проводилась последовательная поперечная энтеропластика (Serial Transverse Enteroplasty Procedure (STEP)). Кроме того, троим пациентам обе операции (LILT+STEP) были проведены одновременно (Таблица 4).

Таблица 4 – Распределение пациентов с СКК в зависимости от проведённой удлиняющей кишечник операции

Операция	Количество пациентов
LILT	36
STEP	15
LILT+STEP	3
Всего	54

Операция LILT была разработана на 23 года раньше, чем операция STEP, поэтому в первые годы проводилась исключительно операция LILT и только в последнее десятилетие началось активное внедрение операции STEP. В связи с этим, все больные были разделены на 2 периода времени: первый период с 1996 по 2006 годы и второй период с 2007 по 2019 годы (Таблица 5).

Таблица 5 – Распределение пациентов с СКК в зависимости от удлиняющей кишечник операции и периода времени, когда эта операция была проведена

Годы	Вид операции		
	LILT	STEP	LILT+ STEP
1996-2006	26	0	0
2007-2019	10	15	3
Всего	36	15	3

В таблице 6 приведено распределение пациентов по длине оставшегося участка тонкой кишки до удлиняющих кишечник операций в зависимости от типа проведённой операции.

Таблица 6 – Распределение пациентов с СКК в зависимости от длины тонкой кишки и от проведённой удлиняющей кишечник операции

Операции	Длина сохранившегося отрезка тощей и тонкой кишки, см					Итого
	от 11 до 20	от 21 до 40	от 41 до 60	от 61 до 100	от 101 до 150	
LILT	7	21	4	3	1	36
STEP	-	4	5	5	1	15
LILT+STEP	-	-	-	2	1	3
Всего	7	25	9	10	3	54

Длина тонкой кишки до удлинения в группе LILT варьировала от 11 до 140 см и составила  $37,5 \pm 24$  см (распределение данных имело признаки ненормального, поэтому для описательной статистики мы также использовали медиану и 25, и 75 перцентили: медиана 32 (22,25;42,25)), в группе STEP группе длина тонкой кишки варьировала от 22 до 105 см и составила  $62,1 \pm 33$  см (медиана 55 (39;80)).

Илеоцекальный клапан присутствовал у 3 из 36 пациентов в группе LILT (8,3%) и у 3 из 15 пациентов в группе STEP (20%) (Рисунок 4).

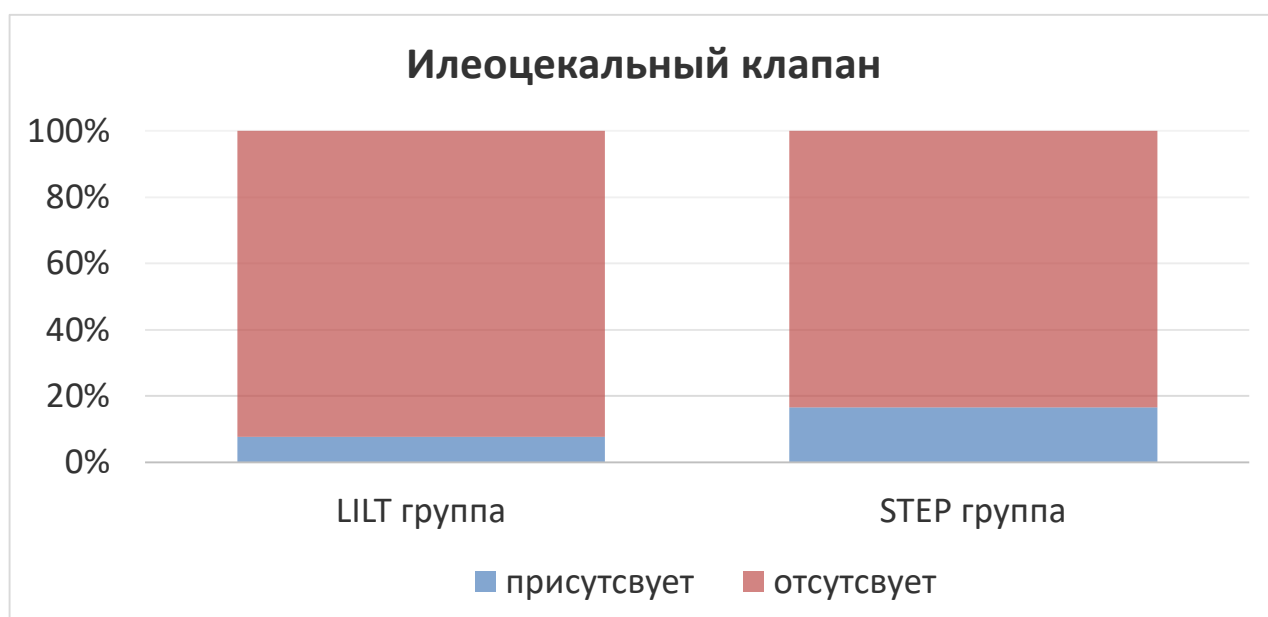


Рисунок 4 – Наличие илеоцекального клапана в LILT группе и STEP группе.

Более половины толстой кишки (включая половину) присутствовало у 29 из 36 пациентов (80,6%) в группе LILT и у 10 из 15 пациентов (66,7%) в группе STEP (Таблица 7).

Таблица 7 – Распределение пациентов с СКК в зависимости от наличия толстой кишки у пациентов LILT группы и STEP группы

Толстая кишка	Количество пациентов			
	LILT группа		STEP группа	
	абс.	%	абс.	%
Присутствует полностью	6	16,7	7	46,7
Присутствует поперечно-ободочная, нисходяще-ободочная, сигмовидная и прямая кишка	23	63,9	3	20
Присутствует сигмовидная и прямая кишка	7	19,4	3	20
Отсутствует	-	-	2	13,3
Всего	36	100	15	100

Все пациенты имели клинические проявления, характерные для СКК: мальдигестию, мальабсорбцию, мальнутрицию, дефицит массы тела и роста.

Парентеральное питание. Для компенсации хронической кишечной недостаточности всем детям проводилось парентеральное питание, которое включало аминокислоты, жиры, углеводы, электролиты, витамины, микроэлементы. Парентеральное питание рассчитывалось для каждого пациента индивидуально, на основе возрастных потребностей, а также индивидуальных потерь жидкости и электролитов. У пациентов применялось парентеральное питание, приготовленное в компаундинговом центре или адаптированное под пациента стандартное парентеральное питание в формате («all-in-one» все-в-одном).

Энтеральное питание, которое было направлено на стимуляцию кишечной адаптации и профилактику печёночного холестаза у пациентов, вводилось как можно раньше.

Для обеспечения парентерального питания (ПП) у всех пациентов использовался туннелированный центральный венозный катетер (Бровиак, Хикманн), который применялся как в клинике, так и дома. Туннелированный центральный венозный катетер (Бровиак, Хикманн) устанавливался в наружную яремную вену, внутреннюю яремную вену, или подключичную вену. Кончик катетера располагался в верхней полой вене или в правом предсердии.

### 2.2.2 Определение эффективности лучевых методов диагностики при синдроме короткой кишки

Для изучения возможностей лучевых методов исследования при определении длины тонкой кишки, выявлении дилатаций и стенозов тонкой кишки при СКК нами обследовано 8 пациентов в возрасте от 1 года до 13 лет, которым в рамках предоперационной подготовки к удлиняющим операциям на тонкой кишке проводились УЗИ, РКИ и МРТ кишечника. Пациентам в рамках предоперационной подготовки к удлиняющим кишечник операциям проводились

лучевые методы исследования тонкой кишки, результаты которых сопоставлялись с данными, полученными в ходе операций на тонкой кишке.

### 2.2.3 Характеристика процессов кишечной адаптации в мышечных слоях и нервной системе кишечника в тонкокишечных биоптатах пациентов с синдромом короткой кишки

Для изучения нервной системы кишечника у пациентов с синдромом короткой кишки и морфологического обоснования целесообразности удлиняющих кишечник операций нами проведен сравнительный анализ патоморфологических изменений в биоптатах, полученных при оперативном лечении 4 пациентов с СКК (основная группа) и 4 – без СКК и кишечной недостаточности (контрольная группа). Причинами резекции участка тонкой кишки у больных контрольной группы были следующие заболевания: дивертикул Меккеля в 3 случаях, инородное тело кишечника – в 1 случае.

Возраст пациентов колебался от 4 месяцев до 7,5 лет у пациентов с СКК и от 4 месяцев до 10,5 лет у больных из группы сравнения. Гендерный состав в основной и контрольных группах был идентичный – 1 мальчик и 3 девочки.

Экспериментальные исследования биоптатов тонкой кишки проводились с разрешения этических комитетов ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России и медицинского факультета Мангейм, университета Гейдельберга.

### 2.2.4 Методы исследования клинического материала

Проводилось комплексное обследование. Клиническое обследование включало в себя анализ жалоб, сбор анамнеза, осмотр, пальпацию, аускультацию, оценку общего состояния. Лабораторное исследование включало в себя: общий анализ крови, мочи, биохимическое исследование крови, определение группы крови и резус-фактора.

Анализировалась медицинская документация. Изучался анамнез пациентов, анализировались сведения о состоянии общего развития и питания пациентов (до и после удлиняющих кишечник операций), изучались проведённые операции, длина удаленной и оставшейся тонкой и толстой кишки и др.

Контролировали анализ крови для проверки параметров содержания электролитов, белков, альбумина, железообмена, билирубина, свертываемости крови и её общий анализ крови.

УЗИ выполнялось на аппаратах Philips iU22 и Philips HD11XE. Сканирование проводилось конвексным и линейным датчиками в диапазоне частот 5-12 МГц при положении ребенка, лежа на спине.

Для РКИ использовался аппарат Siemens Luminos Agile. Во время исследования пациент выпивал контраст Visipaque. При этом рентгеновские снимки делали во время введения контраста, а также через 15 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа и 4 часа.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) кишечника выполнялась на томографе MR SIEMENS AVANTO (Германия) с напряженностью магнитного поля 1,5 Т в сагиттальных и фронтальных проекциях, с преимущественным использованием быстрых программ – в режимах T1 и T2 взвешенных изображений (T2 HASTE, T2 BLADE, T2 TRUFI, T1 TSE, T1 VIBE), последовательностей с подавлением сигнала от жировой ткани, диффузионно-взвешенных изображений, также проводилось внутривенное динамическое контрастное усиление. Для исследования кишечника использовалась гибкая поверхностная 6-канальная катушка (6-body).

Обязательным условием проведения МРТ в педиатрической практике является поддержание вынужденного положения тела больного на время исследования. Исходя из особенностей психики детей и трудностей психологического контакта у ряда пациентов, требуется создание медикаментозного сна на время исследования.

Важную роль в обследовании занимала подготовка пациента к исследованию. Если пациент был старше 8 лет и мог в течение 45 минут



неподвижно лежать в аппарате МРТ, ему проводилось стандартное обследование по методике гидро-МРТ: пациент за 1 час до проведения исследования выпивал 1–1,5 литра раствора Маннитола, который состоял из 2,5 мл Маннитола, разведенного в 1,5 литре питьевой воды. Для внутривенного контрастирования использовался контрастный препарат Дотарем в дозе 1 мл/кг веса.

Следует помнить, что для МРТ, в отличие от рентгеновского исследования, существует ряд противопоказаний. Все они связаны с тем, что при её проведении пациент находится в сильном магнитном поле и подвергается воздействию радиочастотных импульсов, что может привести к смещению или нагреву металлических инородных тел, находящихся в организме. Противопоказаниями к проведению МРТ являлись: кардиостимуляторы, металлические клипсы на сосудах, ферромагнитные импланты, которые могут давать большие артефакты изображения или же адсорбировать достаточное количество энергии, чтобы вызвать неприятные ощущения от нагрева.

Стандартный протокол исследования включал следующие программы, с толщиной среза 3-4 мм:

- 1) HASTE fs (аксиальная проекция)
- 2) HASTE (фронтальная проекция)
- 3) 3D Trufi (аксиальная проекция)
- 4) DWI (аксиальная проекция)
- 5) VIBE nativ (фронтальная проекция)

Пациенту вводилось контрастное вещество внутривенно (дотарем 0,1 мл/кг)

- 6) T1 VIBE (фронтальная проекция)
- 7) T1 tse fs (таз) (аксиальная проекция).

Применение внутривенного контрастного усиления проводилось с целью анализа распределения контрастного вещества в стенке кишки. Это позволило лучше оценить участки стеноза кишки, наличие и протяженность свищей, воспалительные изменения кишки. При стенозах отмечалось уменьшение кишечного просвета и утолщение кишечной стенки, вероятность наличия стеноза увеличивалась при наличии престенотического расширения кишки.

Если возраст пациента был меньше 8 лет и пациент не мог спокойно лежать в течение 45 минут в аппарате МРТ, исследование проводилось под наркозом, который осуществлялся анестезиологом путем внутривенного введения пропофола. В ходе подготовки к наркозу, по рекомендации анестезиолога, пациент не принимал воду, в том числе раствор маннитола. Несмотря на то, что при данном варианте исследования не применялся контраст (раствор маннитола), сканирование проводилось по методике гидро-МРТ со стандартными параметрами.

Мы оценивали чувствительность, специфичность и точность в градациях: высокая, средняя, низкая. Чувствительность и специфичность определялись как высокая при показателе 100-68%, средняя при показателе 67-34%, низкая при показателе 33-0%.

Чувствительность =  $[(ИП/(ИП+ЛО))] \times 100\%$

Специфичность =  $[(ИО/(ИО+ЛП))] \times 100\%$ , где

ИП- истинно положительные результаты,

ИО- истинно отрицательные результаты,

ЛП- ложно положительные результаты,

ЛО- ложно отрицательные результаты.

Чувствительность характеризует долю правильного выявления изучаемой патологии. Специфичность характеризует, в каком проценте метод позволяет правильно определить отсутствие патологического процесса.

### 2.2.5 Методики удлиняющих кишечник операций

Метод продольного кишечного удлинения и ушивания (Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT))

Операция выполнялась под интубационным наркозом. Пациент располагался на операционном столе на спине. После обработки операционного поля производилась срединная продольная лапаротомия. Практически у всех пациентов с ССК имелся выраженный спаечный процесс в брюшной полости.

Поэтому особое внимание уделялось входу в брюшную полость, чтобы не повредить органы брюшной полости. Первым этапом аккуратно разъединялись все спайки и мобилизовалась вся тонкая кишка, начиная с двенадцатипёрстной до толстой кишки. Далее измеряли (определяли) длину тонкой кишки и диаметр расширенных участков тонкой кишки. Измерение проводилось по антимезентериальной стороне тонкой кишки и без её натяжения.

На уровне, где заканчивался расширенный участок тонкой кишки, кишка пересекалась и проводилась санация её просвета для предотвращения попадания её содержимого в брюшную полость.

Для хирургического комфорта использовались нити-держалки, которые значительно упрощали манипуляции с тонкой кишкой. Нити-держалки накладывались на расширенный участок тонкой кишки путём прошивания серозной и мышечной оболочек кишки через каждые 2-3 см с двух сторон, посередине между мезентериальной и антимезентериальными сторонами кишки. При помощи этих нитей-держалок создавалось необходимое натяжение тканей, позволяющее манипулировать кишкой (Рисунок 5).

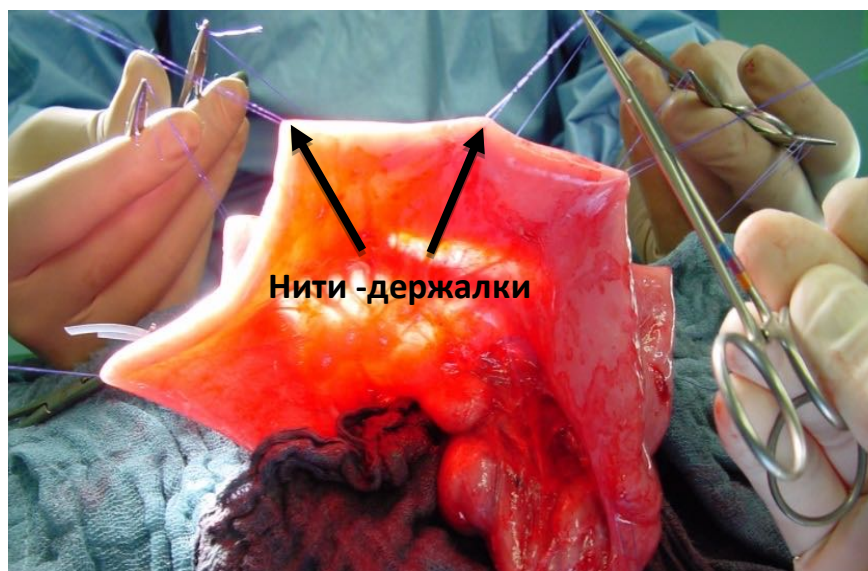


Рисунок 5 – Наложение нитей-держалок на расширенный участок тонкой кишки при выполнении операции LILT.

На поперечном срезе у основания тонкой кишки идентифицировался брыжеечный треугольник, в котором брыжеечные сосуды идут параллельно брыжеечным листкам и огибают тонкую кишку справа и слева. В этом месте ткани разъединялись тупым методом при помощи зажима или ножниц, аккуратно разделяя мезентериальные сосуды на левый и правый пучки, в соответствии с их принадлежностью к левому или правому мезентериальному листку, тем самым формировался мезентериальный туннель. Туннель должен быть достаточно просторным (большим), чтобы в него проходил линейный эндоскопический степлер. Нами использовался линейный эндоскопический степлер, так как он имеет меньшие размеры браншей, что больше подходит для проведения операций у детей. Тонкая бранша степлера помещалась в созданный мезентериальный туннель, более толстая бранша степлера размещалась на антимезентериальной стороне тонкой кишки вдоль её оси ровно посередине (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Разделение дилатированного участка тонкой кишки при помощи степлера на 2 кишечные трубки при выполнении операции LILT.

Далее степлер закрывался, разделяя расширенный участок тонкой кишки на две новые равные кишечные трубки. Данный этап операции повторялся несколько раз, пока весь расширенный участок тонкой кишки не был разделён.

У 17 из 36 пациентов с 1996 по 2007 годы тонкая кишка разделялась на две трубки без использования степлера, а с помощью хирургических ножниц, электрическим ножом или биполярными ножницами.

Две сформированные кишечные трубки антиперистальтически анастомозировались друг с другом и с остальными участками кишечника при помощи кишечного анастомоза по методике Herzog. Так как две образованные кишечные трубки находились на одной брыжейке, то для создания соединения друг с другом и анастомозирования, сформированные кишечные трубки закручивались спиралью (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Две закрученные в спираль и анастомозированные кишечные трубки, сформированные de novo при выполнении операции LILT.

В результате этой операции расширенный участок тонкой кишки ушивался до половины первоначального диаметра, а его длина увеличивалась в два раза. Важным во время этой операции является включение всех кишечных сегментов в кишечный тракт для того, чтобы предельно увеличить всасывающую поверхность кишечника.

Сразу же по окончании операции на операционном столе всем пациентам устанавливается перидуральный катетер для проведения анальгезии и быстрого восстановления моторики кишечника в послеоперационном периоде. После операции пациент переводится в отделение интенсивной терапии.

#### Метод последовательной поперечной энтероластики (serial transverse enteroplasty (STEP))

При использовании данного метода расширенный участок тонкой кишки разрезался степлером на  $1/2-2/3$  диаметра кишки поперечно. Тем самым, создавая более длинный и узкий зигзагообразный канал. В результате устранялась дилатация, обеспечивался лучший контакт между слизистой и кишечным содержимым поверхности кишки, тем самым предотвращалась потеря жидкостей, электролитов и питательных веществ.

Операция выполнялась под интубационным наркозом. Пациент располагался на операционном столе на спине. После обработки операционного поля производилась срединная продольная лапаротомия. После освобождения тонкой кишки от спаек измерялась её длина и диаметр. Затем на расширенный участок тонкой кишки, перпендикулярно её оси, последовательно, с противоположных сторон, накладывался линейный степлер (Рисунок 8).

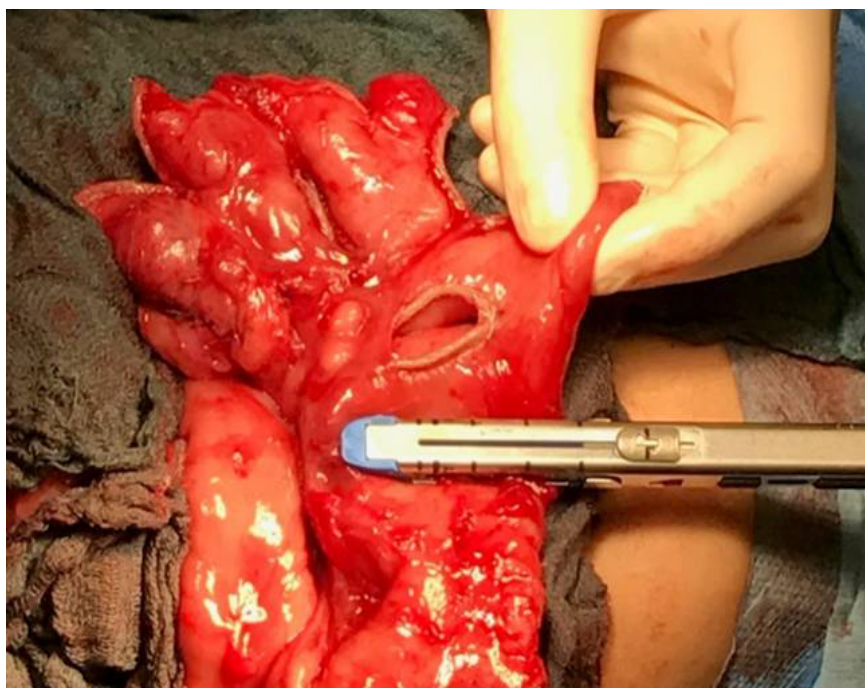


Рисунок 8 – Наложение линейного степлера на расширенном участке тонкой кишки перпендикулярно оси кишки с противоположных сторон и формирование тем самым зигзагообразной кишечной трубки операции STEP.

Расстояние между шагами степлера составляло более 2 см, в зависимости от диаметра кишки. Количество создаваемых анастомозов зависело от длины оставшейся тонкой кишки и степени ее дилатации. Среднее количество анастомозов составило 10 (6-25).

#### 2.2.6 Исследование тонкокишечных биоптатов пациентов с синдромом короткой кишки

Все биоптаты подвергались окрашиванию гематоксилином и эозином на аппарате для покраски гистологических препаратов Leica AutoSTAINAER XL (Leica, Германия) с последующим изучением морфологии мышечных слоёв тонкой кишки методом световой микроскопии.

Для выявления стволовых клеток и нейронов использовалось иммунофлуоресцентное окрашивание, позволяющее детально изучить межмышечное нервное сплетение и определить долю этих клеток в нервном сплетении. Для микроскопирования этих препаратов применяли флуоресцентный

микроскоп. Учитывая нестойкость красителей при данном виде окрашивания, такие препараты хранили в тёмном боксе при температуре +4°C и микроскопировали как можно быстрее.

Иммунофлюоресцентное окрашивание проводилось в соответствии с разработанным протоколом для параллельного двойного окрашивания антителами к нестину – для выявления стволовых клеток и антителами к PGP 9.5 – для маркировки нервных клеток.

Описание методики. Препараты были обезвожены при помощи их последовательного погружения в 70% этанол, потом 80% этанол, потом 90% этанол, потом дважды в 100% этанол, потом трижды в ксилол. Каждое погружение длилось 30 секунд. Демаскирование антигенов проводилось цитратным буфером (Sigma-Aldrich) в термостате при 95°C в течение одного часа; неспецифическое окрашивание блокировали с помощью 10% нормальной козьей сыворотки (Normal Goat Serum (NGS); DAKO). Далее препараты инкубировали с первичными антителами к нестину (mouse-anti-nestin antibody, Chemicon Int) и PGP 9.5 (rabbit-anti-nestin antibody, Chemicon Int) в разведении 1:200 в TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO) в течение ночи при температуре +4°C. Затем препараты инкубировали со вторым антителом, который был маркирован для нестина флюорохромом с длиной волны 488 нм (Alexa Flour® goat-anti-mouse 488 (Thermo Fisher Scientific)) в разведении и для PGP 9.5 флюорохромом с длиной волны 546 нм (Alexa Flour® goat-anti-rabbit 546 (Thermo Fisher Scientific)) 1:500 в TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20 (DAKO) в течение одного часа при комнатной температуре. Следующим этапом проводили окрашивание ядер клеток при помощи 6-диамино-2-фенилиндолоа (DAPI, Invitrogen) в разведении 1:1000 в натрий-фосфатном буфере (Phosphate-buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich) в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее на препараты наносили 100 мкл Fluorescent Mounting Medium (Sigma-Aldrich) и накрывали их покровным стеклом. Для того, чтобы исключить возможность ложноположительного окрашивания, иммуногистохимическую и иммунофлюоресцентную окраску всегда сопровождали окраской и анализом



контрольных образцов, в которых вместо первого антитела использовался натрий-фосфатный буфер (Phosphate-buffered saline (PBS), Sigma-Aldrich).

Для морфометрического и флюоресцентного анализа использовали инвертированный световой и фазово-контрастный микроскоп Olympus IX 70 (Olympus) с камерой и программным обеспечением AnalySIS (Olympus), а также флюоресцентный микроскоп (Keyence BM9000X) с функцией фотографической документации и со встроенным программным обеспечением для анализа полученных фотографий.

## 2.3 Материалы и методы второго экспериментального исследования

### 2.3.1 Культивирование межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе как ключевого элемента для тканевой инженерии тонкой кишки

В эксперименте использовались новорожденные крысы (Sprague-Dawley) в возрасте от 5 до 8 дней. Животных гильотинировали, затем проводили лапаротомию и изымали кишечник (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Изъятие кишечника у крысы в возрасте 6 дней.

Кишечник помещали в стерильную одноразовую чашку Петри (диаметр 60, высота 15 мм), заполненную средой МЕМ (Minimum Essential Media) с добавками антибиотиков. В 50 мл среды МЕМ добавляли 25 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл) и 50 мкл раствора метронидазола (5 мг/мл).

Под микроскопом с увеличением в 10-20 раз при помощи микропинцетов и микроножниц отделяли мышечный слой тонкой кишки от слизистого слоя (Рисунок 10).

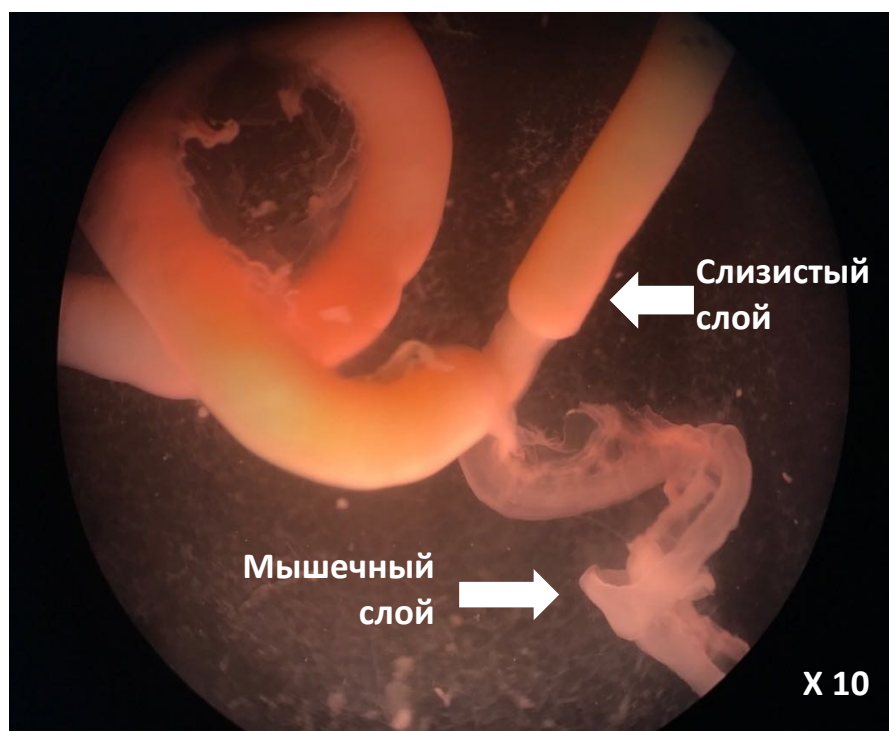


Рисунок 10 – Тонкая кишка крысы под микроскопом. Процесс отделения мышечного слоя кишки от слизистого слоя. Световая микроскопия, увеличение 10х.

Выделенный мышечный слой помещали в пробирку, содержащую 100 мкл раствора коллагеназы (10 мг/мл) и 10 мкл дезоксирибонуклеазы (10 мг/мл) в 900 мкл Hank's Balanced Salt Solution и инкубировали в инкубаторе при температуре 37 С и 5% концентрации углекислого газа в течение 2 ч.

После этого раствор с расщеплённым мышечным слоем выливали в чашку Петри, заполненную средой MEM с добавками антибиотиков, в описанных выше концентрациях. В результате в полученном растворе мышечная ткань кишечника полностью расщеплялась в то время, как участки межмышечного нервного сплетения оставались неповрежденными и под микроскопом выглядели в виде сети (Рисунок 11). Для проведения эксперимента использовали клетки нервной системы кишечника крыс, полученные по методике, описанной Schäfer с соавторами [83]. В качестве трёхмерного матрикса использовали гидрогель на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO – A Division of BioTime, USA).

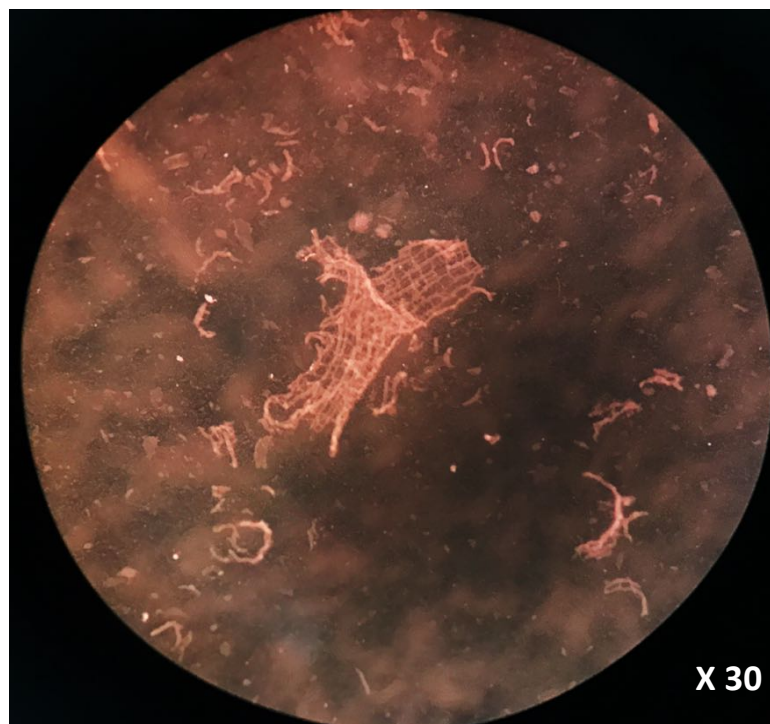


Рисунок 11 – Сеть межмышечного сплетения нервной системы кишечника после инкубации в растворе коллагеназы и дезоксирибонуклеазы. Световая микроскопия, увеличение 30х.

Эти участки межмышечного нервного сплетения собирали под световым микроскопом (ув. x20-30) при помощи пипетки объемом 100 мкл и помещали в пробирку объемом 1,5 мл.

Собранные сети межмышечного нервного сплетения центрифугировали при 1000g при температуре 20°C в течение 5 мин. В результате центрифугирования обрывки сети нервной системы кишечника оседали на дно пробирки. Раствор из пробирки удаляли при помощи пипетки объемом 1 мл. В пробирку добавляли 1 мл 0,25% раствора Trypsin-EDTA (трипсин с этилендиаминтетрауксусной кислотой). Далее пробирку ставили в инкубатор на 1 мин при 37°C. Затем её снова центрифугировали при 1000g при температуре 20°C в течение 5 мин. Супернатант из пробирки убирал пипеткой объёмом 1 мл. В пробирке оставался осадок, после чего в нее добавляли 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, USA) и перемешивали. Полученную смесь несколько раз пропускали через тонкую иголку для получения гомогенного раствора. Таким образом, получали

суспензию нервных клеток. Раствор (10 мкл) помещали в камеру Горяева для подсчета количества клеток (Рисунок 12).

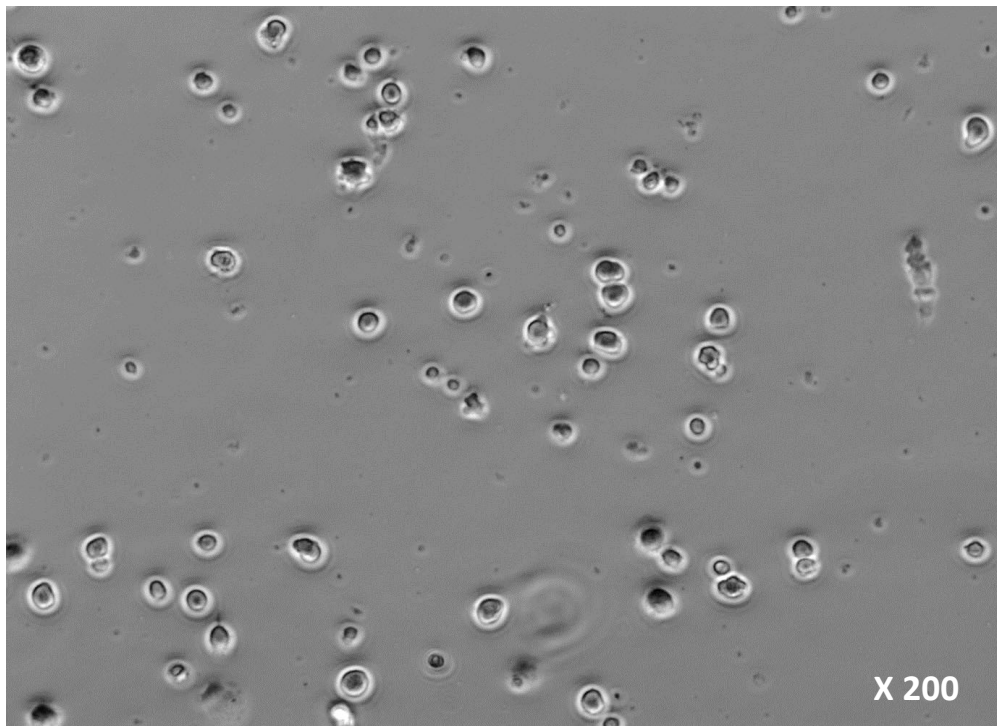


Рисунок 12 – Клетки после выделения из межмышечных нервных сплетений крыс, до помещения их в культуральную среду. Световая микроскопия, увеличение 200х.

На следующем этапе формировали трёхмерный матрикс. Для его получения использовали гель на основе гиалуроновой кислоты с добавлением коллагена HyStem®-C (ESI BIO – A Division of BioTime, Inc., USA). В набор HyStem®-C входят 4 компонента: Glycosil, Gelin-S, Extralink и DG-вода. Каждый из компонентов находился в отдельном флаконе и хранился при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Glycosil, Gelin-S, Extralink представляют собой порошок, DG-вода – дистиллированная вода. Перед применением флаконы согревали до комнатной температуры. Затем во флаконы, содержащие порошок Glycosil и Gelin-S, вносили по 1 мл DG- воды для получения раствора. Флаконы аккуратно перемешивали без резких движений, чтобы избежать появления пузырьков. Порошок, содержащийся во флаконах, постепенно растворялся в течение 30-40 мин с последующим получением прозрачного и несколько вязкого раствора. Далее во флакон,

содержащий порошок Extralink, добавляли 0,5 мл DG-воды и через 1 мин получали прозрачный раствор.

На следующем этапе нервные клетки инкапсулировали в матрикс. Растворы Glycosil и Gelin-S перемешивали путём пипетирования в соотношении один к одному. Затем к раствору Glycosil+Gelin-S добавляли нервные клетки, полученные в ходе первого этапа эксперимента и вновь перемешивали смесь пипетированием. Для создания матрикса в полученную смесь добавляли Extralink и раствор Glycosil+Gelin-S+нервные клетки в соотношении 1:4, вновь перемешивали пипетированием.

Для выращивания культур клеток использовались специальные 24 луночных планшета со вставками (BRAND GMBH, Германия), которые располагались внутри лунки таким образом, что вставка касалась только краёв лунки, остальная ее часть была погружена в культуральную среду, которая окружала лунку со всех сторон (Рисунок 13). Преимуществом использования планшетов со вставками является то, что дно вставки состоит из мембраны с порами диаметром 0,4 мкм, проницаемой для клеточной среды. Кроме того, в стенках вставки имеются отверстия, через которые культуральная среда также контактирует с содержимым вставки. В нашем случае это матрикс с погружёнными в него клетками.

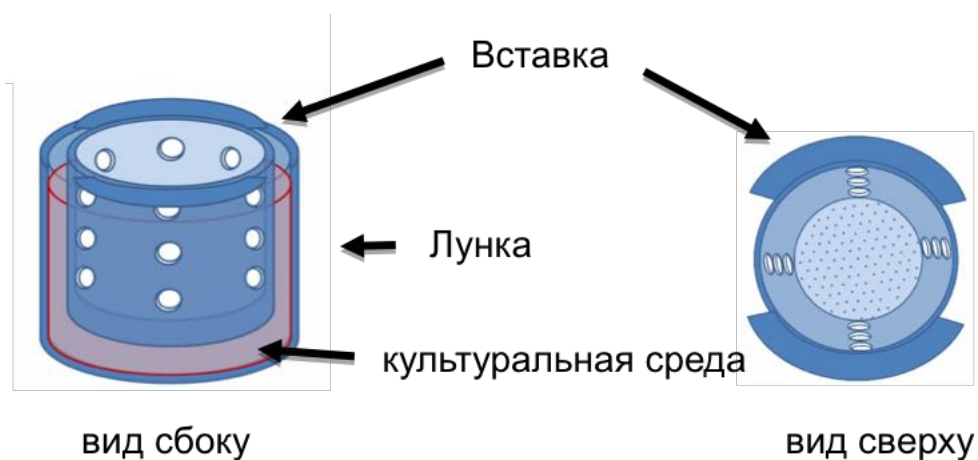


Рисунок 13 – Схема вставки для лунки луночного планшета (BRAND GMBH, Германия).

200 мкл матрикса пипетировали во вставки для 24 луночных планшетов. Вставки помещали в эти планшеты (BRAND GMBH, Германия). Матрикс затвердевал в течение 30 мин.

Далее в каждую лунку добавляли 1,5 мл культуральной среды для нейрокультур. Культуральная среда изготавливалась следующим образом: в 100 мл Neurobasal medium (Gibco) добавляли 1 мл альбумина (Sigma-Aldrich), 100 мкл раствора метронидазола (5мг/1мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глутамина (Sigma-Aldrich) и 100 мкл меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 2 мл B27 Supplement (Gibco), 100 мкл GD-NF (glial cell linederived neurotrophic factor) (1 нг/мл), 100 мкл EGF (epidermal growth factor) (1 нг/мл) и 200 мкл bFGF (fibroblast growth factor-basic) (1 нг/мл).

Полученную культуру помещали в инкубатор HERAcell® (Kendro Laboratory Products) и выращивали в течение 10-21 суток при температуре 37°C и 5% концентрации CO<sub>2</sub>. Смена культуральной среды производилась каждые 48 часов.

Живые культуры клеток исследовали при помощи световой и фазово-контрастной микроскопии на инверсионном микроскопе Olympus IX 70 при увеличениях 40х, 100х, 200х.

Через 10-21 суток культуры клеток фиксировали добавлением в каждую лунку 1,5 мл 4% раствора формалина. Через 10 мин раствор формалина отсасывали пипеткой и в каждую лунку добавлялся натрий-фосфатный буфер в количестве 1,5 мл.

### 2.3.2 Создание иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям для тканевой инженерии кишечника

Для проведения эксперимента использовали два типа клеток:

- клетки энтеральной нервной системы, выделенные из крыс рода Sprague–Dawley, полученные по методике, разработанной Schäfer с соавторами [85] и описанной нами выше;

- кишечные гладкомышечные клетки крыс (Sprague–Dawley), приобретенные в Pclo Biotech (Германия).

В качестве трёхмерного матрикса использовался гидрогель на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO – A Division of BioTime, USA).

Для выращивания культур клеток использовались 24 луночные планшета со вставками (BRAND GMBH, Германия) (Рисунок 8).

Культуру клеток помещали в инкубатор HERAccl® (Kendro Laboratory Products) и выращивали в течение 10-21 дней при температуре 37°C. Смена культуральной среды производилась каждые 48 часов.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания нервных клеток применяли прямой иммуногистохимический метод при помощи антитела anti-β III Tubulin, конъюгированного с флюорохромом Alexa Flour 488 (Merck Millipore). Anti-β III Tubulin — это антитело для специфичного окрашивания нейронов. Для иммунофлюоресцентного окрашивания мышечных клеток применяли непрямой иммуногистохимический метод при помощи антител к anti-Smooth Muscle Actin (SMA) (DAKO) и меченные Alexa Flour 546 (Thermo Fisher Scientific) антитела. Для идентификации ядер клеток использовался антрахиноновый краситель с высоким сродством к двухцепочечной ДНК – DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific). DRAQ5 работает при возбуждающем свете с длиной волны 488-647 нм. Эмиссия DRAQ5 длиной волны 633- 710 нм. Выбор anti-β III Tubulin конъюгированного с Alexa Flour 488, SMA- Alexa Flour 546 и DRAQ5 был основан на том, что в использованном нами лазерном конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica, Германия) для возбуждения флюорохромов использовали лазеры длиной волны 488 нм (для Alexa Flour 488), 546 нм (для Alexa Flour 546) и 638 нм (для DRAQ5).

Методика прямого иммунофлюоресцентного окрашивания. Окрашивание начинали с пермеабиллизации клеток 0,5% Triton-X100 в течение 45 мин, потом матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, далее матрикс инкубировали в течение 1 ч с 10% Normal Goat Serum (DAKO) при комнатной температуре. С этого момента все манипуляции выполняли в затемненных условиях. Матрикс с клетками инкубировали в 200 мкл раствора



антител anti- $\beta$  III Tubulin Conjugate Alexa Flour 488 (Merck Millipore) с TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (DAKO) в разведении 1:500 при температуре 4°C в течение ночи.

Методика непрямого иммунофлюоресцентного окрашивания. Окрашивание начинали с пермеабиллизации клеток 0,5% Triton-X100 в течение 45 мин, потом матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, далее матрикс инкубировали в течение 1 ч с 10% Normal Goat Serum (DAKO) при комнатной температуре. Матрикс с клетками инкубировали в 200 мкл раствора антител anti-Smooth Muscle Actin (SMA) (DAKO) с TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (DAKO) в разведении 1:200 при температуре 4°C в течение ночи. С этого момента все манипуляции выполняли в затемненных условиях. На следующий день матрикс с клетками инкубировали в 200 мкл раствора антител Alexa Flour 546 (Thermo Fisher Scientific) с TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (DAKO) в разведении 1:500 при температуре 20°C в течение часа.

Матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин. На следующем этапе матрикс с клетками инкубировали с раствором DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) с натрий-фосфатным буфером в разведении 1:1000 в течение 20 мин. Далее матрикс с клетками промывали трижды в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, потом быстро промывали в дистиллированной воде, помещали на предметное стекло, и покрывали тонким слоем Fluorescence Mounting Medium. Пространство вокруг матрикса заливали толстым слоем Fluorescence Mounting Medium и покрывали покровным стеклом.

Для проведения электронной микроскопии препараты фиксировали 2% глутаровым альдегидом и обрабатывали 1% OsO<sub>4</sub>. После дегидратации образцы помещали в смолу Epon (SERVA, Prod. No. 29452.01 (Германия)).

Для морфометрического и флюоресцентного анализа использовали инвертированный световой и фазово-контрастный микроскоп Olympus IX 70 с камерой и программным обеспечением AnalySIS (Olympus), а также флюоресцентный микроскоп (Keyence VM9000X) с функцией фотографической документации и со встроенным программным обеспечением для анализа

полученных фотографий. Конфокальную микроскопию проводили на микроскопе Leica TCS SP8 (Leica). Просвечивающая электронная микроскопия осуществлялась на электронном микроскопе Zeiss EM 10 A (Carl Zeiss).

## 2.4 Статистический анализ

Статистический анализ производили при помощи программ Microsoft Excel (Версия 16.30) и JMP 13.0 (SAS). Нормальность распределения данных оценивали визуально по диаграммам распределения и при помощи и теста Шапиро-Вилка (Shapiro-Wilk test). При нормальном распределении данных описательную характеристику результатов проводили при помощи среднего и стандартного отклонения и записывали в тексте как:  $\mu$  (среднее)  $\pm$   $\sigma$  (стандартное отклонение). При сравнении таких данных использовался критерий Стюдента (t-test).

При ненормальном распределении показатели описывались при помощи медианы и 25-ого и 75-ого перцентилей и записывалось в тексте как: медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль). Сравнение таких данных производилось при помощи непараметрического критерия Уилкоксона (Wilcoxon 2-Sample Test), который также называется Манн-Уитни Тест (Mann-Whitney Test). Для оценки силы взаимосвязи между параметрами применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Для оценки отказа от парентерального питания использовался метод Каплана-Мейера. Для сравнения частоты явления в двух группах применялись точный тест Фишера – для анализа малых выборок и Тест  $\chi^2$  Пирсона - для анализа больших выборок.

Для сравнения частоты воздействия факторов риска (количественного описания тесноты связи между признаками) применялся параметр отношение шансов (OR, odds ratio).

Различия между исследуемыми параметрами считались достоверными, если значение  $p$  равнялось или было меньше 0,05 ( $*p < 0.05$ ).

### ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА КИШЕЧНОЙ АДАПТАЦИИ В МЫШЕЧНЫХ СЛОЯХ И МЕЖМЫШЕЧНЫХ НЕРВНЫХ СПЛЕТЕНИЯХ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ)

В первой экспериментальной части на крысах нами оценивались характер изменений мышечного слоя тонкой кишки и значение стволовых клеток в процессах кишечной адаптации. Для этого на начальном этапе измерялись диаметр и толщина продольного и циркулярного мышечных слоев.

Крысы с СКК в течение первой недели после операции потеряли 10-15% веса. К концу второй недели крысы набрали дооперационный вес. В послеоперационном периоде ни одна крыса не умерла.

#### 3.1 Анализ патоморфологических изменений мышечных слоёв тонкой кишки

У крыс с СКК диаметр тощей кишки составил  $7332,29 \pm 1237,1 \mu\text{m}$  и был достоверно ( $p < 0,0001$ ) больше (в 1,8 раза), чем в контрольной группе ( $4105,4 \pm 536,1 \mu\text{m}$ ), диаметр подвздошной -  $5846,62 \pm 931,8 \mu\text{m}$  также оказался достоверно ( $p = 0,0023$ ) больше (в 1,2 раза) контроля ( $4771,8 \pm 526,0 \mu\text{m}$ ) (Рисунок 14).

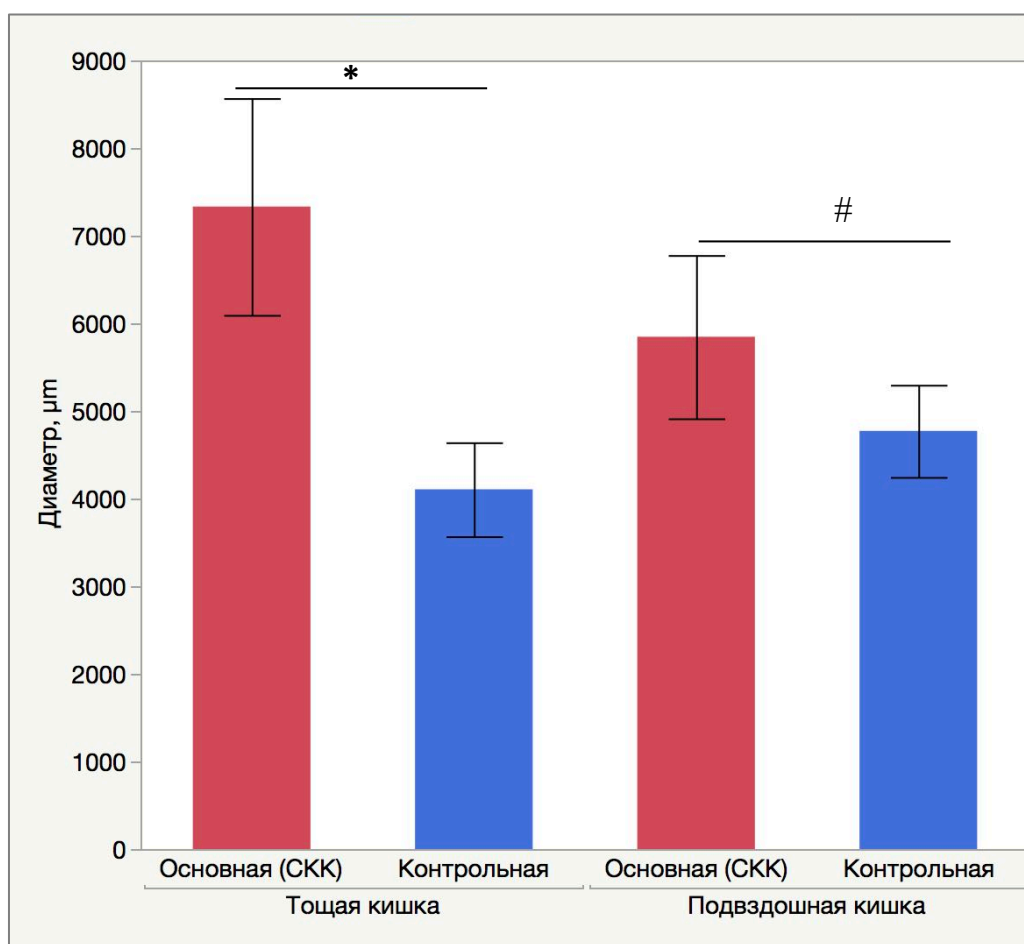


Рисунок 14 – Диаметр тощей и подвздошной кишки у крыс основной (СКК) группы и контрольной группы через 2 недели после резекции тонкой кишки. Значения: средняя и стандартное отклонение. Критерии Стьюдента: \*  $p < 0,0001$ , #  $p = 0,0023$ .

Наши данные подтвердили, что при СКК развивается выраженная дилатация тощей кишки и подвздошной кишки. Подвздошная кишка у крыс в основной (СКК) группе находилась дистальнее наложенного межкишечного анастомоза, в контрольной же группе целостность кишечника не нарушалась и кишечный анастомоз не накладывался. Несмотря на это, диаметр подвздошной кишки в основной группе был достоверно больше по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о том, что дилатация тонкой кишки при синдроме короткой кишки связана с кишечной адаптацией, а не с компенсаторным расширением тонкой кишки перед сформированным анастомозом.

При изучении продольного мышечного слоя тонкой кишки в группе с СКК было выявлено, что толщина продольного мышечного слоя тощей кишки в группе с СКК составила 27 (17;47)  $\mu\text{m}$ , что было 1,8 раза больше по сравнению с контрольной группой, где это значение составило 15 (10;22)  $\mu\text{m}$ , (Рисунок 15). Разница была статистически достоверной (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ) (Рисунок 16). Толщина продольного мышечного слоя подвздошной кишки составила в основной группе 20 (14;29)  $\mu\text{m}$ , в контрольной группе 20 (11;27)  $\mu\text{m}$ .

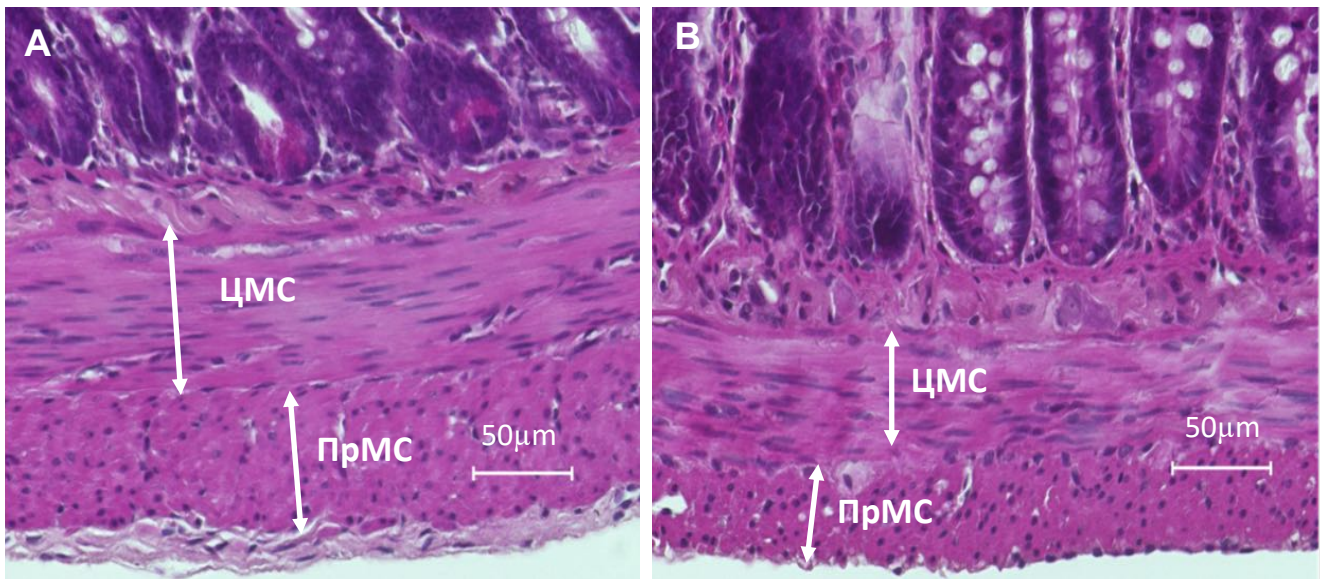


Рисунок 15 – Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. Толщина продольного и циркулярного слоёв тонкой кишки. А – группа с СКК, В- контрольная группа. ЦМС – циркулярный мышечный слой, ПрМС – продольный мышечный слой. Световая микроскопия.

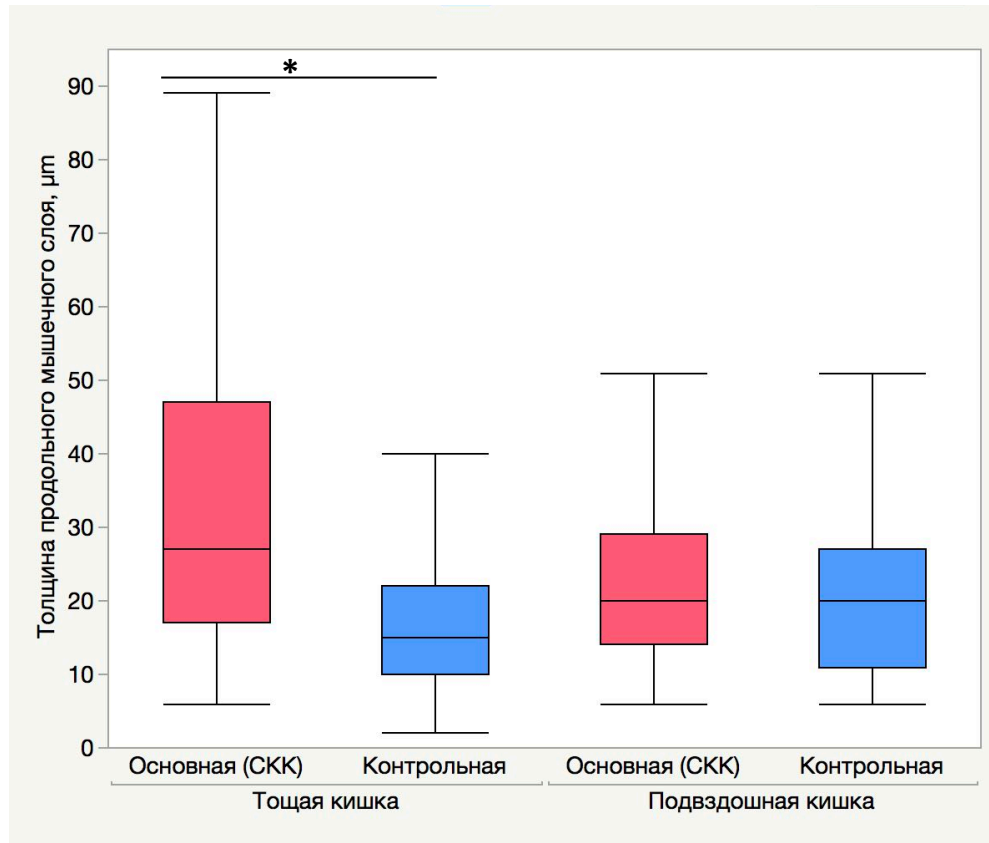


Рисунок 16 – Толщина продольного мышечного слоя в тощей кишке и подвздошной кишке в основной (СКК) и контрольной группах. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ .

Толщина циркулярного мышечного слоя тощей кишки в основной группе (СКК) составила 47 (23;90)  $\mu\text{m}$ , в контрольной группе составила – 22 (14,25;31,5)  $\mu\text{m}$ . Толщина циркулярного мышечного слоя подвздошной кишки в основной группе (СКК) была 30 (21;44)  $\mu\text{m}$ , в контрольной группе – 22 (16;35)  $\mu\text{m}$ . Толщина мышечного слоя в группе с СКК была достоверно больше по сравнению с контрольной группой, как в тощей кишке (в 2,1 раза) (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ), так и в подвздошной кишке (в 1,4 раза) (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ) (Рисунок 17). Следует отметить, что в тощей кишке гипертрофия мышечного слоя у крыс группы СКК была более выражена.

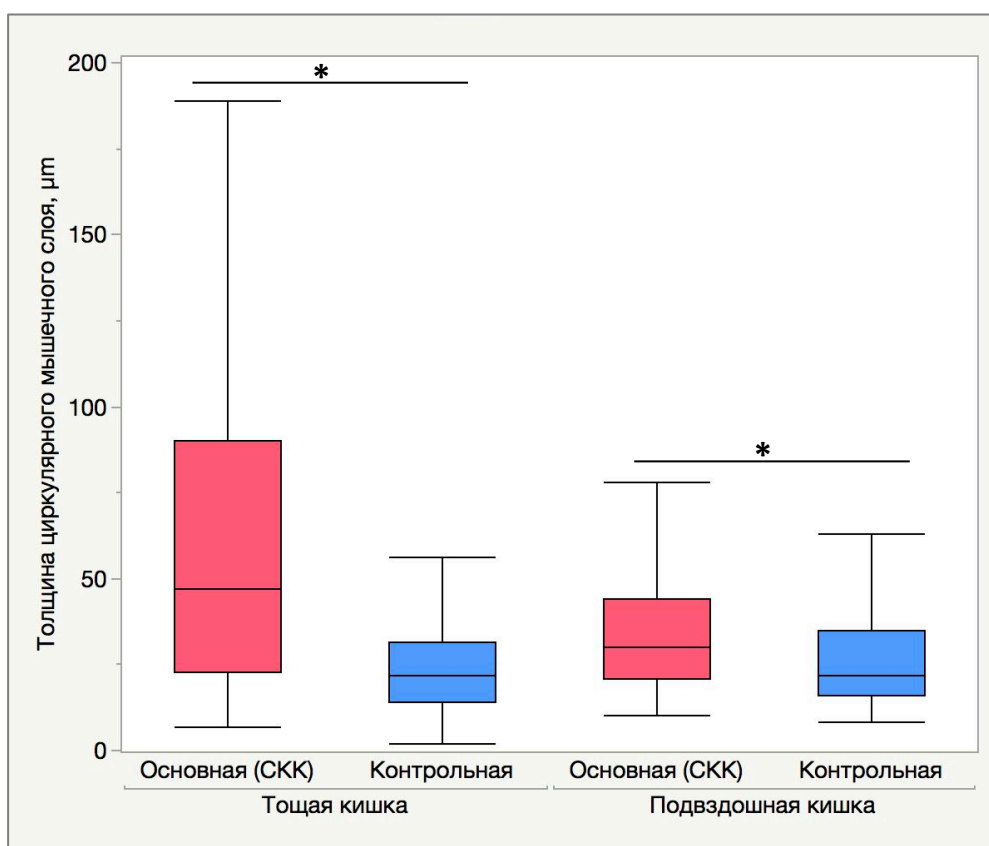


Рисунок 17 – Толщина циркулярного слоя тонкой кишки у крыс контрольной группы и группы с СКК. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ .

Соотношение между продольным и циркулярным мышечными слоями частей кишечника сравнивалось, чтобы показать, влияет ли гипертрофия мышечного слоя на оба мышечных слоя одинаково или в основном на один из них. Циркулярный мышечный слой тощей кишки в группе с СКК составил 61 (55; 66) % от общей толщины мышц, что достоверно больше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе, где слой круговых мышц занимал 58 (54; 63)%. Циркулярный мышечный слой подвздошной кишки в группе с СКК также составил 59 (53; 67) % от общей толщины мышц, что достоверно больше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе, где он составил 54 (48; 61) %.

Таким образом, гипертрофия мышечного слоя тонкой кишки происходила преимущественно за счёт циркулярного мышечного слоя.

Площадь мышечного слоя в поперечном срезе тонкой кишки рассчитывалась по формуле: площадь мышечного слоя =  $\pi$  x диаметр x толщина мышечного слоя. В группе с СКК этот показатель был достоверно больше по сравнению с контрольной группой как в тощей кишке ( $p < 0,0001$ ), так и в подвздошной кишке ( $p = 0,0056$ ). Так в группе СКК площадь мышечного слоя в тощей кишке составила 2221325 (1050679; 3725212)  $\mu\text{m}^2$  и в подвздошной кишке – 11161352 (843239; 1503000)  $\mu\text{m}^2$ . Тогда как площадь мышечного слоя в контрольной группе составила 466928 (370783; 587079)  $\mu\text{m}^2$  в тощей кишке и 703396 (502434; 1023298)  $\mu\text{m}^2$  в подвздошной кишке (Рисунок 18).

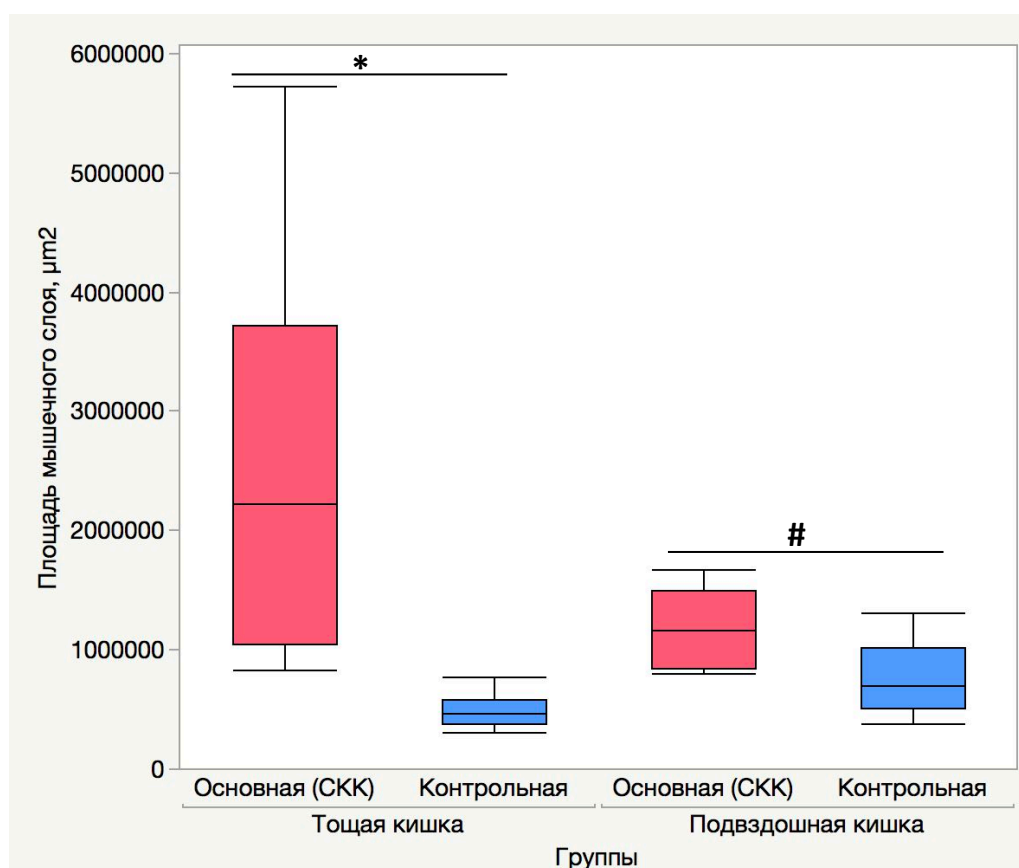


Рисунок 18 – Площадь мышечного слоя в поперечном срезе тонкой кишки у крыс основной (СКК) группы и контрольной группы. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ , #  $p = 0,0056$ .

Наши данные показали, что при СКК развивается выраженная дилатация тощей и подвздошной кишки. Гипертрофия мышечных слоёв значительно



увеличивает мышечную массу тонкой кишки, оставшуюся после резекции, и является следствием кишечной адаптации.

Нами показано, что дилатация тощей кишки и подвздошной кишки при синдроме короткой кишки не является атонической дилатацией с гипотрофией мышечного слоя, а, наоборот, сопровождается выраженной гипертрофией мышечных слоёв. Данный феномен значительно увеличивает мышечную массу оставшейся после резекции тонкой кишки и является следствием кишечной адаптации.

Выявленная нами взаимосвязь дилатации тонкой кишки с гипертрофией мышечного слоя тонкой кишки раскрывает еще один механизм кишечной адаптации при синдроме короткой кишки. Так наряду с описанными ранее проявлениями кишечной адаптации в слизистой тонкой кишки [298, 308], увеличение диаметра тонкой кишки позволяет квадратично увеличить площадь абсорбционной поверхности тонкой кишки. С другой стороны, увеличение диаметра тонкой кишки ухудшает эффективность перистальтики и затрудняет проталкивание кишечного содержимого по кишечнику. Кроме того, доказано снижение сократимости циркулярного слоя после резекции тонкой кишки [126]. В сложившихся условиях гипертрофия мышечных слоёв является ответной реакцией организма на увеличение диаметра тонкой кишки и на их сниженную сократимость, и предназначена для увеличения эффективности перистальтики тонкой кишки.

### 3.2 Исследование стволовых клеток (окрашенных антителами к нестину) в межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки

Окрашивание антителами к нестину с пероксидазой проводили для подсчёта количества межмышечных нервных сплетений, в которых имеются стволовые клетки (Рисунок 19).

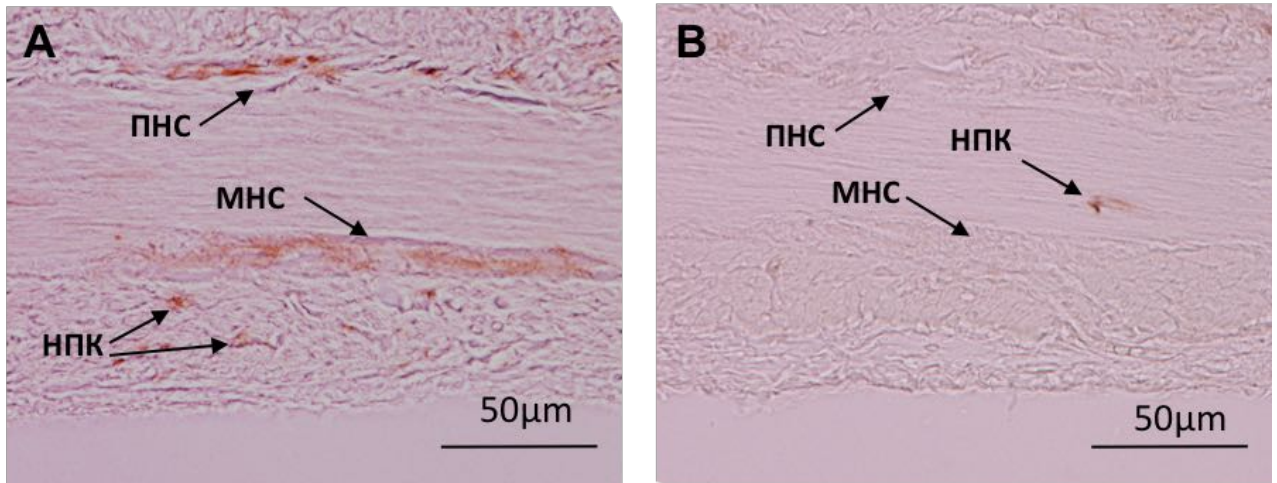


Рисунок 19 – Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. А – группа с СКК, В – контрольная группа. Окрашивание мышечного слоя тонкой кишки антителам к нестину (маркеру стволовых клеток) и визуализация при помощи пероксидазы: коричневым цветом отображается нестин. Стрелками отмечено: МНС – межмышечное нервное сплетение, ПНС – подслизистое нервное сплетение, НПК – нестин-положительные клетки (окрашенные нестином клетки в мышечных слоях). В группе с СКК межмышечное и подслизистое сплетения, а также несколько клеток в мышечном слое содержат нестин (стволовые клетки). Световая микроскопия.

Нами было установлено, что при СКК количество межмышечных сплетений, содержащих стволовые клетки, достоверно увеличивается, как в тощей ( $p < 0,0001$ ), так и в подвздошной кишке ( $p < 0,0001$ ). Так количество межмышечных сплетений, содержащих стволовые клетки, в тощей кишке у крыс в контрольной группе составило 0 (0;1) штук, у крыс с СКК - 8,5 (2;33,25) штук, в подвздошной кишке у крыс в контрольной группе – 0 (0;0,75) штук, у крыс с СКК 5,66 (1;9,25) штук (Рисунок 20).

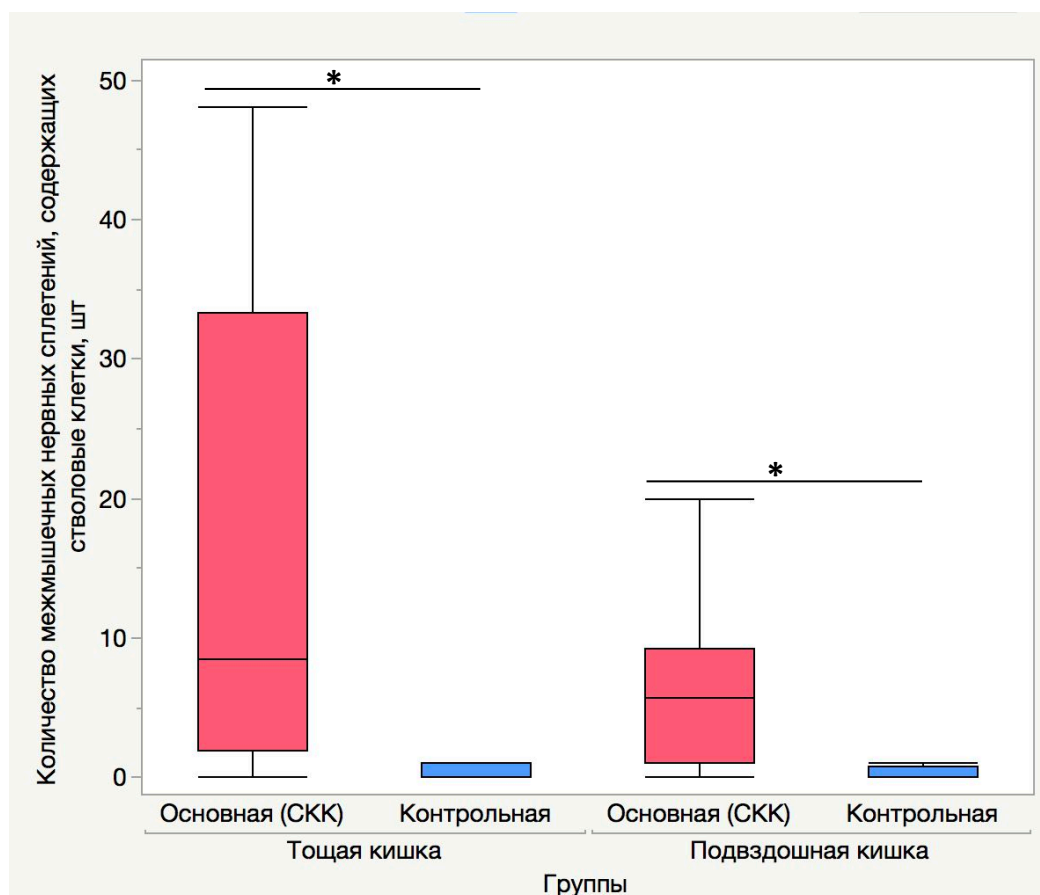


Рисунок 20 – Количество межмышечных сплетений, содержащих стволовые клетки (нестин-положительные сплетения) в тощей и подвздошной кишке. Сравнение группы СКК с контрольной группой показало статистически достоверное увеличение количества нестин-положительных сплетений в группе СКК. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ .

Вышеупомянутые результаты демонстрируют, что количество межмышечных нервных сплетений, содержащих стволовые клетки, увеличивается при СКК во всей тонкой кишке (тощей и подвздошной) по сравнению с контрольной группой.

Для детального изучения межмышечных ганглиев энтеральной нервной системы нами использовалось иммунофлюоресцентное окрашивание нестином, которое в отличие от окрашивания нестином с пероксидазой позволило оценить экспрессию стволовых клеток внутри межмышечного нервного сплетения при большем увеличении.

Иммунофлюоресцентное окрашивание нестином позволило измерить нестин-позитивные области в межмышечном нервном сплетении (Рисунок 21).

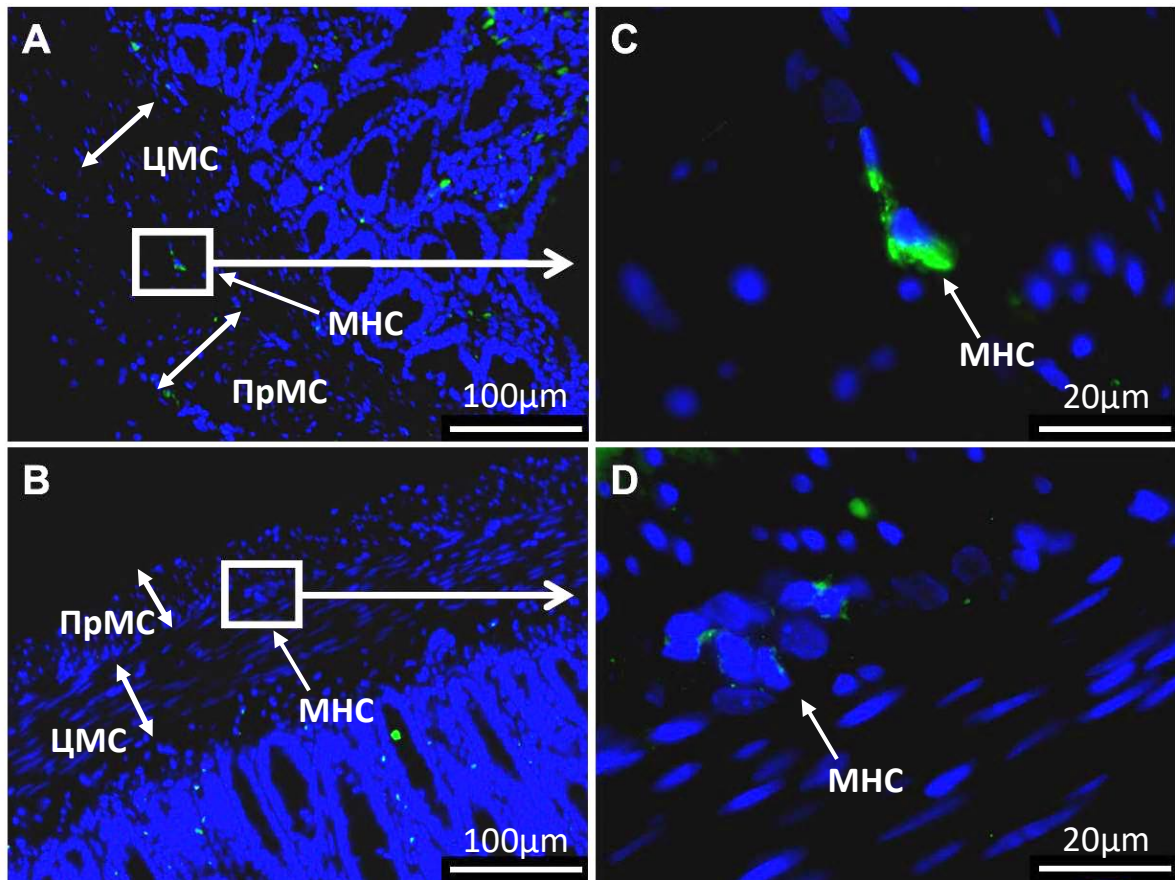


Рисунок 21 – Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. Иммунофлюоресцентное окрашивание нестином – маркером стволовых клеток (зеленый цвет) и клеточных ядер всех клеток DAPI (синий цвет). А и С – основная (СКК) группа в различном увеличении. В и D – контрольная группа в различном увеличении. МНС- межмышечное нервное сплетение, ЦМС – циркулярный мышечный слой, ПрМС – продольный мышечный слой. В группе СКК количество нестина в межмышечном сплетении значительно больше, чем в контрольной группе. Иммунофлюоресцентная микроскопия.

При СКК выявлено достоверное увеличение доли стволовых клеток внутри межмышечных нервных сплетений, как в тощей кишке ( $p=0,0125$ ), так и в подвздошной кишке ( $p<0,0001$ ). Так, у крыс контрольной группы доля межмышечного нервного сплетения, занятого стволовыми клетками (окрашенного нестином), в тощей кишке составила в среднем 1,37%

(0,42%;3,25%), в подвздошной кишке – 0,88% (0,31%;2,44%), а у крыс с СКК – 3,36% (1,2%;10,32%) и 5,51% (2,14%;8,17%), соответственно (Рисунок 22).

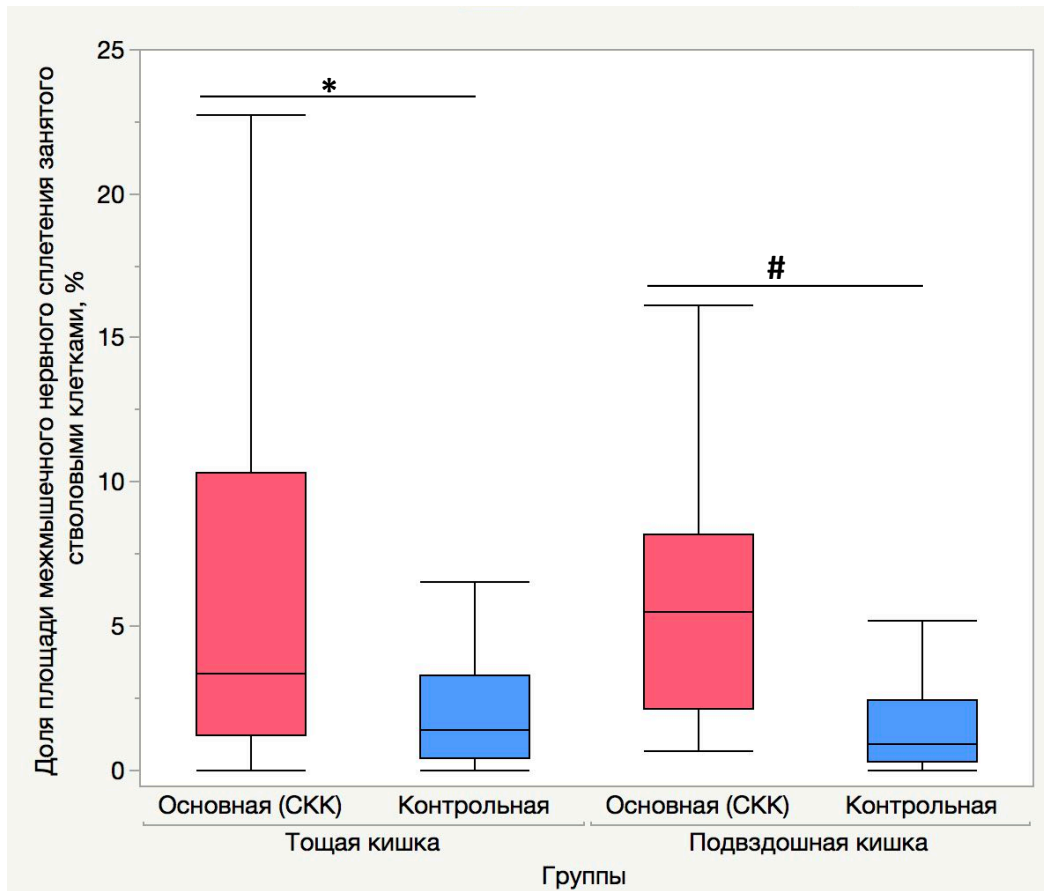


Рисунок 22 – Доля площади межмышечного нервного сплетения занятого стволовыми клетками (окрашенного нестином). Сравнение основной (СКК) группы и контрольной группы. В группе СКК достоверно больше окрашенных нестином областей. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p=0,0125$ ; #  $p<0,0001$ .

Результаты наших исследований показали увеличение количества стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях при синдроме короткой кишки. Значительное увеличение нервных стволовых клеток при синдроме короткой кишки продемонстрировало, что нервная система в кишечнике непосредственным образом участвует в кишечной адаптации при синдроме короткой кишки, а также указывает на большой регенеративный потенциал энтеральной нервной системы.

### 3.3 Исследование стволовых клеток (окрашенных антителами к нестину) в мышечных слоях тонкой кишки

Поперечные срезы тонкой кишки, окрашенные нестином и визуализированные пероксидазой, были проанализированы на наличие стволовых клеток внутри мышечных слоёв. Результаты оценивались как: 1) препараты с наличием в мышечном слое нестин-позитивных (стволовых) клеток; 2) препараты с отсутствием в мышечном слое нестин-позитивных (стволовых) клеток. В основной (СКК) группе нестин-позитивные (стволовые) клетки в мышечных слоях были обнаружены в 85,7% препаратов тощей кишки и в 64,3% препаратов подвздошной кишки, тогда как в контрольной группе лишь в 4,3% препаратов тощей кишки и 12,5% препаратов подвздошной кишки (Рисунок 23).

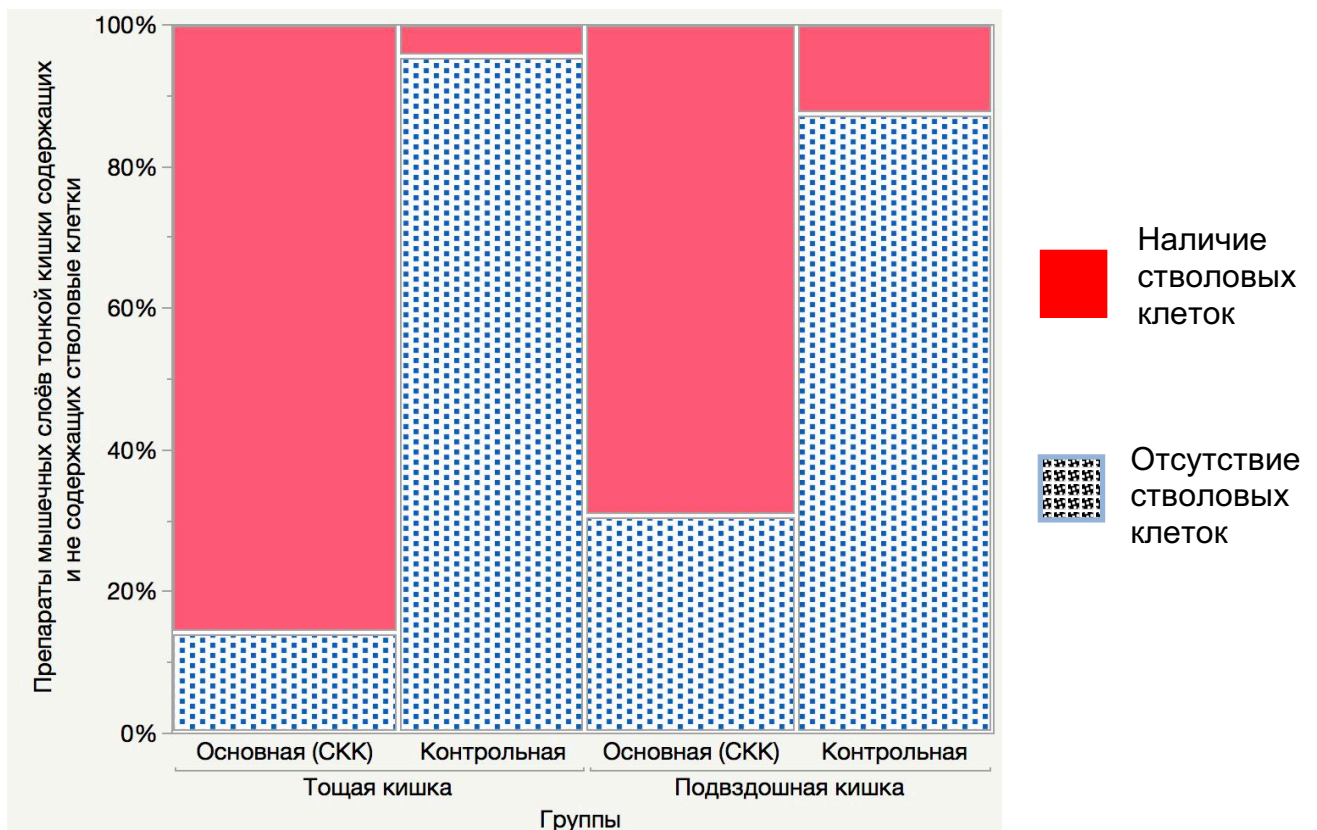


Рисунок 23 – Доля препаратов мышечных слоёв тонкой кишки, содержащих и не содержащих нестин-позитивные участки (стволовые клетки) в основной (СКК) группе и в контрольной группе. В группе СКК наблюдается достоверное увеличение содержащих нестин участков в мышечных слоях тощей кишки ( $p < 0,0001$ ) и подвздошной кишки ( $p < 0,0001$ ).

Статистический анализ показал, что количество препаратов содержащих стволовые клетки в мышечных слоях было достоверно выше в группе СКК, чем в контрольной группе (тощая кишка:  $p < 0,0001$ , подвздошная кишка:  $p < 0,0001$ ), что свидетельствует о том, что экспрессия стволовых клеток у крыс с СКК, по сравнению с контрольной группой достоверно увеличивается как в тощей, так и в подвздошной кишке.

В литературе описано, что экспрессия нестина обнаруживается в эндотелиальных клетках новообразованных кровеносных сосудов [249] и в миофибробластах [263], повышенное количество экспрессирующих нестин клеток в мышечном слое позволяет предположить, что и другие клетки-предшественники также стимулируются во время адаптации кишечника.

#### 3.4 Корреляция между толщиной мышечных слёв, долей стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и выраженностью экспрессии стволовых клеток в мышечных слоях стенки тонкой кишки

Площадь мышечной ткани в поперечном срезе тонкой кишки, является наиболее объективным показателем измерения мышечной ткани во время адаптации кишечника, так как учитывает, как диаметр кишечника, так и толщину мышечного слоя.

Выраженность экспрессии стволовых клеток в мышечных слоях исследовали под микроскопом и оценивали в коэффициентах от 0 до 2, где 0 – отсутствие стволовых клеток, 0,5 – наличие одной стволовой клетки в 2-х видимых полях, 1-наличие одной стволовой клетки в одном поле, 1,5 - наличие трёх стволовых клеток в двух видимых полях и 2 наличие двух стволовых клеток в одном видимом поле.

При анализе данных использовалась корреляция Спирмена (непараметрическая корреляция), так как распределение данных было ненормальным. Диаметр кишечника и толщина мышечного слоя показали положительную умеренную взаимосвязь ( $r = 0,5447$ ,  $p = 0,0001$ ). Площадь

мышечной ткани (гипертрофия мышечных слоёв) и доля занимаемая стволовыми (нестин-позитивными) клетками в межмышечном нервном сплетении показали сильную положительную связь ( $r=0,7524$ ,  $p<0,0001$ ). Площадь мышечной ткани и экспрессия стволовых (нестин-позитивных) клеток в мышечных слоях также показали сильную положительную связь ( $r=0,7597$ ,  $p<0,0001$ ). Корреляция между долей стволовых клеток в межмышечном нервном сплетении и экспрессией стволовых клеток в мышечных слоях показала очень сильную положительную взаимосвязь ( $r=0,8065$ ,  $p<0,0001$ ) (Рисунок 24).

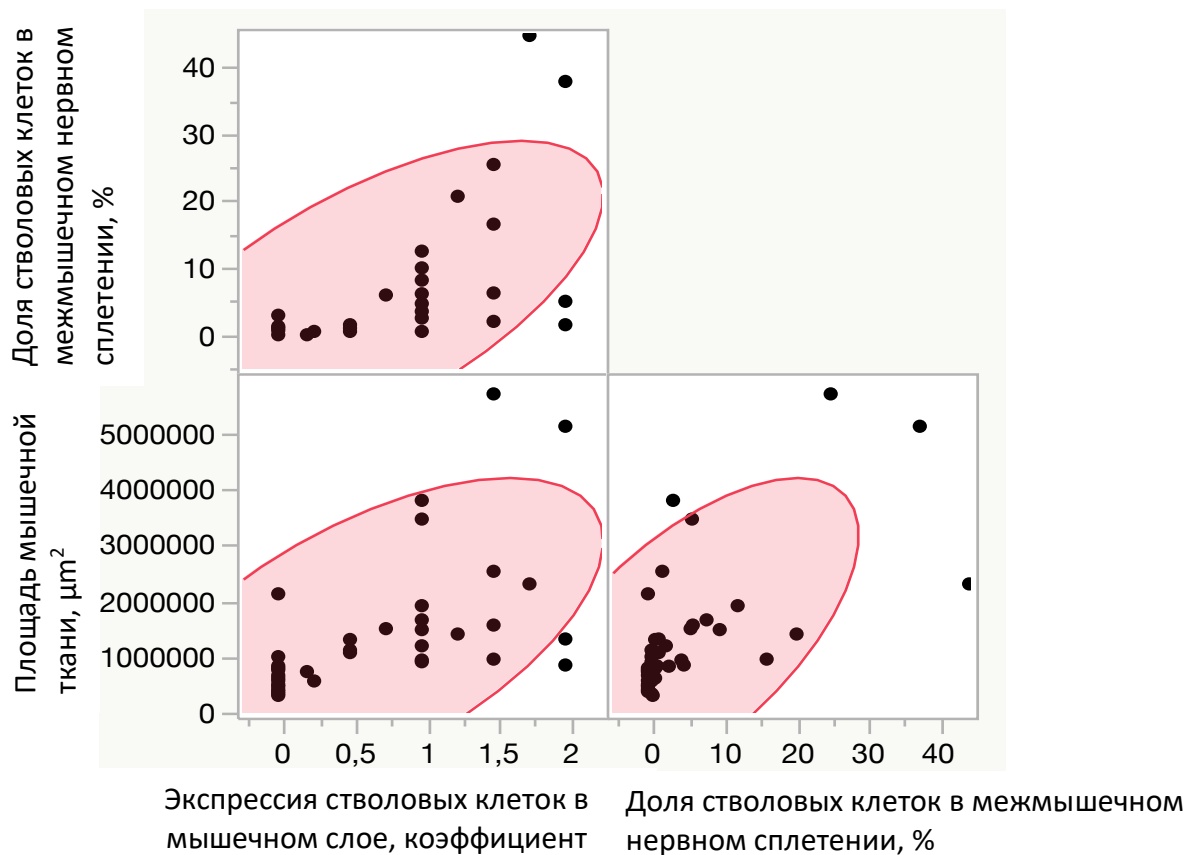


Рисунок 24 – Корреляция между площадью мышечного слоя, долей стволовых клеток в межмышечном нервном сплетении и экспрессией стволовых клеток в мышечных слоях. Корреляция Спирмена.

Наличие умеренной положительной корреляции между диаметром тонкой кишки и площадью мышечной ткани (гипертрофией мышечных слоёв) подтверждает, что увеличение диаметра происходит параллельно с гипертрофией мышечных слоёв, а не из-за механического растяжения тонкой кишки, так как в



случае растяжения тонкой кишки наблюдалась бы отрицательная взаимосвязь между диаметром тонкой кишки и толщиной мышечных слоёв. Это процесс необходимо расценивать как процесс адаптации кишечника с целью увеличения абсорбционной поверхности кишечника.

Гипертрофия гладких мышц демонстрирует сильную положительную корреляцию с количеством стволовых (нестин-позитивных) клеток, как в межмышечном нервном сплетении, так и в мышечных слоях. Данный результат свидетельствует об участии энтеральной нервной системы и мышечных слоёв кишечника, как единой системы, в процессе кишечной адаптации.

Таким образом, в мышечных слоях тонкой кишки и энтеральной нервной системе при СКК происходят значительные морфологические изменения. В мышечных слоях тонкой кишки это проявляется дилатацией тонкой кишки и гипертрофией мышечных слоёв. Нервная система в кишечнике активирует свой нейрогенный потенциал посредством нервных стволовых клеток и, тем самым, участвует в адаптации кишечника. Эти изменения являются результатом кишечной адаптации, патофизиологичны для СКК и, поэтому присущи всем пациентам с СКК.

Выраженная положительная корреляция между долей стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет рассматривать мышечные слои тонкой кишки и энтеральную нервную систему, как единый нервно-мышечный комплекс, активация одного элемента которого ведёт к активации другого элемента.

## ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ КИШЕЧНОЙ АДАПТАЦИИ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ КОРОТКОЙ КИШКИ

Одной из задач нашей работы была оценка степени вовлеченности мышечных слоёв и нервной системы кишечника в процессы кишечной адаптации и доказательство того, что дилатация тонкой кишки является патофизиологическим процессом при СКК, который позволяет применять удлиняющие кишечник операции. На первом этапе исследования нами проведено изучение компенсаторных возможностей организма на крысах с индуцированным СКК. В результате нами было установлено, что адаптационные изменения при СКК развиваются также и в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях тонкой кишки. Целью следующего этапа работы явилось выявление подобных компенсаторных механизмов у пациентов с СКК и изучение возможности экстраполяции данных, полученных в эксперименте на лабораторных животных и на пациентах с СКК. В связи с этим, нами проведено изучение биоптатов тонкой кишки больных с СКК, полученных в ходе удлиняющих и/или реконструктивных операций.

Для морфологической верификации межмышечных нервных сплетений и подбора наиболее подходящих участков биопсированной тонки кишки для иммуногистохимического окрашивания производилось окрашивание препаратов гематоксилином и эозином (Рисунок 25).

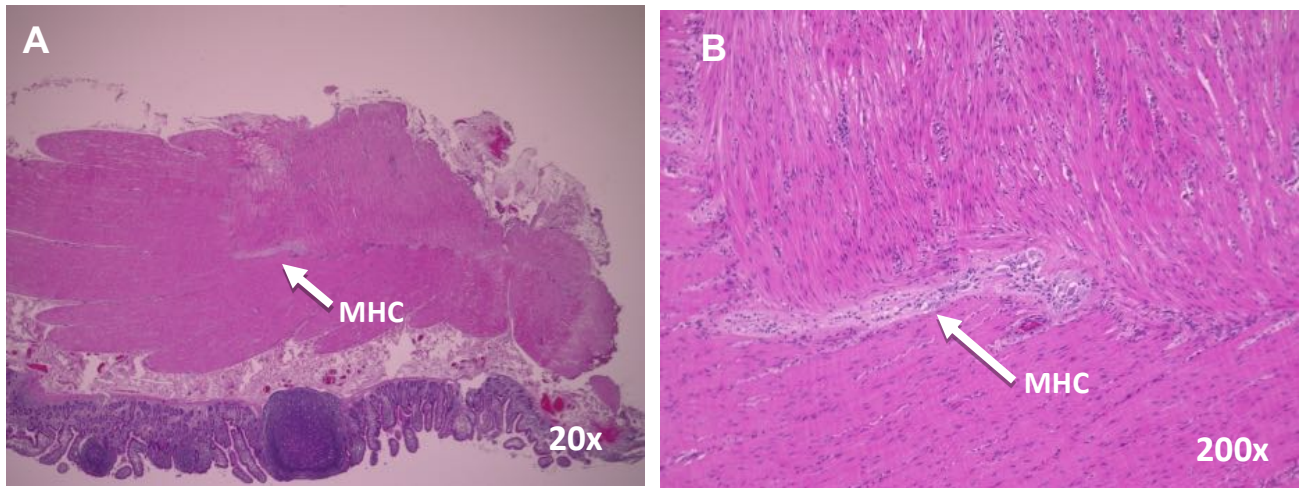


Рисунок 25 – Межмышечное нервное сплетение (Plexus myentericus) в биоптате тонкой кишки человека. Окрашивание гематоксилин и эозин. А – биоптат тонкой кишки, 20х, В – биоптат тонкой кишки, 200х. МНС – межмышечное нервное сплетение.

Проведённое на следующем этапе двойное иммуногистохимическое окрашивание нервных клеток (антитела к PGP 9.5) и стволовых клеток (антитела к Nestin) в межмышечном нервном сплетении позволило нам идентифицировать оба вида клеток в одном препарате, определить площадь, которую занимают нервные клетки и стволовые клетки в сплетениях и количественно определить пролиферацию стволовых клеток. Доказанная нами на модели крыс, выраженная положительная корреляция между количеством стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет нам, основываясь на данных об экспрессии стволовых клеток, оценить степень вовлеченности мышечных слоев в процесс кишечной адаптации.

На первом этапе анализа данных исследовались стволовые клетки в межмышечных нервных сплетениях (Рисунок 26 А), на втором этапе – нервные клетки межмышечных нервных сплетениях (Рисунок 26 В), на третьем этапе производился анализ двойного окрашивания (Рисунок 26 С), на четвёртом этапе при помощи встроенного программного обеспечения микроскопа Keyence VM9000X производилось картирование межмышечных нервных сплетений с определением доли нестин-положительных (стволовые клетки) и PGP 9.5-положительных (нервные клетки) областей (Рисунок 26 D).

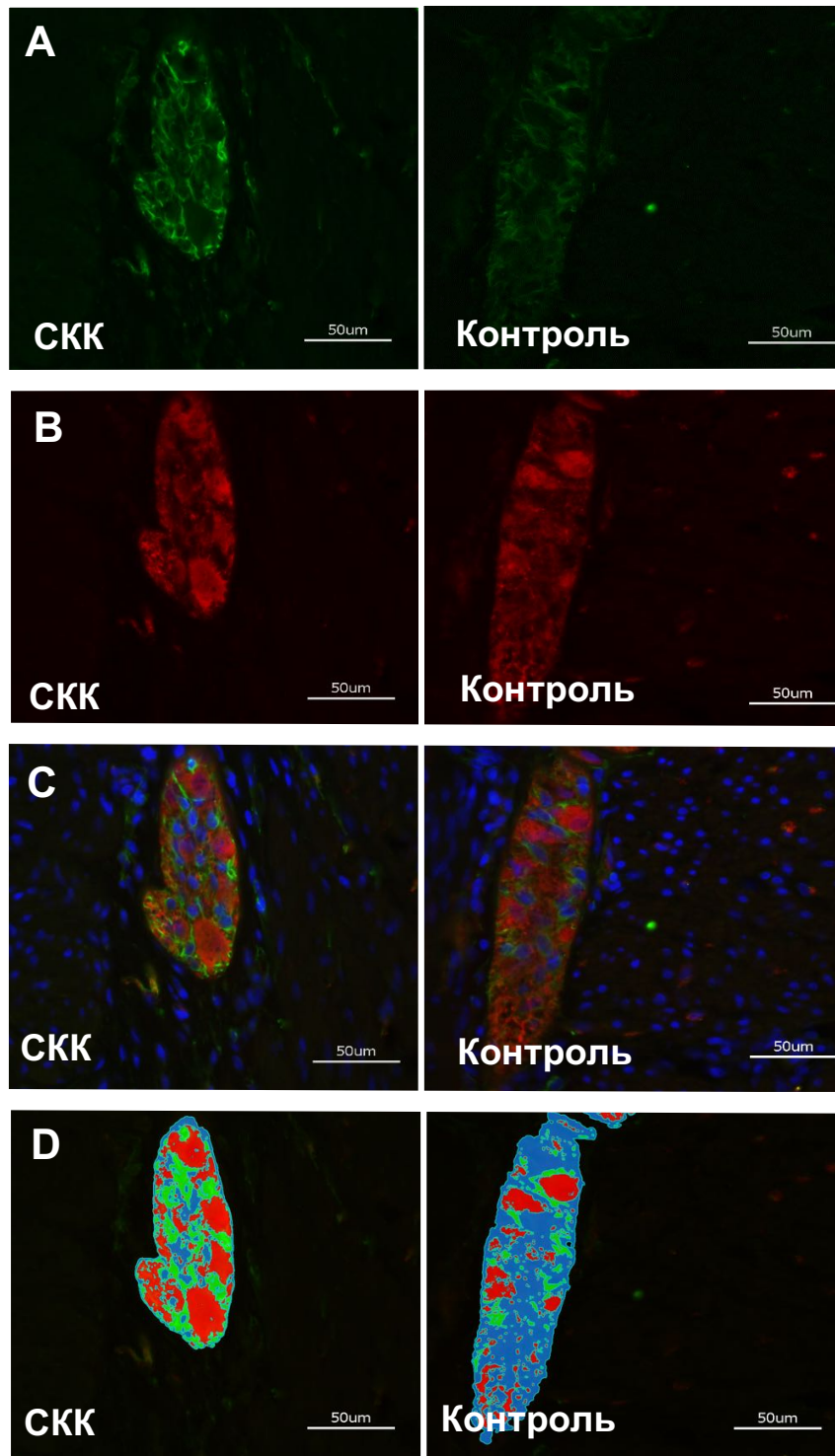


Рисунок 26 – Межмышечное нервное сплетение (Plexus myentericus) в биоптате тонкой кишки человека. Иммунофлюоресцентное окрашивание Стволовые клетки -Nestin (зелёный цвет), нейроны - PGP 9.5 (красный цвет), ядра клеток - DRAQ5 (синий цвет). А – исследование стволовых клеток, В – исследование нервных клеток, С – анализ двойного окрашивания (стволовые и нервные клетки), D – картирование межмышечных нервных сплетений (зелёный цвет – стволовые клетки, красный цвет – нейроны).

Проведенное картирование межмышечных нервных сплетений с определением доли стволовых клеток (нестин-положительных) и нервных клеток (PGP 9.5-положительных), показало, что экспрессия стволовых клеток у пациентов с СКК достоверно увеличивается (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ). Доля стволовых клеток у пациентов с СКК составила  $21,3 \pm 12,34\%$  (17% (11,5%;34,5%)) от общей площади межмышечного сплетения. У пациентов контрольной группы этот показатель составил  $6,8 \pm 3,98\%$  (7% (3%;8,5%)). Таким образом, у пациентов с СКК доля стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях превышает количество стволовых клеток в контрольной группе более чем в 2 раза (Рисунок 27).

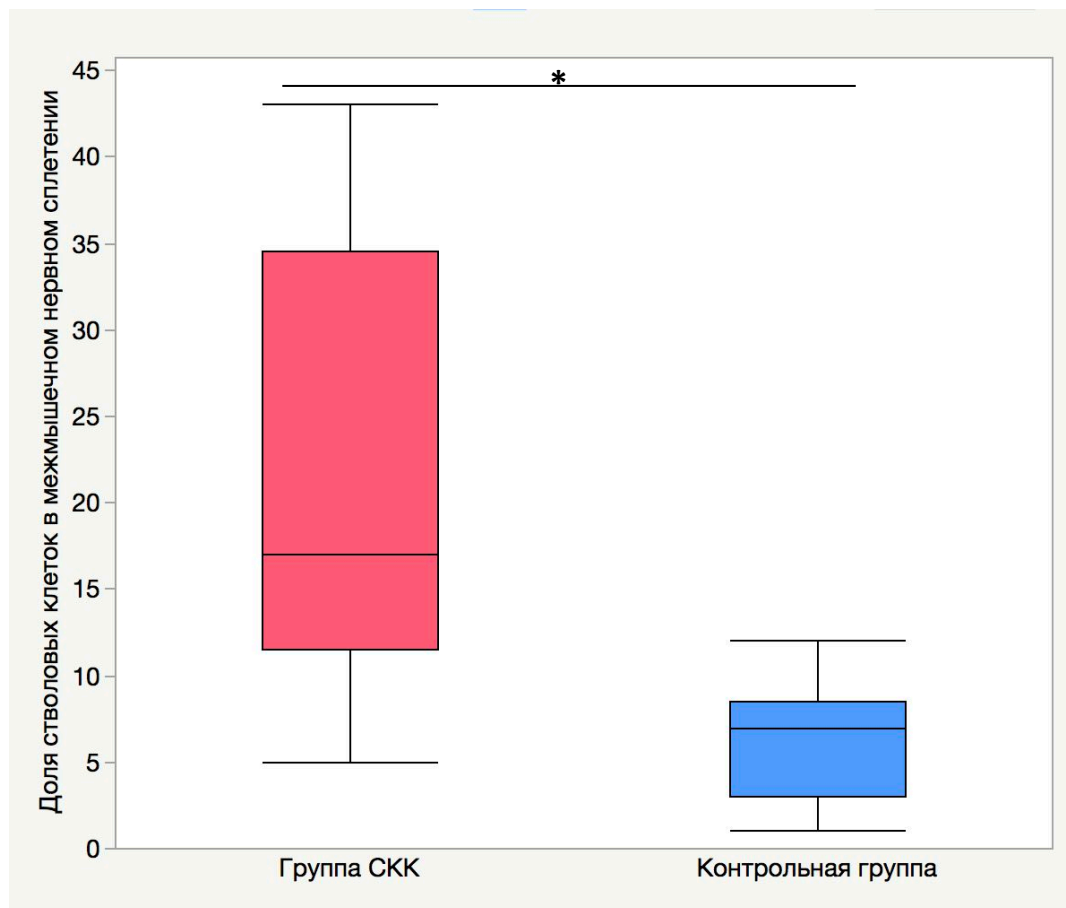


Рисунок 27 – Доля стволовых клеток в межмышечном нервном сплетении в биоптатах пациентов. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ .

Доля нервных клеток в межмышечных нервных сплетениях у пациентов с СКК достоверно не отличалась от пациентов контрольной группы, однако достоверно увеличилось отношение доли стволовых клеток к доле нервных клеток в межмышечном нервном сплетении (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ): у пациентов с СКК этот показатель составил  $0,71 \pm 0,66\%$  ( $0,53\%$  ( $0,32\%; 0,76\%$ )), у пациентов в контрольной группе -  $0,24 \pm 0,16\%$  ( $0,17\%$  ( $0,11\%; 0,33\%$ )) (Рисунок 28).

Увеличение доли стволовых клеток при неизменном количестве нейронов в межмышечных нервных сплетениях свидетельствует об увеличении/росте межмышечных нервных сплетений.

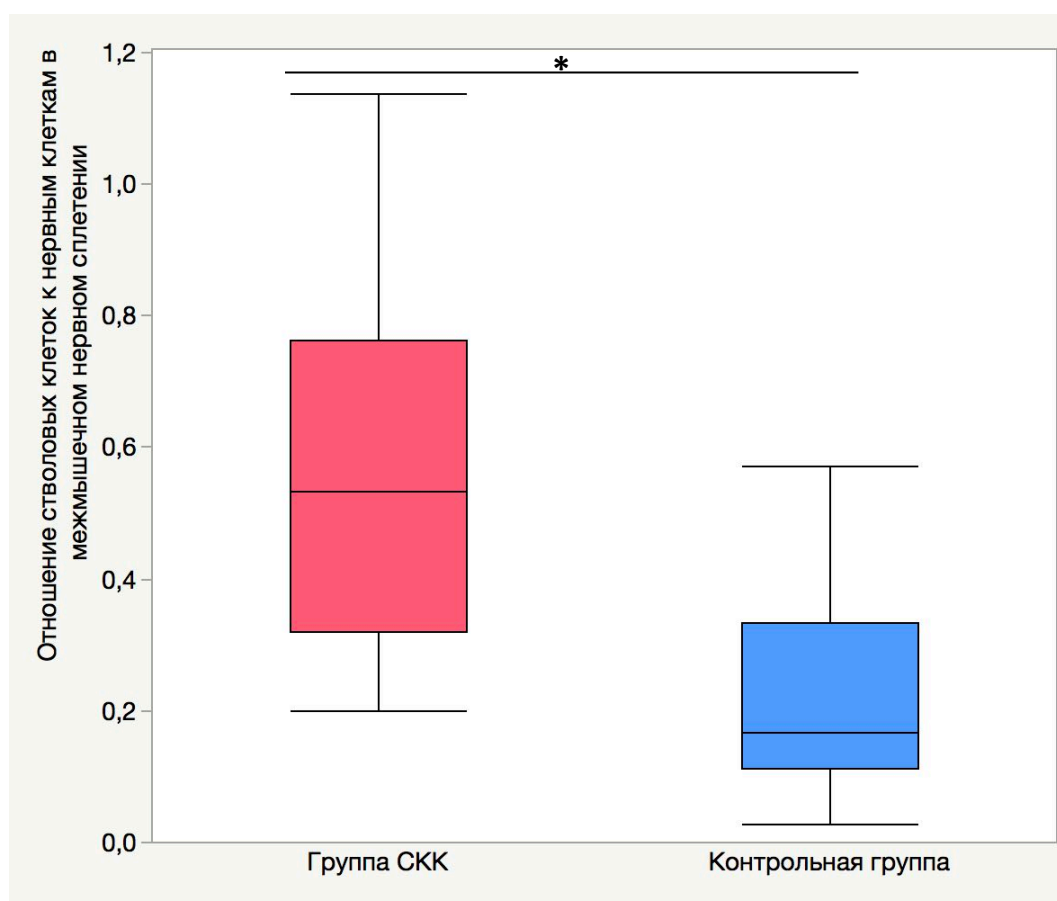


Рисунок 28 – Отношение стволовых клеток к нервным клеткам в межмышечном нервном сплетении: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальное значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): \*  $p < 0,0001$ .

Доказанная нами на модели крыс сильная положительная корреляция ( $r=0,7524$ ,  $p<0,0001$ ) между увеличением доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет нам утверждать, что выявленное увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях пациентов с СКК сопровождается гипертрофией мышечных слоёв.

Таким образом, при гистологическом и иммуногистохимическом исследовании биоптатов тонкой кишки нами было выявлено увеличение количества стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях, что полностью совпадает с результатами, полученными при экспериментах на животных. Нами впервые установлено, что у пациентов с СКК в процессе кишечной адаптации, помимо слизистой оболочки, участвуют также мышечный слой и нервная система в кишечнике тонкой кишки. Межмышечные нервные сплетения и мышечные слои тонкой кишки морфологически и функционально тесно взаимосвязаны и вместе формируют нервно-мышечный комплекс, который, как мы знаем, на примере болезни Гиршпрунга, играет важнейшую роль в функционировании тонкой кишки.

Выявленные нами изменения: увеличение диаметра тонкой кишки, гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки и увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях тонкой кишки, являются важнейшими патофизиологическими механизмами при СКК и возникают у всех пациентов с данной патологией. Вышеперечисленные изменения приводят к формированию дилатированных участков в тонкой кишке с гипертрофией мышечной стенки. В этих участках, в отличие от тонкой кишки нормального диаметра, большая часть кишечного содержимого находится в середине просвета тонкой кишки, а не в пристеночном слое, из которого всасываются питательные элементы, что приводит к усилению мальабсорбции. Гипертрофированный мышечный слой тонкой кишки не может обеспечить адекватную перистальтику в данном участке тонкой кишки, что приводит к застою кишечного содержимого и разрастанию патогенной бактериальной флоры, что усиливает мальабсорбцию, мальдигестию и способствует транслокации

бактерий из кишечника в кровяное русло. Удлиняющие кишечник операции проводятся на расширенном участке тонкой кишки и позволяют его удлинить, и сузить просвет тонкой кишки, что увеличивает долю кишечного содержимого в пристеночном слое, улучшает контакт кишечного содержимого со слизистой оболочкой кишки и делает перистальтику тонкой кишки более эффективной.



## ГЛАВА 5 ЛУЧЕВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ТОНКОЙ КИШКИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ

Для выявления дилатации тонкой кишки и определения показаний к применению удлиняющих кишечник операций у пациентов с СКК необходимо производить измерение диаметра тонкой кишки.

Одним из важных критериев, определяющих степень дилатации тонкой кишки и необходимость проведения удлиняющих кишечник операций у пациентов с СКК, является диаметр тонкой кишки. Измерение данного показателя методами лучевой диагностики является наиболее безопасным и неинвазивным. Однако в литературе отсутствуют исследования, посвященные изучению возможностей этих методов для изучения тонкой кишки у пациентов с СКК. В связи с этим, на следующем этапе нашей работы мы исследовали эффективность УЗИ, рентгенконтрастного исследования (РКИ) и гидро-МРТ для измерения длины тонкой кишки, выявления дилатаций и стенозов.

Изучение диагностической ценности лучевых методов исследования проводилось для оценки их эффективности для определения длины и диаметра (расширение) тонкой кишки, а также способности данных методов исследования определить наличие стенозов кишечника у пациентов с СКК.

### 5.1 Эффективность лучевых методов исследования для определения длины тонкой кишки

На первом этапе мы исследовали точность УЗИ, РКИ и МРТ при изучении длины тонкой кишки. Точным считался результат, если длина тонкой кишки, измеренная методами лучевой диагностики, совпадала с истинными показателями, определенными в ходе операции, при этом допустимыми считались колебания  $\pm 15$  см. Точность считалась средней, если длина тонкой кишки, измеренная методами лучевой диагностики, отклонялась от истинной длины, измеренной в

ходе операции более чем на 15 см и менее чем на 25 см. Точность считалась низкой, если отклонение от длины тонкой кишки, измеренной методами лучевой диагностики, от показателя, полученного в ходе операции составляло более 25 см.

При расчёте точности методов было установлено, что УЗИ обладает низкой точностью при определении длины тонкой кишки. Так, ни у одного пациента нам не удалось правильно измерить длину тонкой кишки. В то же время, РКИ и МРТ показали сходные результаты и оказались одинаково точны при проведении данного исследования (Таблица 8).

Таблица 8 – Обобщённые данные по диагностической эффективности УЗИ, РКИ и МРТ в определении длины тонкой кишки у пациентов с СКК

Методы исследования	Длина тонкой кишки					
	до 30 см		от 30 до 70 см		более 70 см	
	правильно	ложно	правильно	ложно	правильно	ложно
Ультразвуковое исследование	-	2	-	1	-	3
Рентгенконтрастное исследование	2	-	1	-	-	3
Магнитно-резонансная томография	2	-	1	-	-	3

Особого внимания заслуживает тот факт, что точность РКИ и МРТ напрямую зависит от длины тонкой кишки (Таблица 9). Так, при длине тонкой кишки до 30 см точность РКИ и МРТ – высокая (Рисунок 29), при длине тонкой кишки от 30 до 70 см – средняя (Рисунок 30), при длине тонкой кишки более 70 см – низкая (Рисунок 31).

Таблица 9 – Чувствительность лучевых методов исследования при измерении длины тонкой кишки при синдроме короткой кишки

Длина тонкой кишки	УЗИ	РКИ	МРТ
до 30 см	низкая	высокая	высокая
от 30 до 70 см	низкая	средняя	средняя
более 70 см	низкая	низкая	низкая

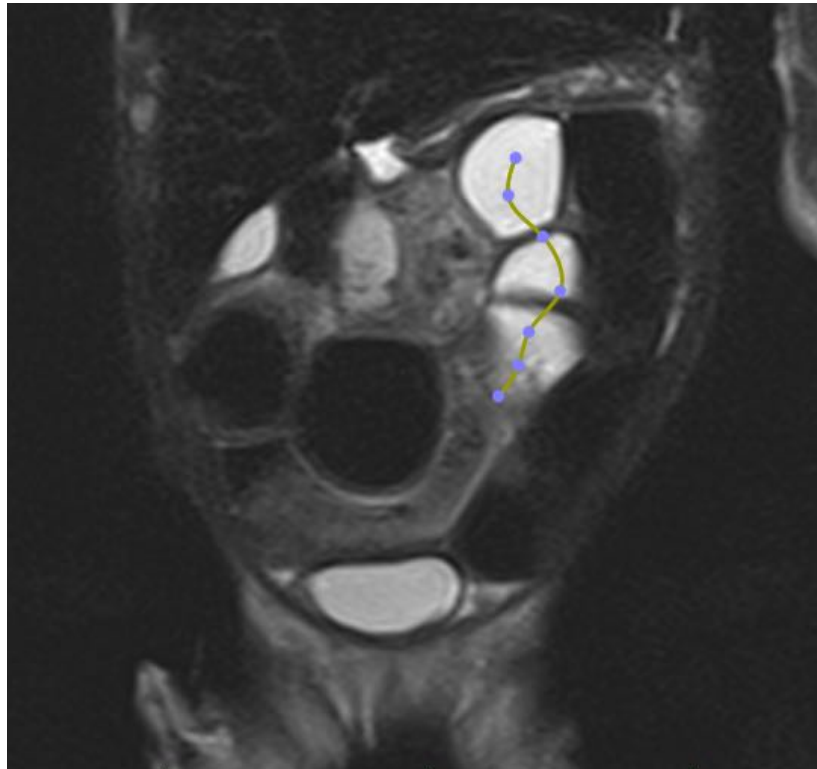


Рисунок 29 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. Показан процесс измерения длины тонкой кишки, которая составляет у обследуемого пациента 30 см.

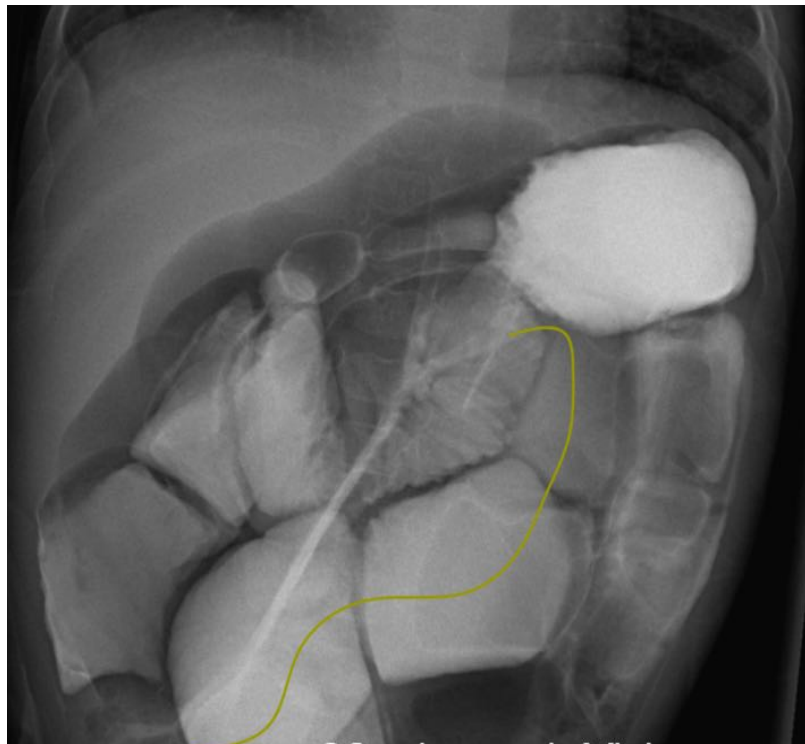


Рисунок 30 – Рентгенконтрастное исследование (РКИ) тонкой кишки у пациента с синдромом короткой кишки. Измерение длины тонкой кишки. У пациента 70 см тонкой кишки.

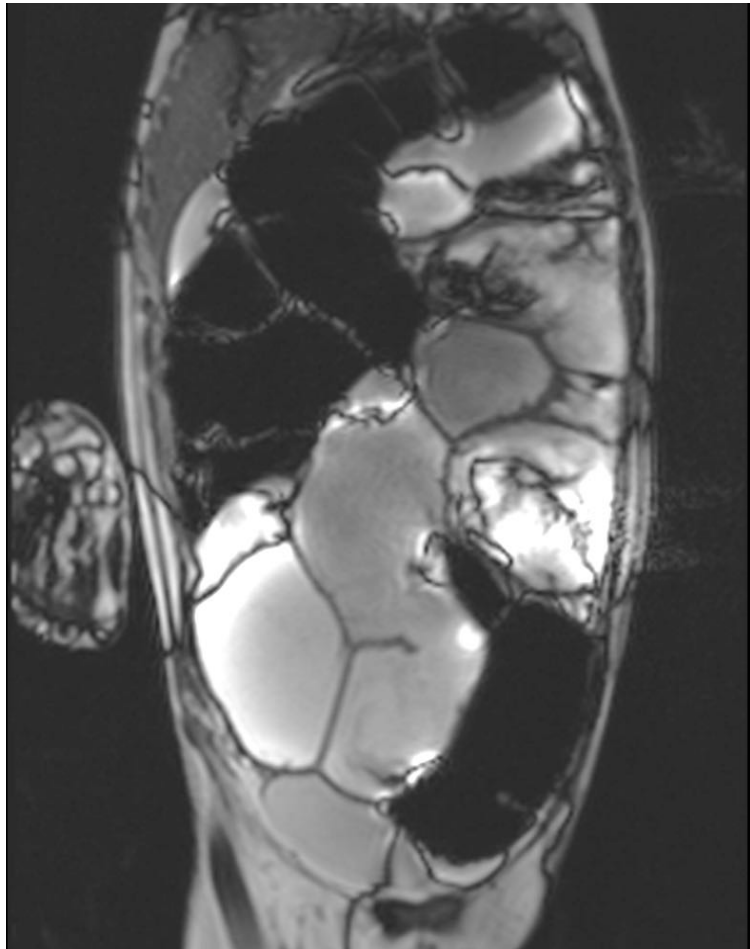


Рисунок 31 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. Измерение длины тонкой кишки. У пациента 150 см тонкой кишки. Измерение длины очень затруднительно.

## 5.2 Эффективность лучевых методов исследования при диагностике дилатации тонкой кишки

На следующем этапе исследования нами оценивалась чувствительность методов при диагностике дилатации тонкой кишки.

Истинно положительным (ИП) считался результат, если удавалось выявить дилатацию тонкой кишки, как в ходе исследования пациента с использованием методов лучевой диагностики, так и во время оперативного лечения.

В случаях, когда, как при обследовании, так и при лапаротомии, не выявлялась дилатация тонкой кишки, результаты относили к истинно отрицательным (ИО).

Результат оценивался как ложноотрицательный (ЛО), если дилатация тонкой кишки не выявлялась методами лучевой диагностики и диагностировалась при лапаротомии.

Ложноположительным (ЛП) считался результат, если дилатация тонкой кишки определялась при исследованиях методами лучевой диагностики и отсутствовала при лапаротомии (Таблица 10).

Таблица 10 – Обобщённые данные по диагностической эффективности УЗИ, РКИ и МРТ в определении дилатации тонкой кишки у пациентов с СКК

Методы исследования	Результаты			
	ИП	ИО	ЛО	ЛП
Ультразвуковое исследование	5	-	1	-
Рентгеноконтрастное исследование	6	-	-	-
Магнитно-резонансная томография	6	-	-	-

Чувствительность лучевых методов исследования при определении дилатации тонкой кишки была высокой для всех методов исследования (Таблица 11). С помощью УЗИ можно было хорошо идентифицировать наличие дилатации кишечника (дилатация была выявлена у 5 из 6 пациентов), однако описать протяжённость и форму дилатации оказалось невозможным (Рисунок 32, 33). РКИ и гидро-МРТ показали себя одинаково хорошо при определении дилатации тонкой кишки, которая была выявлена у всех пациентов. Кроме того, с помощью этих методик можно было полноценно охарактеризовать дилатацию – определить форму, протяжённость и локализацию (Рисунок 34, 35, 36).

Таблица 11 – Чувствительность лучевых методов исследования при определении дилатации тонкой кишки у пациентов с синдромом короткой кишки

	УЗИ	РКИ	МРТ
Чувствительность	высокая	высокая	высокая



Рисунок 32 – Ультразвуковое исследование органов брюшной полости при синдроме короткой кишки. Продольное сечение тонкой кишки.

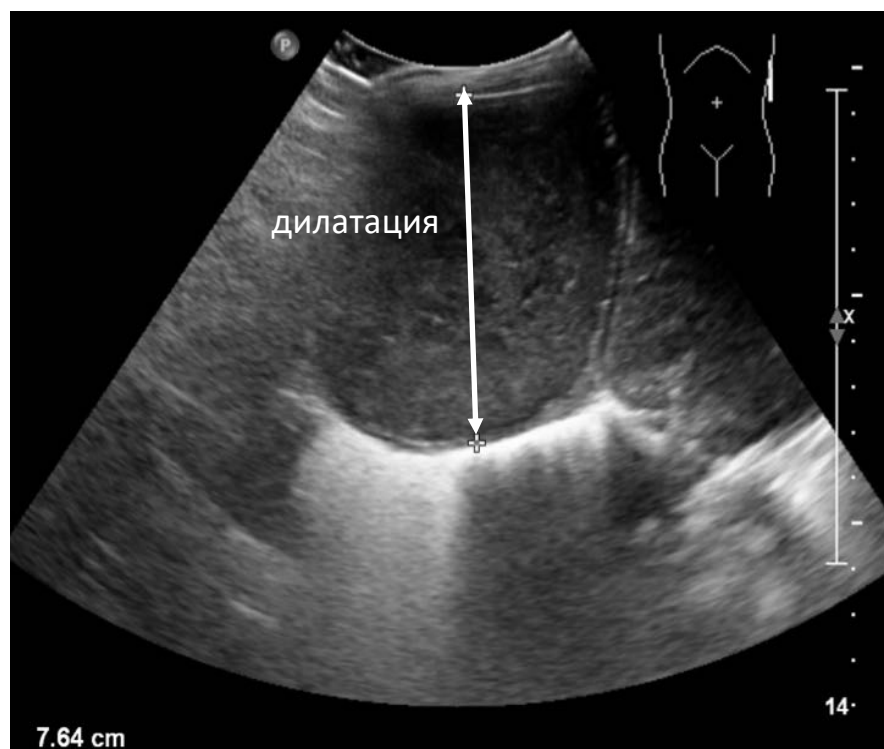


Рисунок 33 – Ультразвуковое исследование органов брюшной полости при синдроме короткой кишки. Поперечное сечение тонкой кишки.

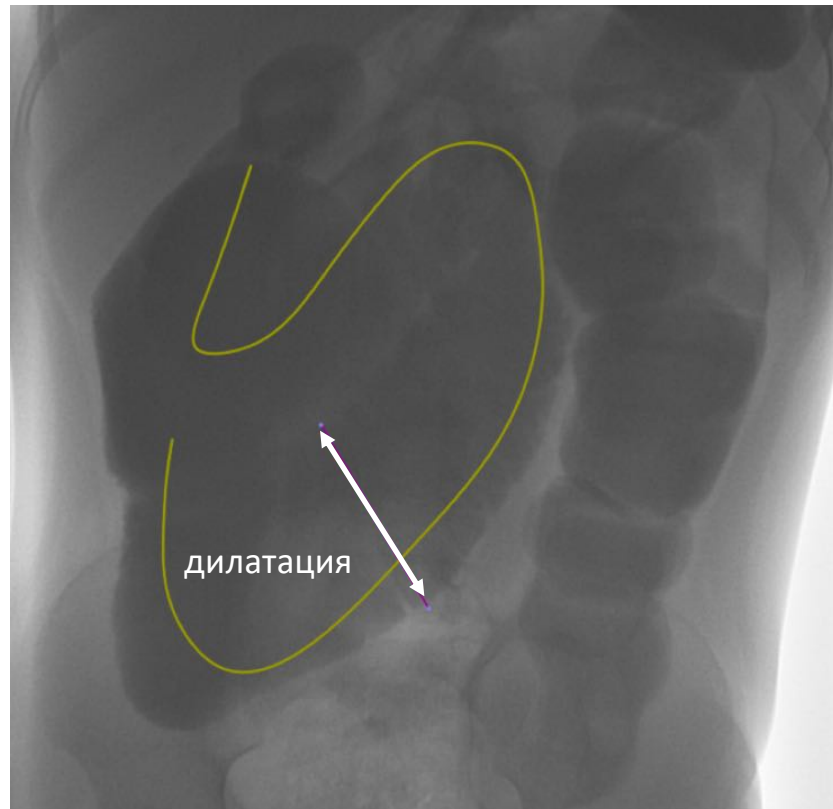


Рисунок 34 – Рентгенконтрастное исследование органов брюшной полости у пациента с синдромом короткой кишки.



Рисунок 35 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. Во фронтальной плоскости видна расширенная петля тонкой кишки.



Рисунок 36 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. В горизонтальной плоскости видна расширенная петля тонкой кишки.

### 5.3 Эффективность лучевых методов исследования для определения стенозов тонкой кишки

Истинно положительным (ИП) считался результат, если с помощью лучевых методов исследования удавалось диагностировать стеноз кишечника, определяемый также во время хирургической операции.

Результат оценивался как истинно отрицательный (ИО) при отсутствии стеноза кишечника, как при обследовании пациента лучевыми методами лечения, так и при хирургической операции.

В случаях, когда в результате лучевой диагностики стеноз кишечника не определялся, но выявлялся в процессе лапаротомии, результаты относили к ложноотрицательным (ЛО).

Ложноположительным (ЛП) считался результат, когда стеноз определялся в результате лучевых методов исследования и отсутствовал при выполнении лапаротомии (Таблица 12).



Таблица 12 – Обобщённые данные по диагностической эффективности УЗИ, РКИ и МРТ в определении стенозов тонкой кишки у пациентов с СКК

Методы исследования	Результаты			
	ИП	ИО	ЛО	ЛП
Ультразвуковое исследование	-	3	3	-
Рентгенконтрастное исследование	2	3	1	-
Магнитно-резонансная томография	2	4	-	-

Чувствительность УЗИ для идентификации стенозов оказалась низкой. Так, при помощи УЗИ стенозы не были выявлены ни у одного пациента, хотя присутствовали у 3-х из 6 пациентов. В ходе проведения УЗИ наличие стеноза кишки можно было предположить лишь при обнаружении зоны дилатации, за которой определялись коллабированные петли кишечника (Таблица 13).

Таблица 13 – Чувствительность, специфичность и точность методов лучевой диагностики при определении стенозов кишечника у пациентов с СКК

	УЗИ	РКИ	МРТ
Чувствительность	низкая	высокая	высокая
Специфичность	высокая	высокая	высокая

При помощи РКИ и гидро-МРТ стенозы можно было идентифицировать с высокой степенью чувствительности, специфичности. При гидро-МРТ, которая была проведена 6 пациентам, наличие стенозов было правильно диагностировано у 2, отсутствие стенозов у 4 пациентов. РКИ было также проведено 6 пациентам, у 3 из которых был стеноз тонкой кишки. Это исследование выявило стеноз у 2 пациентов и отсутствие его у 3 пациентов. В одном случае РКИ не выявило имеющийся стеноз.

Благодаря высокой контрастности мягких тканей и возможности обработки изображений в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, гидро-МРТ показала лучшую чувствительность для верификации стенозов (Рисунок 37, 38). Чувствительность РКИ уступала гидро-МРТ. Так, в случае наложения контрастированных петель тонкой кишки друг на друга на снимке, возможность

определения морфологических и структурных изменений тонкой кишки ухудшалась, повышая риск диагностических ошибок (Рисунок 39).

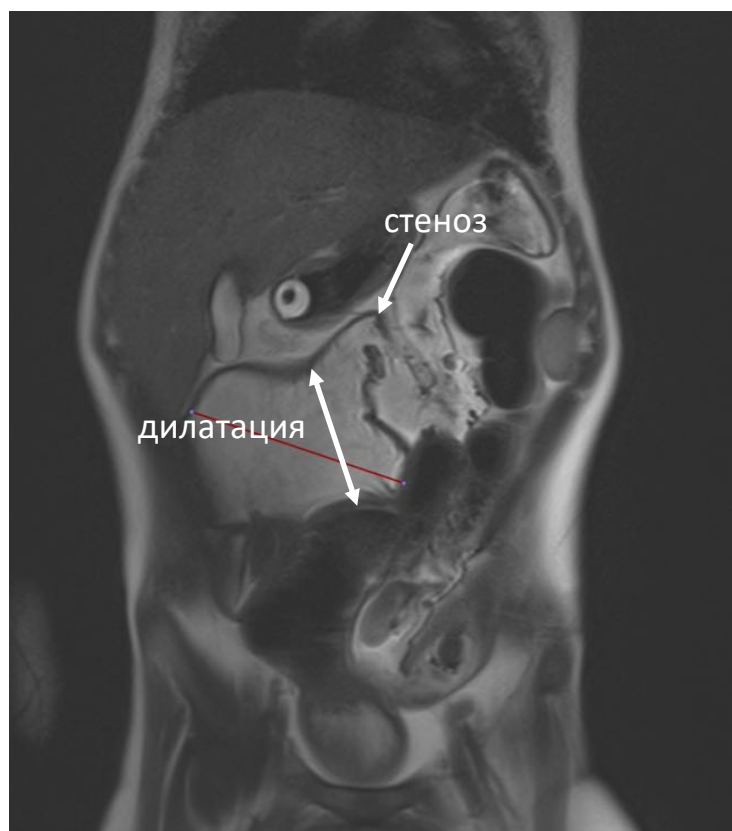


Рисунок 37 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. Во фронтальной плоскости определяется расширенная петля тонкой кишки (дилатация) и место стеноза.



Рисунок 38 – Гидро-МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. В горизонтальной плоскости определяется расширенная петля тонкой кишки.



Рисунок 39 – Обзорная рентгенография органов брюшной полости через 45 минут после введения контрастного вещества. Наслаивающиеся петли тонкой кишки не позволяют отчётливо изучить тонкую кишку.

УЗИ брюшной полости является широко распространённым, доступным неинвазивным, не обладающим ионизирующим излучением методом исследования ЖКТ. Наши исследования показали, что УЗИ обладает высокой чувствительностью при диагностике дилатации кишечника, позволяет изучить структуру кишечной стенки и перистальтику кишечника. Наряду с этим, при помощи УЗИ возможно исследовать паренхиматозные органы брюшной полости, что является очень важным преимуществом метода, так как пациенты с СКК подвержены риску поражения печени, нефрокальцинозов и т.д. В режиме дуплеровского сканирования с помощью УЗИ можно оценить состояние сосудов брюшной полости и кровоснабжение органов. Этот метод исследования не позволяет описать характер дилатации кишечника (протяжённость, форму, отдел кишечника). Кроме того, при помощи УЗИ невозможно измерить длину тонкой кишки и достаточно сложно выявить стенозы. Важным является то, что эффективность УЗИ при выявлении той или иной патологии зависит от опыта и навыков специалиста.

Таким образом, при наличии опыта у врача ультразвуковой диагностики УЗИ является достаточно эффективным методом для мониторинга дилатации тонкой кишки и исследования паренхиматозных органов ЖКТ у пациентов с СКК.

РКИ – метод, который хорошо выявляет дилатацию кишки. При помощи РКИ, в отличие от УЗИ, можно более детально охарактеризовать дилатацию с описанием её протяжённости, формы, местоположения. Кроме того, при РКИ достаточно хорошо выявляются стенозы. Одним из интересных фактов, установленных в ходе нашего исследования, является то, что точность определения длины тонкой кишки зависит от её длины. Чем короче кишечник, тем точнее измерения при использовании РКИ. В связи с этим, при условии наличия у пациента короткой тонкой кишки – не более 30-70 см – с помощью РКИ возможно достаточно точное измерение длины кишки. Наряду с этим, РКИ позволяет оценить скорость пассажа кишечного содержимого по кишечнику. Одним из существенных недостатков РКИ является ионизирующее излучение. Этот факт необходимо учитывать при необходимости многократного использования метода для оценки динамики течения заболевания у детей. Снижение чувствительности метода может быть обусловлено эффектом наслаения петель тонкой кишки друг на друга, что может приводить к диагностическим ошибкам.

МРТ – самый современный и дорогостоящий метод лучевого исследования тонкой кишки. Благодаря высокой контрастности мягких тканей на снимках МРТ и возможности обработки изображений в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, гидро-МРТ является наиболее точным информативным методом исследования тонкой кишки при СКК. Отсутствие ионизирующего излучения является важным его преимуществом. С помощью МРТ можно оценить состояние паренхиматозных органов и сосудов брюшной полости. В отличие от УЗИ, метод МРТ позволяет не только заподозрить патологию, но и более точно её идентифицировать. При оценке тонкой кишки у детей МРТ является наиболее чувствительным методом, позволяющим определить и полностью

охарактеризовать дилатацию тонкой кишки, идентифицировать стенозы кишечника и определить морфологические и структурные особенности стенки тонкой кишки. Как и при РКИ, МРТ позволяет достаточно точно измерять длину тонкой кишки при условии, что её длина, не превышает 30-70 см. Недостатком метода является невозможность изучения моторики кишечника, а, именно, пассажа кишечного содержимого.

Для адекватного исследования тонкой кишки с помощью МРТ необходимым условием является полноценное заполнение и растяжение кишечного просвета с помощью контрастных растворов. При нарушении данного условия повышается риск диагностических ошибок в виде неправильной интерпретацией находок или пропуска патологических изменений. При проведении гидро-МРТ тонкой кишки в нашем исследовании контрастное вещество вводилось перорально. Особенно важным этот факт является при исследовании детей до 7-8 лет, которые в силу возрастных особенностей не способны спокойно лежать в аппарате МРТ в течение 45 минут. В связи с этим, этой группе пациентов гидро-МРТ проводилась под наркозом. Применение наркоза исключает возможность перорального приема контрастного вещества. Поэтому чувствительность гидро-МРТ у пациентов этой возрастной группы ниже. Кроме того, проведение гидро-МРТ под наркозом создаёт дополнительные анестезиологические риски для пациента.

Таким образом, при помощи УЗИ, РКИ и МРТ органов брюшной полости возможно исследование тонкой кишки у детей с СКК, однако каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Правильное применение комбинации этих методов исследования обеспечивает комплексную диагностику изменений и своевременное определение дальнейшей тактики лечения пациента с СКК. УЗИ является оптимальной скрининговой методикой для пациентов с СКК, позволяющей выявить дилатацию тонкой кишки. РКИ и гидро-МРТ позволяют детально охарактеризовать дилатацию и выявить стенозы тонкой кишки. Поэтому эти методы должны применяться при изменениях, выявленных на УЗИ или при наличии клинических признаков острой и хронической патологии ЖКТ у детей.

Гидро-МРТ следует проводить в осложнённых случаях, так как благодаря высокой контрастности получаемых снимков и возможности обработки изображений в трех взаимно перпендикулярных плоскостях этот метод позволяет наиболее точно изучить тонкую кишку.

## ГЛАВА 6 УДЛИНЯЮЩИЕ КИШЕЧНИК ОПЕРАЦИИ ПРИ СИНДРОМЕ КОРОТКОЙ КИШКИ

### 6.1 Предоперационная подготовка

Предоперационную подготовку осуществляли по общехирургическим правилам. В предоперационном периоде исследовалось общее состояние пациента, производились общий анализ и биохимический анализ крови (трансаминазы, холестерин, ацетилхолинэстеразы, общий протеин и альбумин, витамины, в том числе жирорастворимые, микроэлементы, электролиты, С-реактивный протеин, и показатели свёртываемости крови). Гипоальбуминемия и гипопроотеинемия корректировались добавлением аминокислот в парентеральное питание и увеличением количества калорий в парентеральном питании. При наличии недостатка факторов свёртывания данные факторы субституировались, также корректировался дефицит витаминов (витамина В 12, жирорастворимых витаминов, таких как витамин К, который играет важную роль в синтезе факторов свёртывания) и микроэлементов, а также электролитных и кислотно-щелочных отклонений. В связи с тем, что удлиняющие кишечник операции проводились только на расширенной тонкой кишке, в предоперационную подготовку также включали исследование тонкой кишки при помощи лучевых методов исследования.

Критериями готовности к операции являлись: отсутствие значительного дефицита массы тела, санация очагов хронической инфекции, нормализация клинико-лабораторно-инструментальных показателей, в том числе восстановление водно-электролитного баланса и кислотно-щелочного равновесия, уменьшение явлений холестаза, устранение белковой недостаточности, отсутствие коагулопатии, коррекция анемии и тромбоцитопении.

Нами всегда учитывалась вероятность кровопотери во время удлиняющих кишечник операций, поэтому перед каждой операцией подбирались и

заготавливались компоненты крови (эритроцитарная масса, свежезамороженная плазма).

Предоперационная подготовка проводилась в условиях хирургического стационара и не различалась для операций LILT и STEP. В предоперационном периоде длительность нахождения пациентов в клинике составила в группе LILT до 10 дней у 20 пациентов (60,6%) в то время, как в группе STEP 8 пациентам (61,5%) операция была произведена в течение 5 дней после поступления в стационар (Таблица 14).

Таблица 14 – Длительность пребывания пациентов в стационаре до проведения удлиняющих операций

Длительность пребывания в стационаре	Количество пациентов			
	LILT группа		STEP группа	
	абс.	%	абс.	%
Длительность пребывания до операции от 1 до 5 дней	9	27,3	8	61,5
Длительность пребывания до операции от 6 до 10 дней	11	33,3	2	15,4
Длительность пребывания до операции от 11 до 25 дней	7	21,2	2	15,4
Длительность пребывания до операции более 25 дней	6	18,2	1	7,7
Всего	33	100	13	100

Такая разница объясняется тем, что операции STEP начали проводиться в нашей клинике с 2007, тогда как операции LILT уже с 1996 года, то есть на 11 лет раньше, чем операции STEP.

Важным элементом лечения таких пациентов является парентеральное питание, которое в последнее десятилетие стало более сбалансированным, а протоколы его применения позволяли значительно уменьшить риск развития



поражения печени, ассоциированного с парентеральным питанием. В связи с этим, многим пациентам из группы LILT в 1996-2007 годы проводилась пункционная биопсия печени, как элемент предоперационной подготовки, кроме того, в 90-ые годы пациенты часто поступали в кахектичном состоянии, поэтому требовалась коррекция веса в стационаре, это всё влияло на длительность предоперационной подготовки.

Кроме клинико-лабораторного обследования, в предоперационную подготовку входили так же лучевые методы исследования, при необходимости коррекция парентерального питания, установка тунелизованного центрального венозного катетера у ряда пациентов.

В последние годы часто все необходимые предоперационные обследования проводятся заранее, и пациент поступает непосредственно на операцию по удлинению кишечника.

У троих пациентов предоперационная подготовка составила более 1 месяца. Самое длительное нахождение в предоперационном периоде составило 104 дня у пациента, которому удлиняющая кишечник операция была проведена в 1996 году. При поступлении вес пациента, которому был 1 год и 5 месяцев составлял 4 кг. Основные усилия в предоперационной подготовке пациента уделялись повышению его веса. Ему был установлен центральный тунелированный венозный катетер Бровиак, который из-за его инфицирования пришлось один раз переустанавливать. За 104 дня удалось увеличить вес пациента с 4 кг до 7 кг 290 граммов. В других двух случаях предоперационная подготовка составила 58 и 33 дня и также заключалась в выведении пациента из кахектичного состояния.

## 6.2 Хирургическое лечение (операция LILT и операция STEP)

Распределение детей с СКК в зависимости от возраста и способа выполнения операции представлено в таблице 15. Цифры показывают, что в группе LILT и в группе STEP удлиняющие кишечник операции у большинства пациентов были проведены в возрасте от 1 года до 3 лет.

Операции в возрасте до 1 года были проведены 13 пациентам. Эти оперативные вмешательства выполнялись до 2006 года, затем в связи с данными опубликованными Bianchi [103], о том, что в первый год после резекции тонкой кишки происходит наиболее активная фаза кишечной адаптации, было принято решение отказаться от практики выполнения удлиняющих кишечник операций детям данной возрастной группы. Для того, чтобы не наносить дополнительную травму кишечнику и тем самым, не подавлять активность кишечной адаптации, удлиняющие кишечник операции детям в возрасте до одного года проводились только в исключительных случаях, когда у пациентов развивалась выраженная дилатация тонкой кишки и, несмотря на проведение полного комплекса лечебных мероприятий, происходила регулярная транслокация бактерий из расширенного участка тонкой кишки, в результате чего у пациента регулярно развивался рецидивирующий сепсис.

Таблица 15 – Распределение пациентов по возрасту, в котором проводилось оперативное лечение и виду удлиняющих операции (LILT или STEP)

Возраст пациентов	Количество детей		
	LILT группа	STEP группа	LILT+STEP группа
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)
от 6 мес. до 1 года	12 (33,3%)	1 (6,7%)	-
от 1 года до 3-х лет	14 (38,9%)	8 (53,3%)	-
от 3-х до 6- лет	6 (16,7%)	2 (13,3%)	-
от 6 до 13 лет	4 (11,1%)	4 (26,7%)	3 (100%)
Всего	36 (100%)	15 (100%)	3 (100%)

### Клинический пример

Пациент Е. был рождён на 32 неделе гестации, при рождении был выявлен порок развития передней брюшной стенки – гастрошизис с некрозом тонкой кишки, вследствие чего пациенту была проведена субтотальная резекция тонкой кишки и половины толстой кишки. Пациент находился на парентеральном питании. В возрасте 6 месяцев у ребёнка развилась дилатация тонкой кишки до 8

см и неоднократно возникали эпизоды сепсиса, в результате разрастания патогенной микрофлоры в тонкой кишке и её транслокации через кишечную стенку в кровяное русло. В связи с этим, в возрасте 8 месяцев ребёнку была проведена операция – продольное кишечное удлинение тонкой кишки, при которой 50 см тонкой кишки удалось удлинить в два раза и сократить диаметр тонкой кишки также в 2 раза. После проведённой операции у пациента перестали развиваться эпизоды сепсиса, и пациент начал уверенно набирать в весе и через год после проведённой операции пациент полностью перешёл на энтеральное питание.

Длительность операции LILT составила  $264 \pm 74,7$  минут, операции STEP -  $283 \pm 121,1$  минут. Статистически не было разницы в продолжительности операции между этими группами ( $p=0,61$ ) (Рисунок 40).

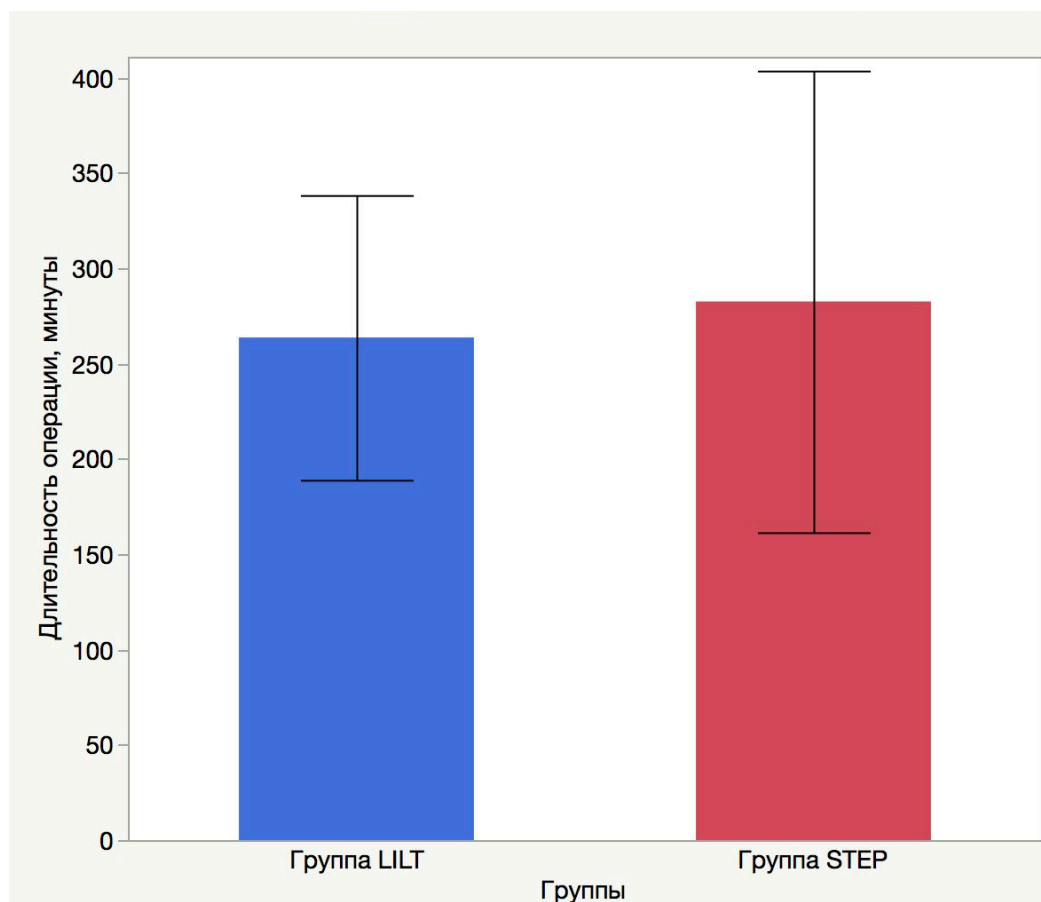


Рисунок 40 – Продолжительность операции LILT и STEP в минутах. Значения: среднее и стандартное отклонение.

Методика LILT технически более сложная, однако отсутствие разницы в продолжительности операции объясняется тем, у всех пациентов с СКК имелся спаечный процесс в брюшной полости и разъединение спаек занимало до 3-4 часов, что составляло большую часть операции. В STEP группе сильный спаечный процесс встречался в 93,4% случаев, в LILT группе - несколько реже в 83,3% случаев (Таблица 16).

Таблица 16 – Выраженность спаечного процесса у пациентов LILT группы и STEP группы

Выраженность спаечного процесса в брюшной полости	Количество пациентов			
	LILT группа		STEP группа	
	абс.	%	абс.	%
Выраженный спаечный процесс	30	83,3	14	93,3
Незначительный спаечный процесс	6	16,7	1	6,7
Всего	36	100,0	15	100,0

Дилатация тонкой кишки в LILT группе составила  $6,7 \pm 0,41$  см, в STEP группе составила  $6,5 \pm 0,87$  см. Данные достоверно не отличались ( $p=0,43$ ). Стенозы тонкой кишки были выявлены у 18% пациентов. В остальных случаях дилатация тонкой кишки происходила только в результате кишечной адаптации, что полностью совпадает с результатами, полученными в экспериментах на животных.

Длина тонкой кишки до удлиннения в группе LILT группы и составила  $37,5 \pm 24$  см (медиана 32 (22,25; 42,25) см) (Таблица 17).

Таблица 17 – Распределение детей в зависимости от возраста и длины тонкой кишки до операции LILT

Возраст	Длина тонкой кишки, см					Итого
	от 11 до 20	от 21 до 40	от 41 до 60	от 61 до 100	от 101 до 140	
от 6 мес. до 1 года	2	8	1	1	-	12
от 1 года до 3-х лет	4	8	2	-	-	14
от 3-х до 6- лет	1	4	-	1	-	6
от 6 до 13 лет	-	1	1	1	1	4
Всего	7	21	4	3	1	36

Длина тонкой кишки до удлинения в группе STEP составила  $62,1 \pm 33$  см (медиана 55 (39; 80) см) (Таблица 18).

Таблица 18 – Распределение детей в зависимости от возраста и длины тонкой кишки до операции STEP

Возраст	Длина тонкой кишки, см					Итого
	от 11 до 20	от 21 до 40	от 41 до 60	от 61 до 100	от 101 до 140	
от 6 мес. до 1 года	-	1	-	-	-	1
от 1 года до 3-х лет	-	2	3	3	-	8
от 3-х до 6- лет	-	-	1	1	-	2
от 6 до 13 лет	-	1	1	1	1	4
Всего	-	4	5	5	1	15

Тонкую кишку удалось удлинить при операции LILT на  $31,6 \pm 17,02$  см (медиана 30 (20; 40) см), при операции STEP на  $27,4 \pm 12,54$  см (медиана 25 (20; 38,75) см). Данные достоверно не отличались ( $p=0,33$ ) (Рисунок 41).

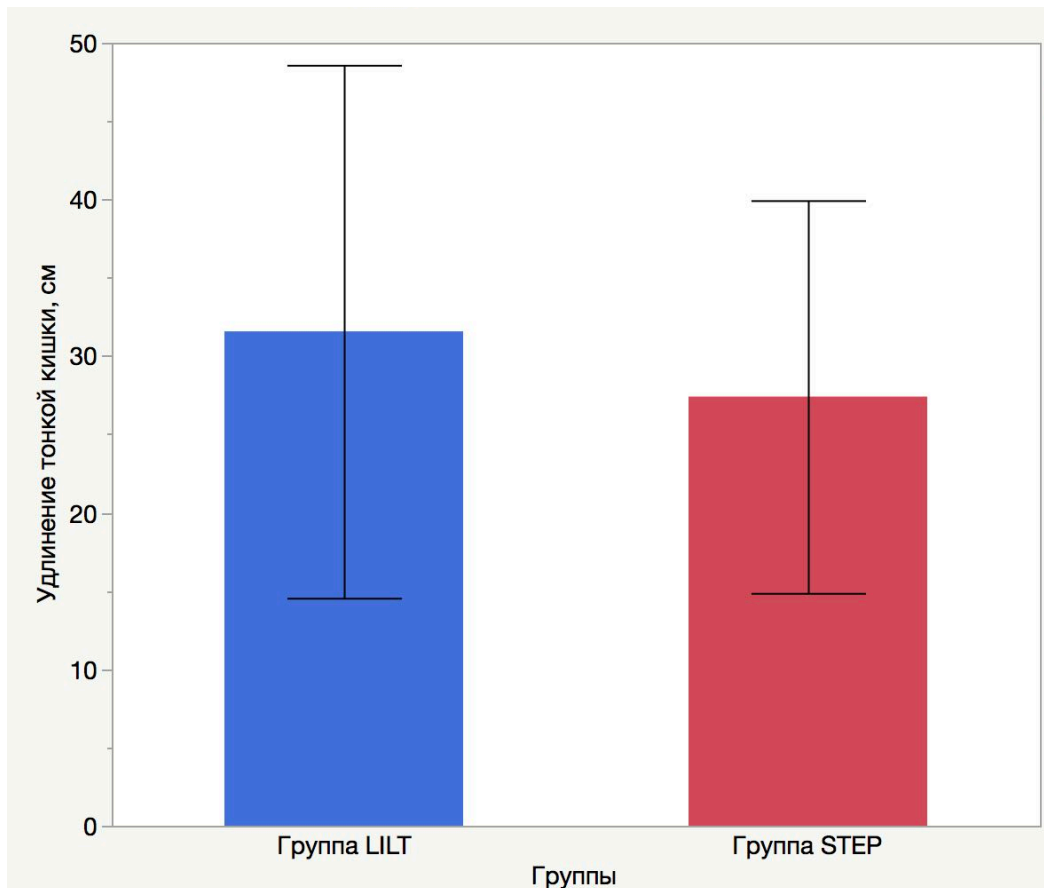


Рисунок 41 – Удлинение тонкой кишки в сантиметрах при LILT операции и STEP операции. Значения: среднее и стандартное отклонение.

### 6.3 Комбинированная операция LILT и STEP (LILT+STEP)

У 3 пациентов была произведена комбинированная операция LILT и STEP (LILT+STEP). Причинами развития синдрома короткой кишки пациентов были некротический энтероколит, заворот кишечника и гастрошизис. Данная операция проводилась у пациентов в возрасте от 6 лет до 8,5 лет, длина тонкой кишки у пациентов колебалась от 100 до 130 см. Удлинить тонкую кишку удалось в среднем на 46 см (от 40 до 50 см), при этом расширенный участок тонкой кишки длиной более 20 см удлинялся по методике LILT, расширенный участок тонкой кишки менее 20 см и несимметрично-расширенные участки тонкой кишки удлинялись при помощи методики STEP. У всех пациентов отсутствовал илеоцекальный клапан. У двух пациентов присутствовала только сигмовидно-ободочная и прямая кишка, у одного пациента толстая кишка отсутствовала полностью. У одного пациента в послеоперационном периоде развилась

несостоятельность анастомоза, ввиду чего пациенту в раннем послеоперационном периоде была проведена релапаротомия и ушивание анастомоза. У одного пациента развилась редилатация тонкой кишки, по поводу которой через год у пациента была проведена повторная операция STEP (reSTEP). Один из этих трёх пациентов был через полтора года переведён на полное энтеральное питание, двое других пациентов через 9 и 10 лет всё ещё находились на частичном парентеральном питании.

#### 6.4 Послеоперационное ведение

В послеоперационном периоде пациенты переводились в отделение интенсивной терапии. Лечение детей с СКК включало парентеральное питание, антибиотикотерапию, анальгезию, профилактику и лечение пареза кишечника, а также симптоматическую терапию. Для послеоперационного обезболивания нами использовалась продленная перидуральная анестезия.

Длительность пребывания пациентов в отделении интенсивной терапии представлена в таблице 19. Большинство пациентов в обеих группах были переведены на первые-вторые сутки после операции из отделения интенсивной терапии в хирургическое отделение. Один пациент находился в отделении интенсивной терапии 12 дней вследствие того, что у него развилось раннее послеоперационное осложнение – несостоятельность анастомоза, в связи, с чем, возникла необходимость в повторной лапаротомии в раннем послеоперационном периоде.

Таблица 19 – Длительность пребывания пациентов в отделении интенсивной терапии в послеоперационном периоде

Длительность пребывания в отделении интенсивной терапии	Количество пациентов			
	LILT группа		STEP группа	
	абс.	%	абс.	%
От 1 до 2 дней	25	86,2	9	81,8
От 3 до 5 дней	4	13,8	1	9,1
Более 5 дней	-	-	1	9,1
Всего	29	100,0	11	100,0

Сроки удаления перидурального катетера в группе LILT и в группе STEP составили  $4 \pm 1$  и  $3,5 \pm 0,71$  дня соответственно и достоверно не отличались ( $p=0,49$ ).

Начатая во время операции антибиотикотерапия 2-мя антибиотиками (метронидазол и антибиотик группы цефалоспоринов 2 или 3 поколения (цефуроксим, цефотаксим)) продолжалась в среднем в течение 10-12 дней.

В послеоперационном периоде энтеральное питание вводилось в рацион медленно, так в группе LILT с  $5,8 \pm 0,46$  дня, группе STEP с  $4,8 \pm 0,97$  дня. Данные достоверно не отличались ( $p=0,59$ ).

При сравнении сроков удаления желудочного зонда в группах достоверных различий также не было установлено ( $p=0,55$ ). В группе LILT удаление желудочного зонда проведено через  $8,4 \pm 3,4$  дня, а в группе STEP через  $11,3 \pm 4,46$  дней.

Длительность нахождения пациентов в стационаре в послеоперационном периоде в группе LILT составила  $34 \pm 18$  дня (медиана 32 (18,5;40,0) дня), в группе STEP –  $23 \pm 15$  дней (медиана 21 (12,8;28,0) день). Разница в длительности нахождения пациентов была достоверной (t-тест  $p=0,025$ , Wilcoxon  $p=0,034$ ), это связано с тем, что в первые 10 лет применения операции LILT пациенты находились на стационарном лечении длительное время. Если же сравнить пациентов в LILT и STEP группах, получавших лечение в один временной промежуток (с 2007 по 2019 годы) (Рисунок 42), то средняя длительность нахождения в стационаре у пациентов в группе LILT составила  $27,6 \pm 11,2$  (медиана 31 (17,75;37,5) дня, в группе STEP –  $23,5 \pm 15,1$  (медиана 21 (12,75;28) день. При этом при сравнении данных достоверных различий выявлено не было (t-тест  $p=0,24$ , Wilcoxon  $p=0,226$ ) ( $p=0,348$ ).



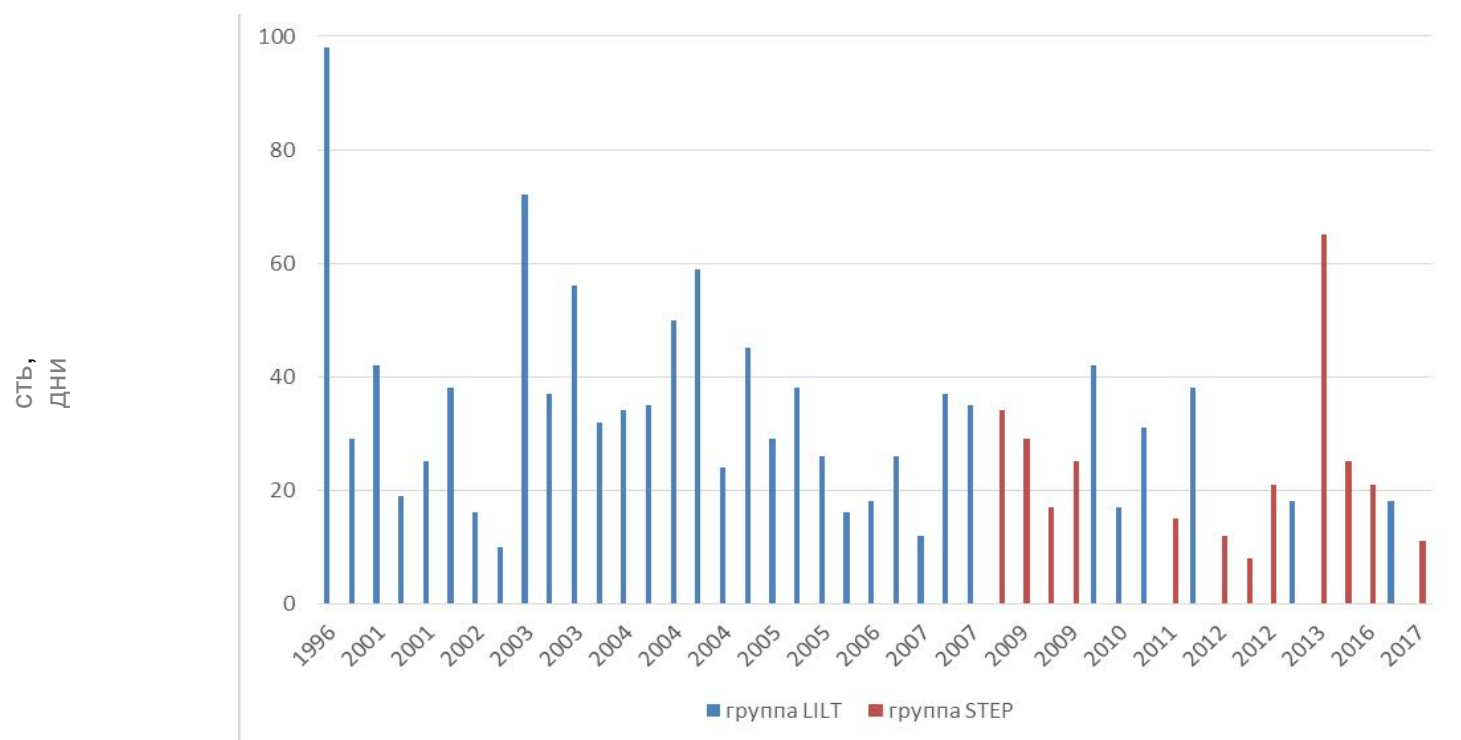


Рисунок 42 – Длительность нахождения пациентов в послеоперационном периоде в стационаре в разные годы.

### 6.5 Релапаротомии по поводу осложнений в раннем и отдалённом послеоперационных периодах

Осложнения в раннем послеоперационном периоде, потребовавшие повторного хирургического вмешательства, оценивались у всех пациентов после первичной удлиняющей операции (36 пациентов после операции LILT, 15 пациентов после операции STEP) и у 12 пациентов - после повторной операции STEP (reStep) по поводу повторной дилатации тонкой кишки. Таким образом, были изучены осложнения после 36 операций LILT и 27 после операций STEP. После операции LILT в 1 случае из 36 (2,8%) развилась несостоятельность анастомоза, в 1 случае (2,8%) точечная перфорация тонкой кишки, в 1 случае (2,8%) непроходимость и стеноз тонкой кишки и в 1 случае (2,8%) образовался межкишечный абсцесс. После операции STEP в 3 случаях из 27 (11,1%) была несостоятельность на месте анастомоза STEP и в одном случае из 27 (3,7%) была несостоятельность на месте еюно-ректального анастомоза конец-в-конец (Таблица 20).

Таблица 20 – Осложнения в раннем послеоперационном периоде после операции LILT и операции STEP

Послеоперационные осложнения	Количество пациентов			
	LILT (n 36)		STEP+reSTEP (n 27)	
	абс.	%	абс.	%
Несостоятельность анастомоза непосредственно в месте проведения удлиняющей кишечник операции	1	2,8	4	11,1
Несостоятельность анастомоза вне места, где была проведена удлиняющая кишечник операция	-	-	1	3,7
Перфорация кишки	1	2,8	-	-
Непроходимость/стеноз анастомоза	1	2,8	-	-
Межкишечный абсцесс	1	2,8	-	-
Всего	4	11,2	4	14,8

В отдалённом послеоперационном периоде наиболее частым осложнением, потребовавшим проведения релапаротомии, явились стеноз и непроходимость кишечника после операции LILT, которые встречались у 9 пациентов из 25 (36%) (Таблица 21).

Таблица 21 – Осложнения в отдалённом периоде после операции LILT и операции STEP, которые потребовали релапаротомии

Осложнения	Количество пациентов			
	LILT (n 25)		STEP (n 11)	
	абс.	%	абс.	%
Стеноз кишечника	9	36%	2	18,2%
Рецидивирующие кишечные кровотечения	1	4%	2	18,2%
Межкишечные свищи	4	16%	-	-
Всего	10	40%	4	36,4%

Анализ причин высокой частоты развития стенозов после операции LILT выявил, что у пациентов, у которых удлиннили 20 см кишки и менее, они

развились у 5 из 6 пациентов, в группе пациентов, у которых длина тонкой кишки, которая была удлинена была более 20 см, у 4 пациентов из 21. Разница в данных была статистически достоверной ( $p=0,04$ ) (Таблица 22).

Таблица 22 – Частота развития стенозов у пациентов после операции LILT в зависимости от длины удлинённого участка тонкой кишки

Удлинение	До 20 см	Более 20 см
Стеноз есть	4	5
Стеноза нет	1	15
Всего	5	20
Процент	80%	25,0%

*Точный тест Фишера ( $p = 0,04$ ). Группы неоднородны*

Как видно из таблицы 23 отношение шансов составляет 12 (больше единицы) – это означает, удлинение тонкой кишки по методике LILT менее чем на 20 см с большой вероятностью вызовет развитие стеноза тонкой кишки.

Таблица 23 – Отношение шансов развития стенозов у пациентов после операции LILT в зависимости от длины удлинённого участка тонкой кишки

Отношение шансов	12
Нижняя граница доверительного интервала 95%	1,074
Верхняя граница доверительного интервала 95%	134,116

Этот феномен связан с технической особенностью операции LILT на последнем этапе которой две сформированные кишечные трубки спиралевидно укладывались и анастомозировались друг с другом и с остальными участками кишечника, при этом, при слишком короткой длине удлинённого сегмента (менее 20 см), кишечные трубки сильно закручивались относительно друг друга, создавая предрасположенность развитию стенозов и клинической картины кишечной непроходимости.

## 6.6 Повторные удлиняющие операции

В отдалённом периоде были изучены 42 пациента, из них 27 были проведены операции LILT и 12 – операции STEP, и 3 – операции LILT+STEP. У 9 пациентов из 42 (21,4%) в отдалённом периоде развилась повторная дилатация тонкой кишки, по поводу которой была проведена повторная удлиняющая операция STEP (reSTEP). Оперативную коррекцию по методике reSTEP проводили у 7 пациентов однократно, у 1 пациента - 2 раза, у 1 пациента – 3 раза.

Всего было проведено 12 операций reSTEP: после операции LILT 6 раз, после операции STEP – 2 раза, после reSTEP – 3 раза, после операции LILT+STEP – 1 раз (Таблица 24).

Таблица 24 – Распределение повторных операций STEP в зависимости от первичной удлиняющей операции

Операция	Повторная операция STEP			
	Всего пациентов	1 раз	2 раза	3 раза
LILT	27	6	1	-
STEP	12	2	-	1
LILT +STEP	3	1	-	-
Всего	42	9	1	1

Причиной проведения операции reSTEP была выраженная повторная дилатация тонкой кишки и клинические проявления транслокации бактерий с развитием сепсиса, разрастание патогенной бактериальной флоры, периодические кишечные кровотечения. Редилатации, по поводу которых проводились reSTEP были у 6 из 27 пациентов (22,2%) после операции LILT и у 5 из 12 случаев (41,6%) после операции STEP.

Стенозы были причинами редилатации в 5 из 6 случаев (83,3%) после операции LILT и в 2 из 5 (40%) после операции STEP (Таблица 25).

Таблица 25 – Распределение повторных операции STEP в зависимости от первичных операций

Операции	Операции		
	LILT	STEP (reSTEP)	LILT +STEP
Всего пациентов	27	12	3
Количество reSTEP	6	5	1
Стенозы	5	2	-
Процент	66%	40%	-

Повторная удлиняющая кишечник операция STEP после операции LILT была выполнена у 2 пациентов в течение первого года, у 1 через 4 года, у 2 через 7 лет и у 1 через 13 лет. Повторная удлиняющая кишечник операция STEP проводилась после операций STEP была выполнена у 1 пациента в течение первого года после удлиняющей операции, в возрасте 1 года и 4 месяцев у 1 пациента, возрасте 2-х лет у одного пациента, 4 лет у одного пациента, 6 лет у одного пациента (Таблица 26).

Таблица 26 – Распределение повторных операций STEP в зависимости от срока прошедшего после первичных операции

Операция	Сроки после предшествующей удлиняющей операции				
	От 6 мес до 1 года	1-3 лет	4-6 лет	7-10 лет	11-13лет
LILT	2	-	1	2	1
STEP	1	2	2	-	-
LILT +STEP	1	-	-	-	-
Всего	4	2	3	2	1

### 6.7 Летальность

Среди 54 оперированных детей в послеоперационном периоде умер один пациент (1,85%). После поведённой операции STEP у пациента в послеоперационном периоде на 4 сутки развилась несостоятельность анастомоза, поэтому пациент был повторно оперирован, несостоятельность анастомоза была ушита. Однако при подготовке пациента к операции (при интубации) произошла

аспирация застойным содержимым желудка, после операции был переведён в отделение интенсивной терапии и, несмотря на проводимые мероприятия, больной умер от пневмонии, сепсиса и полиорганной недостаточности.

В отдалённом послеоперационном периоде умерло 2 из 42 пациентов (4,8%).

В группе LILT пациент умер в возрасте 9 лет, у которого СКК развилась сразу после рождения в результате резекции тонкой кишки по поводу атрезии тонкой кишки. Пациенту в возрасте 8 месяцев была проведена операция LILT, а в возрасте 18 месяцев была произведена операция STEP. Пациент умер через 7 лет после последней удлиняющей кишечник операции. Причиной смерти явился катетер-ассоциированный сепсис, развившийся молниеносно вместе с кишечной непроходимостью. В анамнезе у пациента несколько раз развивалась инфекция катетера Бровиак и эпизоды кишечной непроходимости.

В группе STEP пациент умер в возрасте 3-х лет, у которого СКК развился в первый месяц после рождения в результате резекции тонкой кишки по поводу некротического энтероколита. Больной умер через 4 месяца после проведённой удлиняющей кишечник операции. Причиной смерти стал катетер-ассоциированный сепсис. В анамнезе у пациента несколько раз развивалась инфекция катетера Бровиак и один раз пациент перенёс катетер-ассоциированный сепсис.

Таким образом, в отдалённом периоде в обоих случаях причиной летальных исходов был катетер-ассоциированный сепсис.

## 6.8 Показания и противопоказания для операции LILT и STEP

На основе ретроспективного анализа результатов хирургического лечения 54 детей с СКК, а также на основании анализа литературных данных, были систематизированы (специфицированы) показания и противопоказания к операции LILT и операции STEP (Таблица 27).

Таблица 27 – Показания и противопоказания к операции LILT и к операции STEP

Показания к LILT	Показания к STEP
Синдром короткой кишки	
Дилатация тонкой кишки не менее чем в два раза больше нормального, но не менее 5 см	
Дилатация тонкой кишки, имеющей брыжейку (тощей и подвздошной кишки)	Дилатация двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки
Симметричная дилатация тонкой кишки	Симметричная и несимметричная дилатации тонкой кишки.
Длина расширенного участка тонкой кишки более 20 см	Длина расширенного участка тонкой кишки менее 20 см
	Повторная дилатация тонкой кишки после удлиняющих кишечник операций
Противопоказания к LILT	Противопоказания к STEP
Отсутствие дилатации тонкой кишки	
Выраженная печеночная недостаточность	
Выраженная кахексия, сепсис	
Отсутствие возможности установки туннелированного центрального венозного катетера	
Длина расширенного участка тонкой кишки меньше 20 см	Нежелательно при длине расширенного участка тонкой кишки больше 20 см (результаты LILT лучше).
Несимметричная дилатация тонкой кишки	
Редилатация тонкой кишки после удлиняющих кишечник операций	

После операции LILT повторная дилатация развивается в 2 раза реже, чем после операции STEP. Однако операцию LILT рекомендуется проводить при длине расширенного участка тонкой кишки 20 см и более. Преимуществом STEP

является возможность применения данной операции даже на коротких участках дилатированной кишки (менее 20 см), на несимметрично расширенных участках тонкой кишки, а также на двенадцатиперстной кишке. Кроме того, технически данный метод более простой и в отличие от метода LILT, при операции STEP не вскрывается просвет тонкой кишки (тонкая кишки одновременно разрезается и сшивается сшивающим аппаратом). В случае повторной дилатации на прооперированном участке (независимо от техники LILT или STEP) возможно проведение повторной операции STEP (reSTEP).

Таким образом, анализ полученных данных хирургического лечения СКК позволил нам сформировать следующее заключение:

1. Стеноз тонкой кишки играл роль в развитии дилатации тонкой кишки лишь у 18% пациентов при первичной удлиняющей операции, в остальных случаях дилатация тонкой кишки происходила в результате кишечной адаптации, эти данные полностью совпадают с нашими данными в экспериментах на животных.

2. Величина удлинения тонкой кишки операцией LILT и STEP достоверно не отличались.

3. Проведение комбинированной операции LILT и STEP (LILT+STEP) технически возможно и не создаёт дополнительных интраоперационных рисков.

4. Анализ послеоперационных осложнений после операции LILT показал, что частота стеноза тонкой кишки напрямую зависит от длины удлинённого участка кишки, так при длине менее 20 см частота развития стенозов достоверно выше.

5. Повторная дилатация тонкой кишки после операции STEP возникает чаще, чем при операции LILT.

6. reSTEP может проводиться у пациента несколько раз, потребность в reSTEP может возникнуть на любом сроке после первичной удлиняющей операции.

7. При операциях LILT и STEP и LILT+STEP летальность, связанная с оперативным вмешательством отсутствовала. В раннем послеоперационном периоде смертность составила 1,85%, причинами летальности были пневмония и



сепсис, развившиеся у одного пациента после аспирации содержимым желудка при интубации трахеи во время проведения релапаротомии при несостоятельности анастомоза STEP. В отдалённом периоде летальность составила 4,8%, причиной смертности явился катерер-ассоциированный сепсис.

## ГЛАВА 7 ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА НУТРИТИВНУЮ ПОДДЕРЖКУ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ УДЛИНЯЮЩИХ КИШЕЧНИК ОПЕРАЦИЙ У ДЕТЕЙ С СИНДРОМОМ КОРОТКОЙ КИШКИ

Переход на полное энтеральное питание (отказ от парентерального питания) является важнейшим параметром эффективности проводимой терапии у пациентов с синдромом короткой кишки.

Нами исследована нутритивная поддержка (потребность в парентеральном питании) после удлиняющих кишечник операций в отдаленном периоде у 42 пациентов. Исследование проводилось в сроки от 6 месяцев до 10 лет после проведения удлиняющих кишечник операций. Пациентам было выполнено 27 операций LILT и 12 операции STEP, 3 операции LILT+STEP и 12 операций reSTEP (повторная STEP при редилатации тонкой кишки).

Обследование проводилось регулярно в возрасте от 1 до 10 лет после удлиняющей кишечник операции. После этих оперативных вмешательств перейти на полное энтеральное питание удалось 22 из 42 пациентов (52,4%), остальные 20 (47,6%) находились на частичном парентеральном питании на момент проведения исследования.

После удлиняющей кишечник операции перейти на полное энтеральное питания удалось 59% пациентов после операции LILT и 42% после STEP (Таблица 28).

Таблица 28 – Количество пациентов, которым не требуется парентеральное питание после удлиняющих кишечник операций

Операция	LILT	STEP	LILT+STEP
Всего пациентов	27	12	3
Пациенты, перешедшие на полное энтеральное питание	16	5	1
Процент	59%	42%	33%

Как мы уже описывали выше, удлинение тонкой кишки при помощи операции LILT менее чем на 20 см приводило к развитию стенозов у 4 из 5 пациентов (80%), что значительно ухудшало клиническое состояние пациентов в отдалённом периоде. Этим пациентам были проведены повторные операции для резекции этих стенозов. В связи с этим, мы изучили нутритивный статус пациента в зависимости от типа проведённой операции (LILT или STEP), и от длины удвоенного участка тонкой кишки при операции LILT (менее 20 см или 20 см, и более) (Таблица 29).

Таблица 29 – Количество пациентов, у которых полностью восстановилось энтеральное питание после удлиняющих кишечник операций

Операция	LILT менее 20 см	LILT 20 см и более	STEP
Всего пациентов	6	21	12
Пациенты, перешедшие на полное энтеральное питание	2	14	5
Процент	33,3%	67%	42%

Приведённые в таблице 6 данные показывают, что восстановить полное энтеральное питание после операции LILT при удлинении тонкой кишки на 20 см и более удалось у 67%, после операции LILT при удлинении участка тонкой кишки менее 20 см удалось лишь у 33%.

Как видно из таблицы 30 отношение шансов составляет 4 (больше единицы), однако из-за малого объема доверительный интервал достаточно большой и включает в себя значение 1. Данные результаты позволяют предположить, что удлинение тонкой кишки по методике LILT более чем на 20 см с большой вероятностью позволит перейти на полное энтеральное питание, чем удлинение тонкой кишки по методике LILT менее чем на 20 см.

Таблица 30 – Отношение шансов полностью восстановилось энтеральное питание после операции LILT в зависимости от длины удвоенного участка тонкой кишки (менее 20 см и более 20 см)

Отношение шансов	4
Нижняя граница доверительного интервала 95%	0,584
Верхняя граница доверительного интервала 95%	27,412

При детальном изучении установлено, что полное энтеральное питание было восстановлено через год после удлиняющей кишечник операции у 12-и пациентов, в течение последующих трёх лет у 6-и пациентов и через 5 лет и более у 4-х пациентов (Таблица 31).

Таблица 31 – Количество пациентов, которым не требуется парентеральное питание после удлиняющих кишечник операций в зависимости от времени прошедшего после удлиняющей операции

Количество пациентов, перешедших на энтеральное питание	1 год	3 года	5 лет и более	Всего
LILT	11	2	2	16
STEP	1	3	2	5
LILT+STEP	-	1	-	1
Всего	12	6	4	22

Нами проанализировано влияние илеоцекального клапана на статус нутритивной поддержки пациентов. Из 42 обследованных пациентов у 4 присутствовал илеоцекальный клапан. В течение года после удлиняющей кишечник операции 3 из 4 пациентов (75%) были переведены на полное энтеральное питание, двум из них была проведена операция LILT, одному пациенту операция STEP. У всех пациентов тонкую кишку удалось удлинить более чем на 20 см, после удлинения длина тонкой кишки составила от 49 до 97 см. Удлиняющую кишечник операцию пациентам проводили в возрасте 2-3 года. Один пациент, спустя 3 года, остался на частичном парентеральном питании, длина оставшейся тонкой кишки у него составляла 16 см, которая была удвоена

при помощи операции LILT в возрасте 16 месяцев, через 3 года он был оперирован по поводу непроходимости кишечника, было резецировано 2 стеноза тонкой кишки.

Проанализировано также время перехода на энтеральное питание в зависимости от наличия толстой кишки и редилатации тонкой кишки (Таблица 32).

Таблица 32 – Время перехода на энтеральное питание в зависимости от наличия толстой кишки и редилатации тонкой кишки

Количество пациентов, перешедших на энтеральное питание	1 год	3 года	5 лет и более
Всего пациентов	12	6	4
Толстая кишка присутствовала полностью	3	1	-
Присутствовало 2/3 толстой кишки	3	1	1
Присутствовало половина толстой кишки	6	3	1
Менее трети толстой кишки или полное отсутствие	-	1	2
Редилатация	-	1	3

Пациенты, которые восстановили полное энтеральное питание в течение первого года после перенесённой удлиняющей операции.

Среди пациентов, которые восстановили полное энтеральное питание в течение года после перенесённой операции, средний возраст составил 1 год 10 месяцев. Длина тонкой кишки после удлиняющей операции составила в среднем  $76 \pm 35,6$  см.

У всех пациентов присутствовала толстая кишки, так у 3 из них присутствовала полностью тонкая кишка с илеоцекальным клапаном, у троих пациентов – 2/3 толстой кишки и у 6-х – половина толстой кишки. Ни у одного не развилась редилатация и не проводилась повторная удлиняющая операция.

Пациенты, которые восстановили полное энтеральное питание в течение последующих 3-х лет после перенесённой удлиняющей операции.

Среди пациентов данной группы средний возраст пациентов, которым проводилась удлиняющая кишечник операция, составил 2 года 4 месяца. Длина тонкой кишки после удлинения колебалась от 43 см до 150 см и в среднем составила  $82,8 \pm 42,2$  см. У одного пациента толстая кишка присутствовала полностью, у одного присутствовало более  $2/3$  толстой кишки, у 3-х присутствовало 50% тонкой кишки и у одного было менее трети толстой кишки. Илеоцекального клапана не было ни у одного пациента. У одного пациента развилась редилатация тонкой кишки.

Пациенты, которые восстановили полное энтеральное питание в течение через 5 и более лет после перенесённой удлиняющей операции

Среди пациентов, которые восстановили полное энтеральное питание через 5 и более лет удлиняющая кишечник операция проводилась в среднем в возрасте 1 год и 9 месяцев. Средняя длина тонкой кишки после удлинения составила  $85,3 \pm 15,4$  см (от 66 см до 100 см).

Ни у одного пациента толстая кишка не присутствовала полностью, у одного пациента составляла более  $2/3$  толстой кишки, у одного – 50%, у 1 менее 30% толстой кишки, у 1 толстая кишка отсутствовала полностью. У трёх пациентов развилась редилатация тонкой кишки.

Из приведённых выше данных видно, что несмотря на то, что длина тонкой кишки после удлинения во всех трёх группах колебалась от 76 до 86 см и достоверно не отличалась, переход на полное энтеральное питание происходил через разное время после операции и зависел от наличия толстой кишки. Наиболее быстро (в течение одного года) восстановили полное энтеральное питание преимущественно пациенты, у которых присутствовала вся толстая кишка и те, у которых было более половины тонкой кишки. Пациентам, которые восстановили полное энтеральное питание через 3 года, была преимущественно сохранена половина толстой кишки. Пациенты с наличием менее трети толстой кишки или с её отсутствием требовали более длительного периода времени для восстановления полного энтерального питания (5 лет и более). У пациентов, у

которых развилась редилатация толстой кишки, также переход на энтеральное питание требовал более длительного времени.

Наши исследования показывают, что сохранённая толстая кишка является важным фактором, влияющим на восстановление энтерального питания.

#### Анализ по Каплан-Майеру

Для того, чтобы оценить статус нутритивной поддержки (потребность в парентеральном питании) у пациентов с учётом фактора времени, был проведён анализ по Каплан-Майеру.

Было рассмотрено влияние типа оперативного вмешательства (LILT или STEP) и длины удвоенного участка тонкой кишки при операции LILT на частоту отказа от парентерального питания (Рисунок 43).

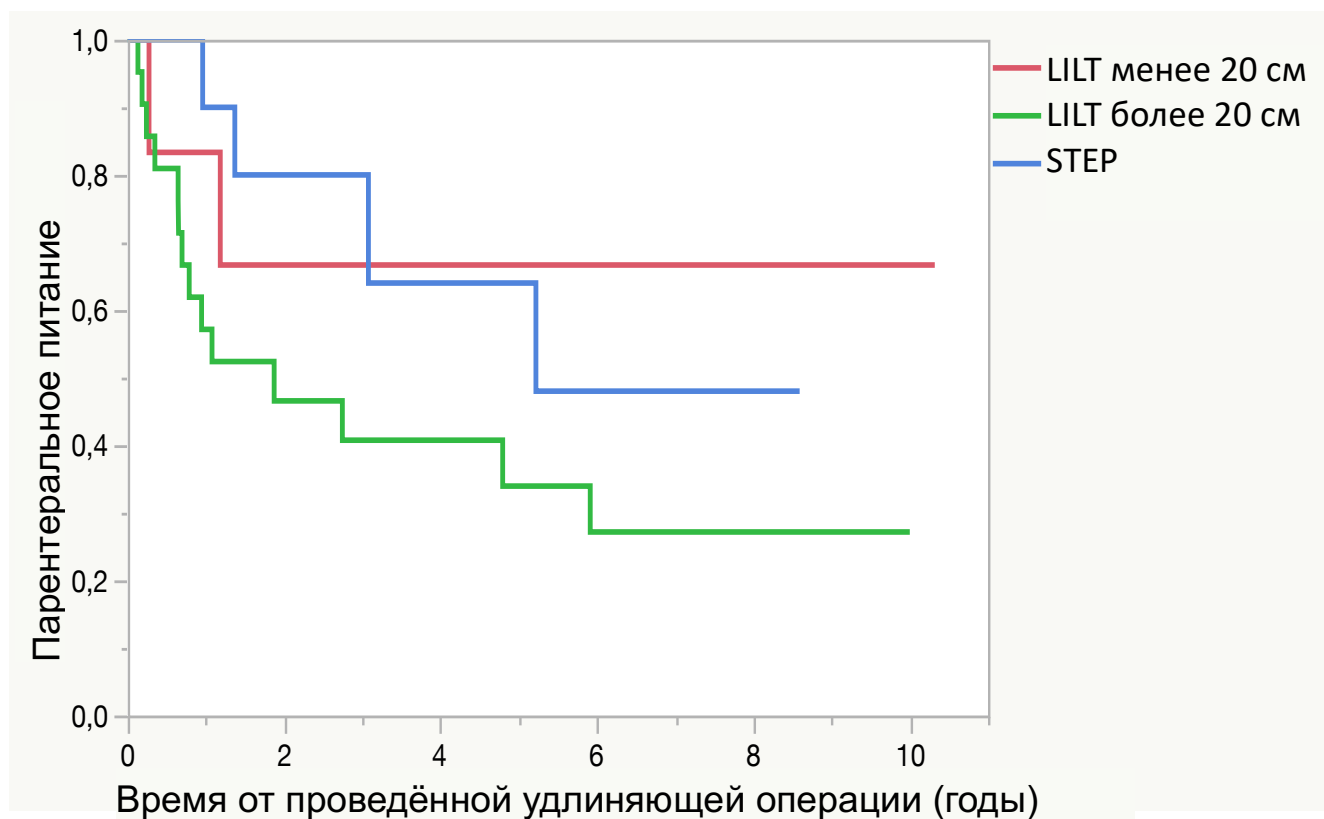


Рисунок 43 – Отказ от парентерального питания у пациентов, прооперированных по методике LILT и методике STEP. Анализ по Каплан-Майеру.

При удлинении тонкой кишки более чем на 20 см при помощи операции LILT потребность в парентеральном питании пропадала наиболее быстро. После операции STEP у большинства больных отказ от парентерального питания проходил медленнее. После удлинения тонкой кишки при помощи операции LILT менее чем на 20 см наблюдались наихудшие результаты – наибольшее число нуждающихся в парентеральном питании пациентов, которые через год после операции не показывали положительной динамики.

Следующим важным фактором является наличие илеоцекального клапана. Мы исследовали его влияние на переход от парентерального питания к полному энтеральному питанию (Рисунок 44).

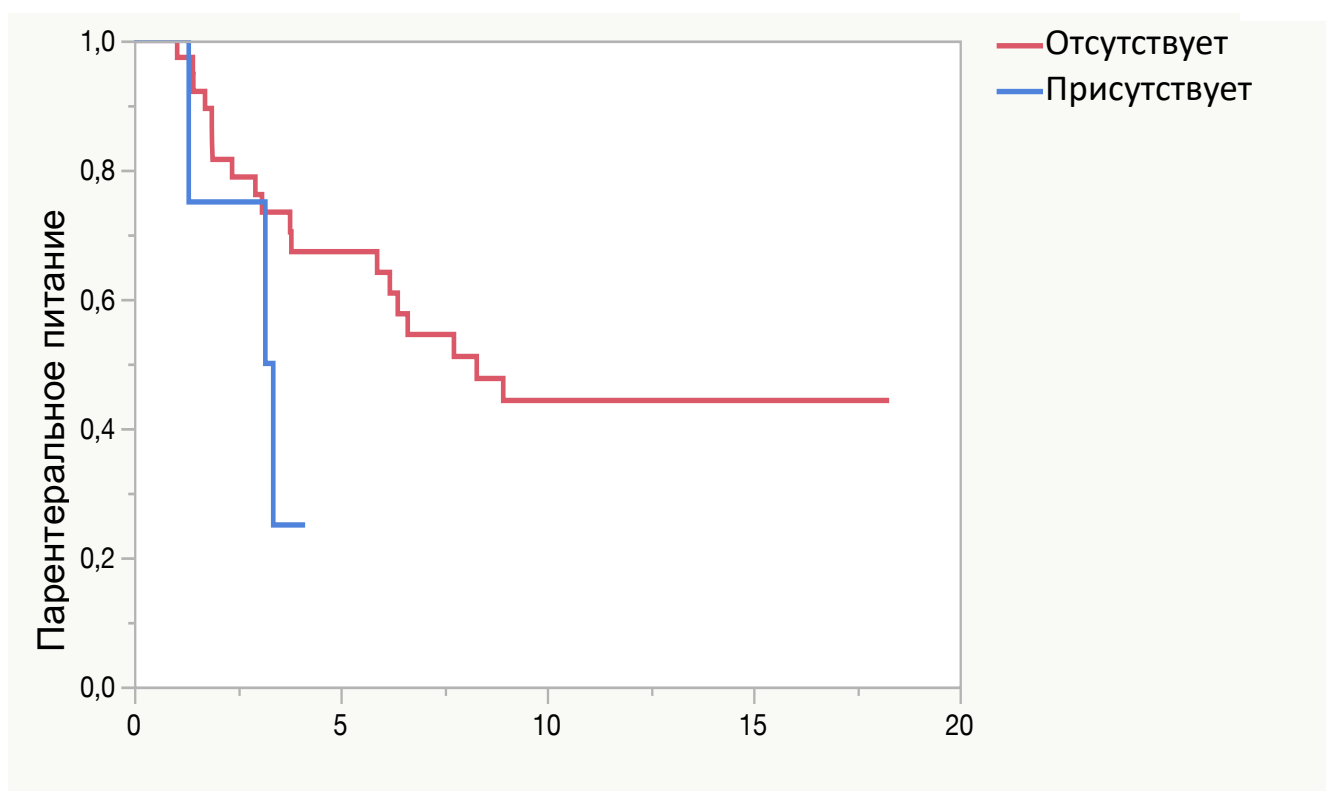


Рисунок 44 – Отказ от парентерального питания в зависимости от наличия илеоцекального клапана у пациентов с СКК, у которых проводились удлиняющие кишечник операции. Анализ по Каплан-Майеру.

Как видно из приведённых данных пациенты, у которых имеется илеоцекальный клапан намного быстрее и эффективнее переходят на полное



энтеральное питание. Из-за небольшого объема выборки разница не была статистически достоверной.

Нами исследовано влияние толстой кишки на переход от парентерального питания к полному энтеральному питанию (Рисунок 45).

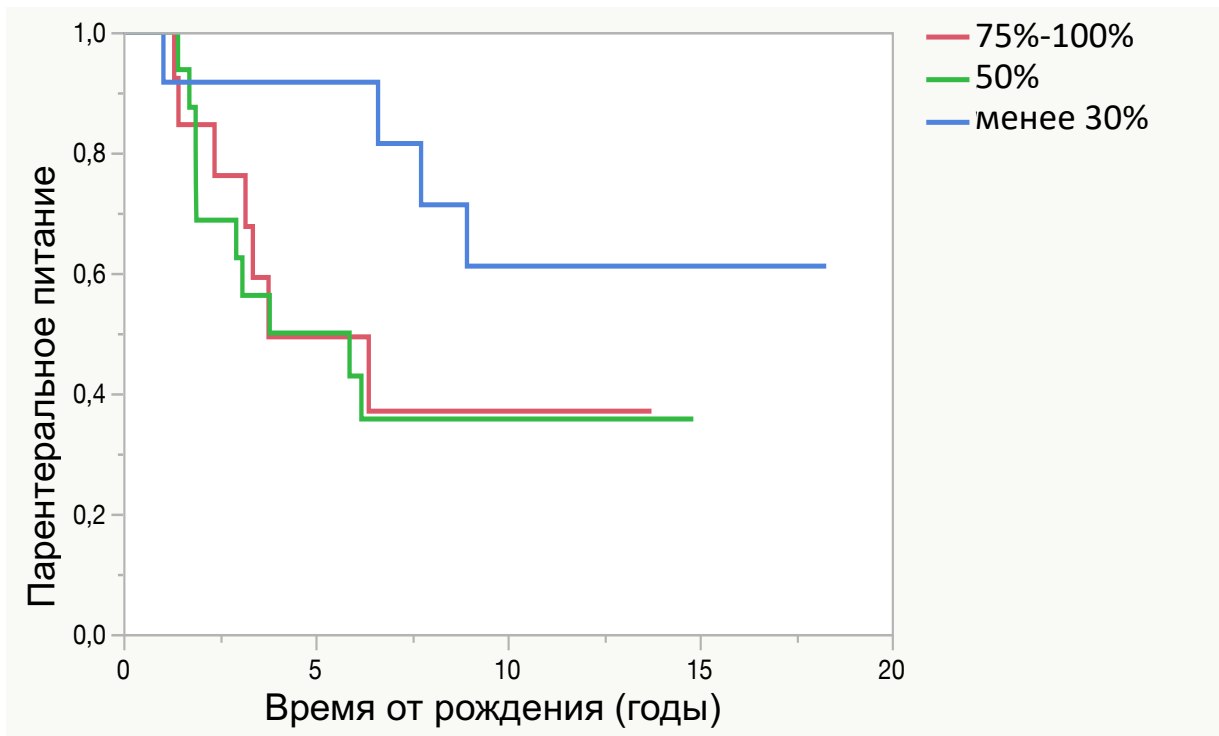


Рисунок 45 – Отказ от парентерального питания в зависимости от наличия толстой кишки у пациентов с СКК, у которых проводились удлиняющие кишечник операции. Анализ по Каплан-Майеру.

Среди пациентов, у имевших менее трети толстой кишки, через 6 лет после развития СКК 90% всё ещё нуждались в парентеральном питании, через 15 лет нуждались в парентеральном питании 60%. Пациенты, у которых присутствовало 50% и более толстой кишки, показали сходные результаты с пациентами, у которых присутствовала вся толстая кишка: через 6 лет лишь 40% нуждались в парентеральном питании. Анализ по Каплан-Майеру выявил достоверное ( $p=0,0467$ ) влияние толстой кишки на длительность применения парентерального питания у пациентов с СКК (Рисунок 46).

Наличие толстой кишки является важным фактором, который способствует отказу от парентерального питания и переходу на полное энтеральное питание.

Повторная дилатация (редилатация) тонкой кишки встречалась после операции LILT у 6 из 27 пациентов (22,2%), после операции STEP у 5 из 12 (41,6%) и у одного после комбинированной операции LILT+STEP (33,3%). Под редилатацией мы понимали повторное расширение тонкой кишки, при которой была произведена повторная удлиняющая операция STEP.

Повторная дилатация тонкой кишки при СКК возникала в два раза чаще после операции STEP, чем после операции LILT у пациентов, у которых первичным диагнозом был гастрошизис. (Таблица 33).

Таблица 33 – Количество пациентов, у которых развилась редилатация тонкой кишки в зависимости от первоначального заболевания и проведённой удлиняющей кишечник операции (пациенты с патологией/всего пациентов в группе)

Редилатация	После LILT	После STEP	После LILT+STEP	Всего
Гастрошизис	4/13 (30,7%)	3/5 (60%)	1	8/19 (42%)
НЯК	1/4 (25%)	1/7 (14,2%)	-	2/11 (18%)
Атрезия	1/7 (14,2%)	1/2 (50%)	-	2/9 (22%)
Заворот	-	-	-	-

Мы провели анализ влияния редилатации тонкой кишки на отказ от парентерального питания (Рисунок 46).

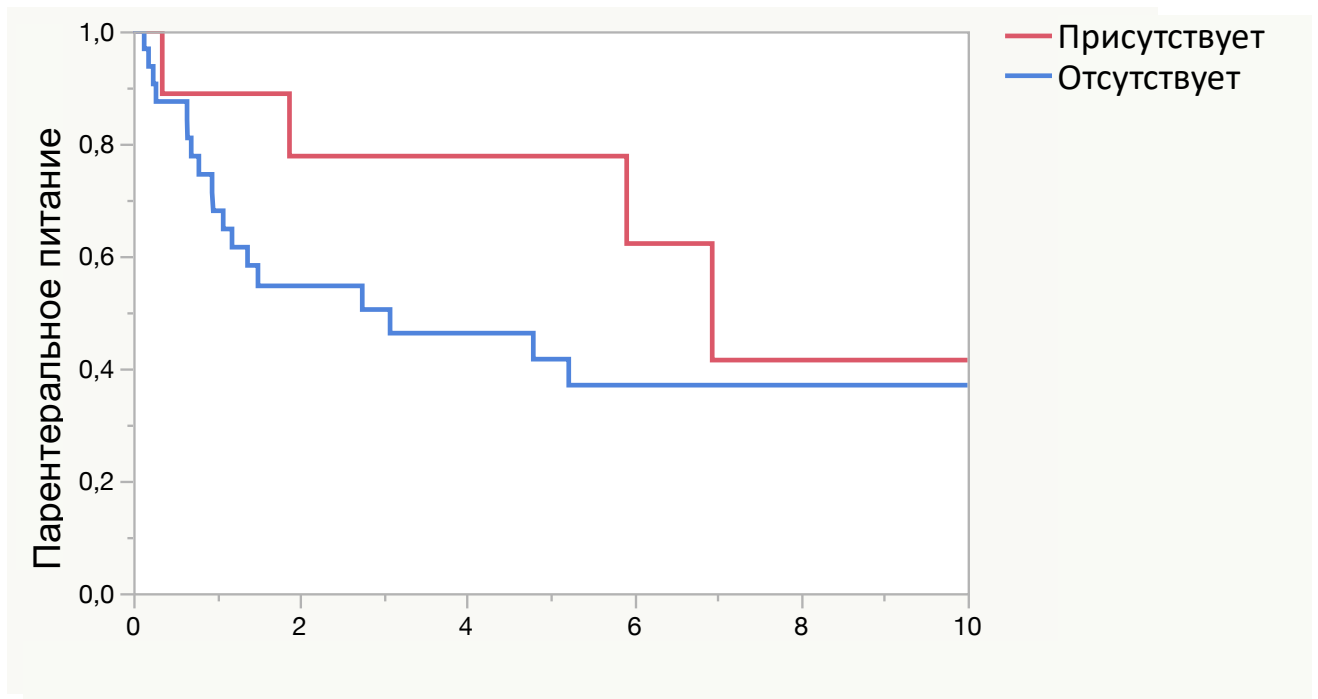


Рисунок 46 – Отказ от парентерального питания в зависимости от развития редилатации тонкой кишки у пациентов с СКК, у которых проводились удлиняющие кишечник операции. Анализ по Каплан-Майеру.

Данные показали, что при редилатации тонкой кишки восстановление полного энтерального питания происходит на 6-7 лет позже.

Нами проанализировано влияние длины тонкой кишки после проведения удлиняющей кишечник операций на статус нутритивной поддержки пациентов. Как было показано выше, на восстановление энтерального питания у пациента с СКК оказывают влияние многие факторы. Для того, чтобы нивелировать влияние этих факторов на результаты исследования из 42 детей, обследованных в отдалённом периоде, мы выбрали 21 пациента, которым были проведены удлиняющие кишечник операции в возрасте до 3-х лет, у которых имелось 50% и более толстой кишки и не развилась редилатация тонкой кишки. Была изучена зависимость от парентерального питания через 18 месяцев после проведения удлиняющей кишечник операции (Рисунок 47).

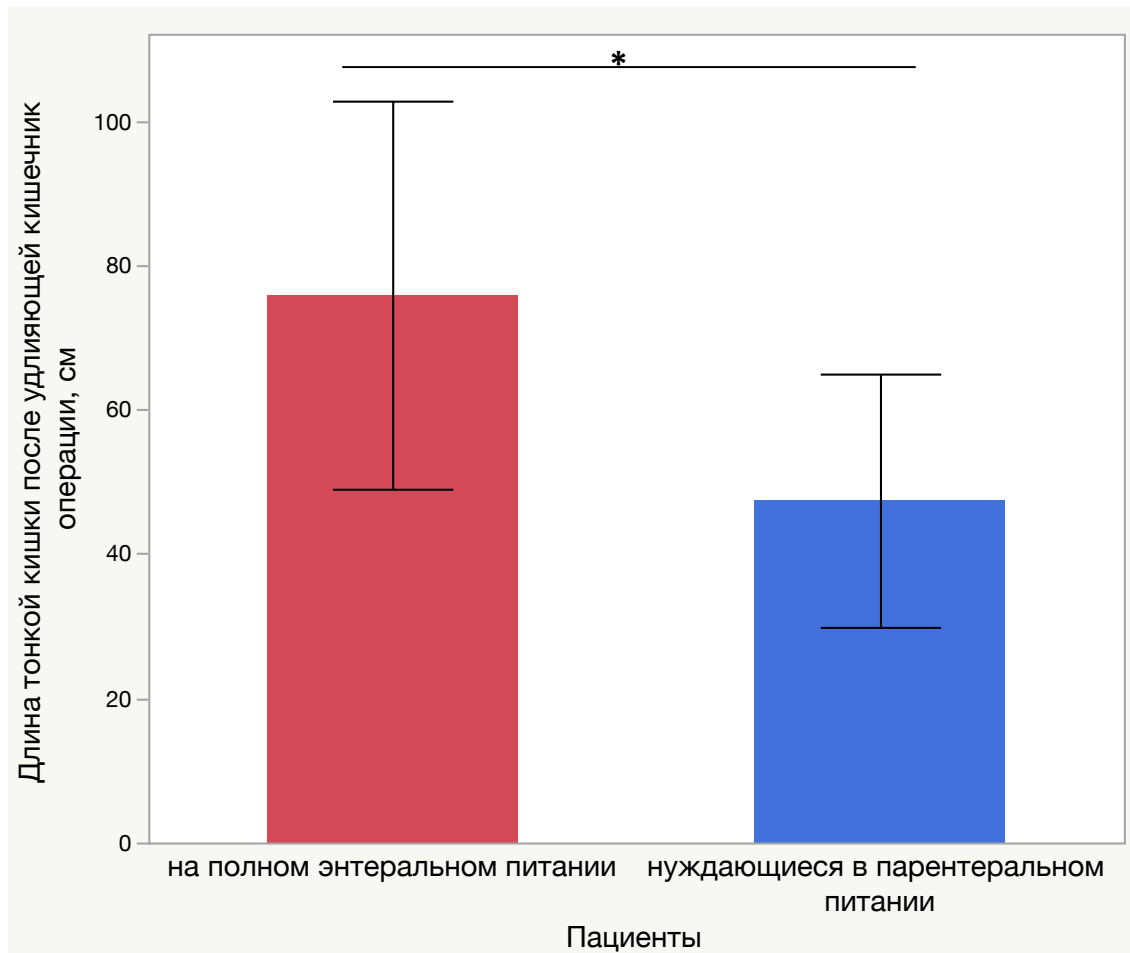


Рисунок 47– Переход на полное энтеральное питание через 18 месяцев после проведения удлиняющей кишечник операции в зависимости от длины тонкой кишки после удлиняющей кишечник операции. Значения: среднее и стандартное отклонение. Критерии Стьюдента:

\*  $p < 0,0049$ .

Из рисунка 47 видно, что через 18 месяцев после удлинения тонкой кишки до  $75,9 \pm 26,87$  см выполненной пациентам в возрасте до 3-х лет вероятность перейти на полное энтеральное питание статистически достоверно выше ( $p = 0,0049$ ), по сравнению с пациентами, у которых удалось увеличить длину тонкой кишки лишь до  $47,4 \pm 17,53$  см при условии наличия у пациентов более половины толстой кишки и отсутствия редиляции тонкой кишки.

Таким образом, отказ от проведения парентерального питания и переход только на энтеральное питание при операции LILT составил 67% при удлинении более 20 см тонкой кишки и 33% при удлинении участка тонкой кишки менее 20 см. При операции STEP отказ от парентерального питания составил 42%.

Однако наше исследование показало, что на полный отказ от парентерального питания влияют и другие факторы.

Общие факторы:

- Наличие илеоцекального клапана является положительным прогностическим фактором. Все пациенты с илеоцекальным клапаном полностью отказались от парентерального питания в течение года после проведения удлиняющей кишечник операции.
- Наличие более половины (50%) толстой кишки является положительным прогностическим фактором. Наши исследования показали, что у всех пациентов, которые отказались от парентерального питания в течение первого года после удлиняющей операции и у 4 из 5, которые отказались от парентерального питания в последующие 3 года присутствовало 50% и более толстой кишки. Анализ по Каплан-Майеру выявил статистически достоверную разницу, что при наличии менее 30% толстой кишки восстановление полного энтерального питания происходит достоверно медленнее.

Факторы, связанные с хирургическим лечением:

- Длина участка тонкой кишки для удлинения. При длине расширенного участка тонкой кишки менее 20 см, мы рекомендуем проводить операцию STEP, при длине более 20 см – LILT.
- Редилатация тонкой кишки является прогностически неблагоприятным фактором.
- У пациентов с первичным диагнозом гастрошизис: после операции STEP редилатация тонкой кишки развивается в два раза чаще, чем после LILT.
- Длина тонкой кишки после удлиняющей кишечник операции  $75,9 \pm 26,87$  см, проведённой пациентам в возрасте до 3-х лет является благоприятным прогностическим фактором перехода на полное энтеральное питания в течение 18 месяцев после удлиняющей операции у пациентов, имеющих 50% и более толстой кишки, и без редилатации тонкой кишки.

### Временной фактор

- У 5 пациентов отказ от парентерального питания наступил через 8-10 лет после проведенной удлиняющей кишечник операции, поэтому период наблюдения за пациентами с СКК должен быть не менее 10 лет.

Проведенный нами анализ отдаленных результатов лечения выявил, что после удлиняющих кишечник операций 20 из 42 пациентов (47,6%) остались на парентеральном питании. Преимущественно это были пациенты, у которых отсутствовал илеоцекальный клапан, присутствовало не более 30% толстой кишки. Полученные нами результаты, а также описанная в литературе низкая эффективность трансплантации кишечника, обосновывают необходимость создания биоинженерной тонкой кишки при помощи тканевой инженерии и применения её в лечении детей с СКК и хронической кишечной недостаточностью.

ГЛАВА 8 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЖМЫШЕЧНОГО НЕРВНОГО  
СПЛЕТЕНИЯ В ТРЁХМЕРНОМ МАТРИКСЕ КАК КЛЮЧЕВОГО ЭЛЕМЕНТА  
ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ТОНКОЙ КИШКИ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ)

Тканевая инженерия раскрывает принципиально новый подход к лечению пациентов с СКК и хронической кишечной недостаточностью [3, 68, 135]. Однако для функционирования биоинженерной кишки, необходимым условием является наличие нервной системы в кишечнике. Иннервированный мышечный слой является ключевым элементом для создания функционального кишечника [106, 138, 180]. До сих пор не существует работ, в которых были бы сконструированы компоненты кишечной нервной системы, способные функционировать и иннервировать мышечный слой кишечной стенки. В связи с этим, мы разработали методику культивирования клеток нервной системы кишечника в трёхмерной среде, обладающих способностью формировать нервные сплетения.

Живая культура клеток нервной системы кишечника в NuStem®-С матриксе была изучена под микроскопом на восьмые сутки выращивания (Рисунок 48). В NuStem®-С матриксе были отчетливо видны клетки нервной системы кишечника со сформировавшимися отростками. Клетки образовали взаимосвязи, как с другими клетками, так и с нейросферами (скоплениями стволовых нервных клеток).



Рисунок 48 – Живая культура клеток нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Световая микроскопия.

Для определения принадлежности клеток к нейронам, было проведено флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание фиксированных культур клеток.

Из-за того, что в отличие от обычных 2-х мерных культур, полученные нами клетки, выращивались в трёхмерном матриксе, возникла необходимость характеристики еще одного параметра – глубины. В связи с этим, для определения оптических слоев в трёхмерной культуре клеток нами был использован конфокальный микроскоп. При микроскопировании культур клеток нервной системы кишечника, окрашенных антителом  $\beta$  Tubulin III (идентификация нейронов) и DRAQ5 (идентификация ядер клеток), были обнаружены небольшие скопления близко расположенных к друг другу нейронов, как на рисунке 49, где определяются ядра 4-х нейронов, некоторые отростки которых объединены в один пучок, морфологически похожие на аксоны, другие, расходящиеся отдельно и ветвящиеся, морфологически похожие на дендриты.



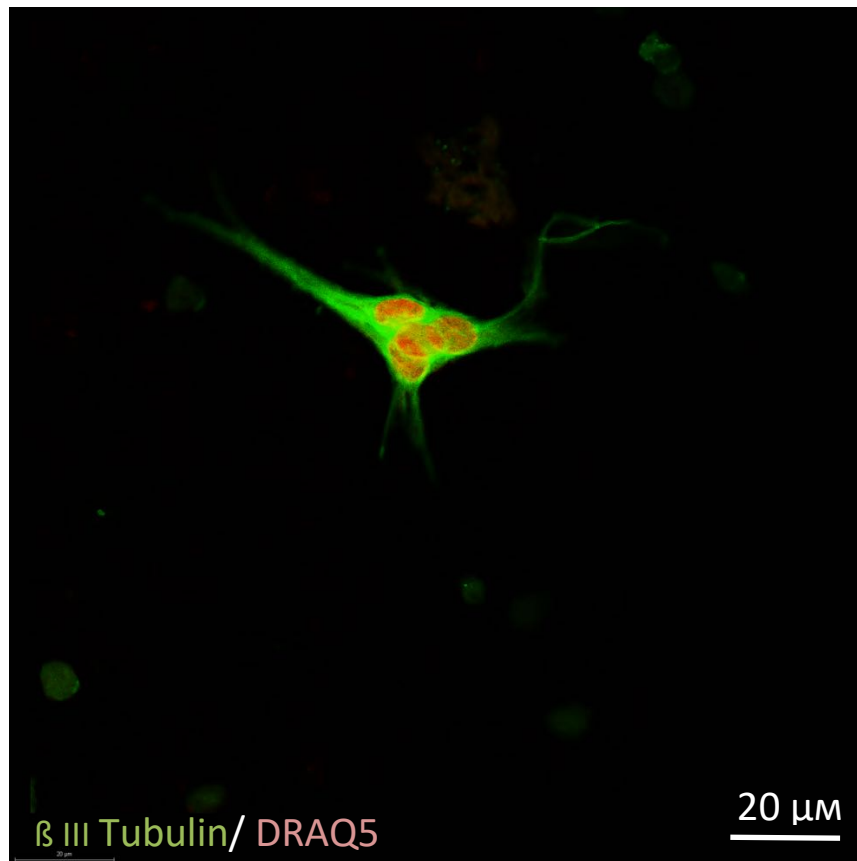


Рисунок 49 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Небольшое скопление нейронов. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Также были обнаружены большие скопления нейронов. При этом некоторые нейроны располагались близко друг к другу (Рисунок 50), а другие на некотором расстоянии, однако все нейроны были объединены между собой. У двух нейронов отчетливо видны широкие отростки, морфологически похожие на аксоны. Кроме того, изображены множества тонких и ветвящихся отростков, морфологически напоминающих дендриты.

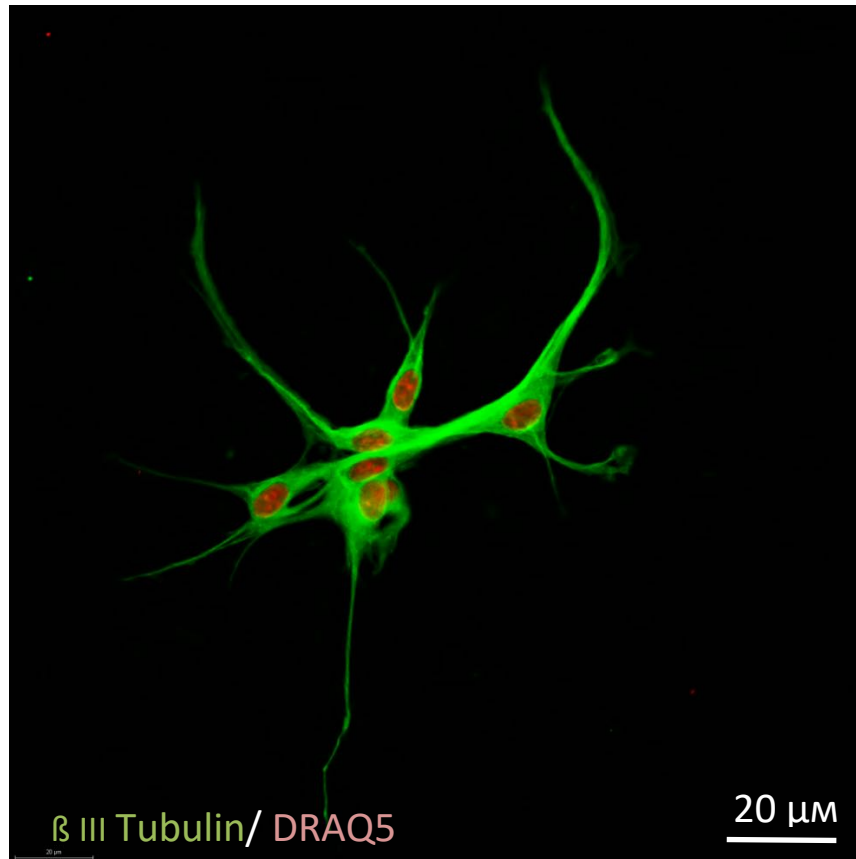


Рисунок 50 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-C матриксе. Скопление нейронов. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III)– тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Были также обнаружены большие скопления нейронов, напоминающие нервное сплетение. На рисунке 51 отчётливо видны только нейроны, находящиеся в центральной части сплетения, а нервные клетки в других плоскостях изображены неотчётливо или совсем не видны.

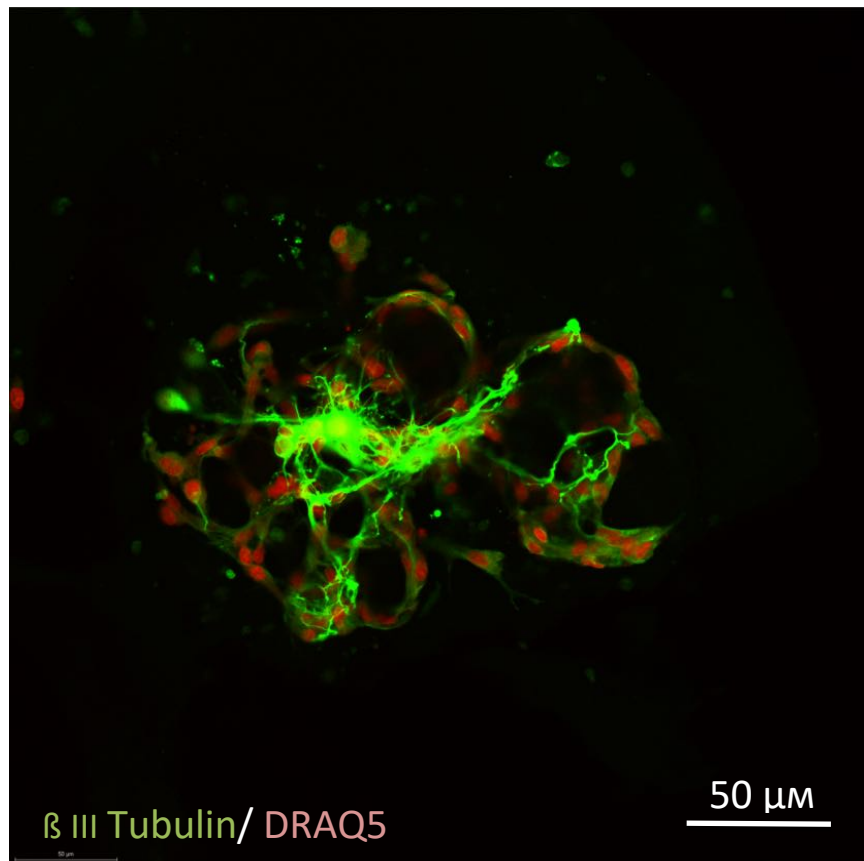


Рисунок 51 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Большие скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Применение конфокальной микроскопии позволило получить серию изображений на различных глубинах фокальной плоскости и затем реконструировать из них трехмерное изображение (Рисунок 52). На трёхмерной реконструкции сплетения отчётливо видны нейроны, сплетённые в сложную сеть. Так как DRAQ5 окрашивает ядра всех клеток, а не только нейронов, то наличие окрашенных ядер клеток (красного цвета) просто «висящих» на реконструкции, без окружающей их тела нервной клетки (зелёного цвета) показывает, что в данном сплетении присутствуют и другие типы клеток, наиболее вероятно, это глиальные клетки.

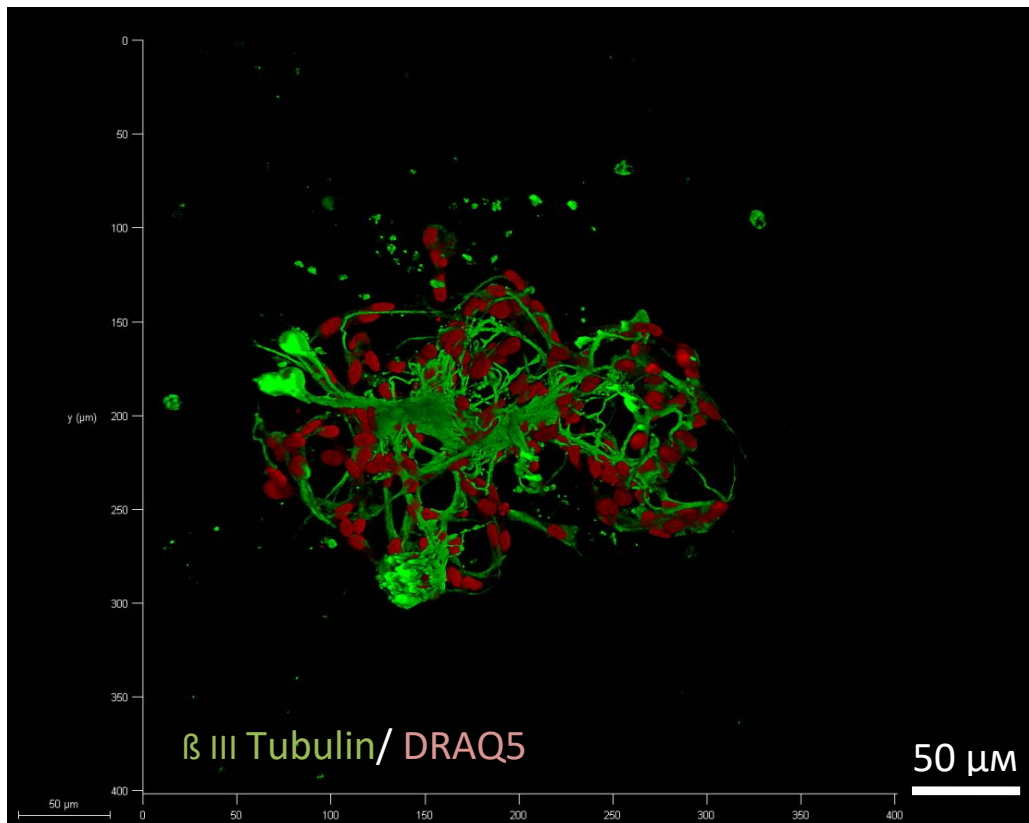


Рисунок 52 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-C матриксе. Трёхмерная реконструкция большого скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) - ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Для оценки трёхмерности сплетения была проведена реконструкция серии изображений с цветовым кодированием клеток по глубине нахождения в сплетении, где цвет клеток программно изменялся от тёмно-синего – для клеток, находящихся наиболее глубоко, до тёмно-красного – для клеток, находящихся наиболее высоко (Рисунок 53). Высота сплетения была более 50 мкм.

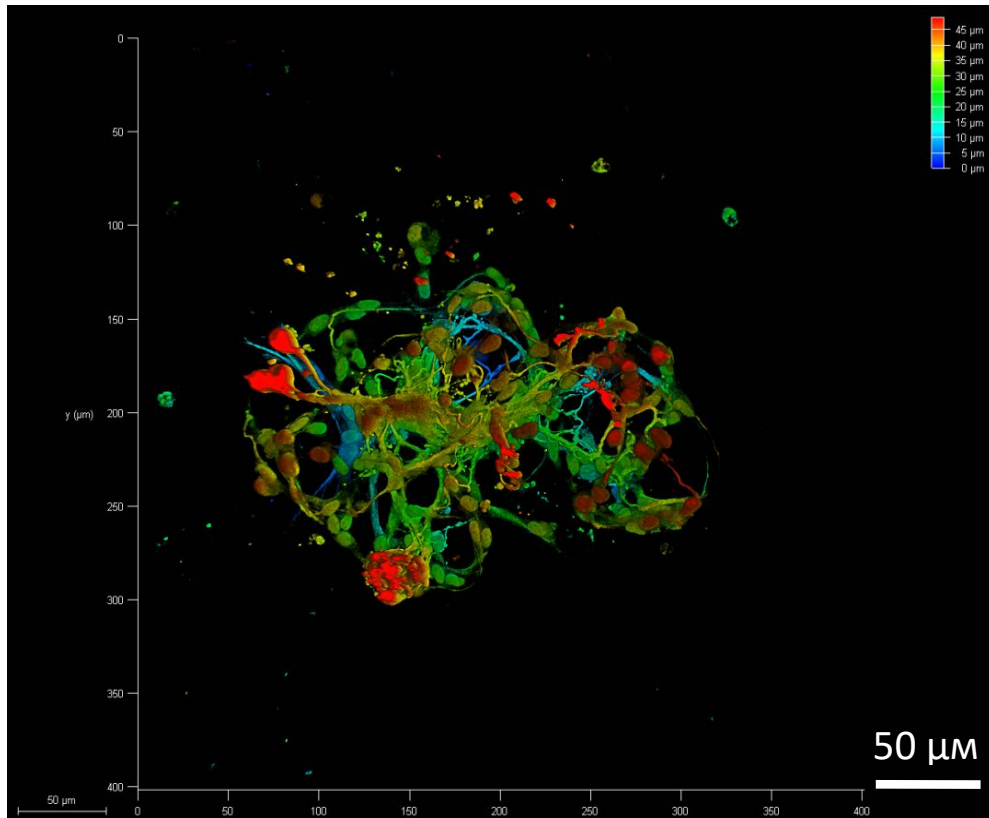


Рисунок 53 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов с программным цветовым кодированием глубины. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание.

Трёхмерная реконструкция этого большого скопления нейронов, связанных между собой и формировавших нервное сплетение, позволила измерить размер сплетения, который составил 200 µm на 250 µm на 50µm (Рисунок 54). На данной реконструкции сплетение видно во всех трёх осях пространства (x, y, z) без искусственного цветового кодирования глубины. Эта реконструкция, без программного кодирования глубины, показывает трёхмерность и сложность структуры выращенного в HyStem®-С матриксе сплетения нервных клеток кишечника, что позволяет лучше определить взаимное расположение нервных клеток и ядер в трёхмерном пространстве.

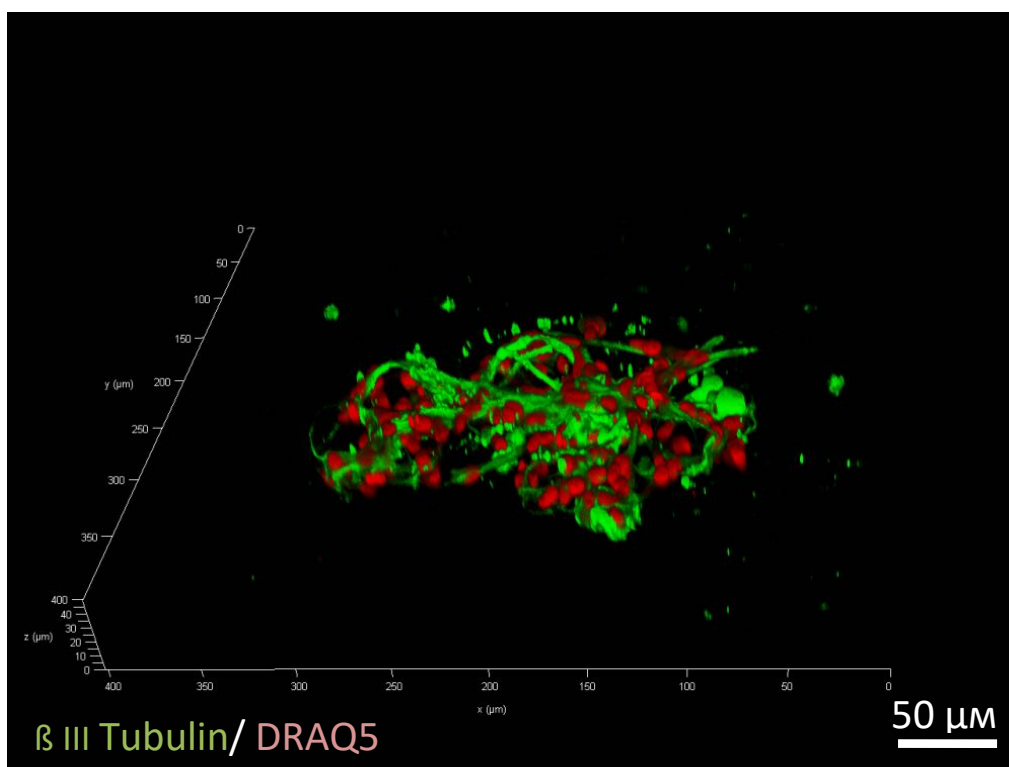


Рисунок 54 – Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-C матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов, рассмотренная под углом во всех трёх осях пространства (x, y, z). Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет ( $\beta$  Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Тканевая инженерия органов и тканей является потенциальным новым методом лечения многих заболеваний, связанных с недостаточностью или потерей органов и тканей, и позволит решить проблемы трансплантации органов, таких, как недостаток доноров и отторжение тканей.

Изучением возможности искусственного выращивания кишки занимаются многие исследователи [369]. Работы в этой области в основном сконцентрированы на создании слизистого или мышечного слоя тонкой кишки. При этом авторы утверждают, что создание функциональной нервной системы кишечника является ключевым моментом для использования в тканевой инженерии [147, 157].

В доступной на настоящий момент литературе не описано выращивание дифференцированных и взаимодействующих нервных клеток кишечника в трёхмерной среде с целью использования их в тканевой инженерии. Методика по

выделению нервных клеток кишечника, описанная Schäfer с соавторами [85], позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника только на плоскости. Однако, для тканевой инженерии ключевым условием является культивирование клеток в трехмерных средах, что, как мы считаем, удалось выполнить в нашей работе, благодаря выбору оптимального матрикса и подбору определенных условий для выживания и пролиферации клеток. Применение конфокальной микроскопии и иммуноспецифического окрашивания клеток позволило не только доказать, что выращенные клетки являются нейронами, но и обнаружить взаимосвязи между клетками, и выявить комплексную трёхмерную структуру сплетений клеток в трёхмерной среде. В представленной работе показана возможность выращивания клеток нервной системы кишечника, формирующих друг с другом связи, а также нервные сплетения *in vitro* в трёхмерной среде.

Таким образом, разработанный метод позволяет вырастить клетки нервной системы кишечника, формирующих связи друг с другом в трёхмерной среде *in vitro*, что может быть использовано для создания нервной системы кишечника при выращивании стенки тонкой кишки путем тканевой инженерии. Дальнейшие исследования лежат в плоскости изучения функциональности выращенных в трёхмерных средах клеток и совместного выращивания клеток нервной системы кишечника с другими типами клеток в трёхмерных средах.

## ГЛАВА 9 СОЗДАНИЕ ИННЕРВИРОВАННОГО МЫШЕЧНОГО СЛОЯ ТОНКОЙ КИШКИ, СПОСОБНОГО К СОКРАЩЕНИЯМ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ТОНКОЙ КИШКИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ)

Функциональный иннервированный мышечный слой является важной составной частью, как нативной стенки тонкой кишки, так и биоинженерной тонкой кишки. Чтобы искусственный кишечник функционировал, как автономный, он должен обладать перистальтической активностью. Межмышечные нервные сплетения являются ключевой составной частью мышечных слоёв тонкой кишки, позволяющей мышечным слоям, координированно сокращаться и продвигать содержимое по кишечнику [106, 138, 334].

На настоящий момент не существует работ, в которых был бы выращен иннервированный мышечный слой тонкой кишки, способный к координированным сокращениям. В связи с этим, опираясь на результаты наших исследований по выращиванию межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе, мы разработали метод выращивания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки *in vitro*, способного к сокращениям и изучили взаимосвязи между энтеральной нервной системой и гладкомышечными клетками в полученной биоинженерной мышечной ткани.

Были исследованы различные условия выращивания клеток: содержание углекислого газа в инкубаторе, разнообразные питательные растворы, разные концентрации клеток (Рисунок 55).



**Условия:**

1) CO<sub>2</sub> = 5% t = 37°C

**Культуральные растворы:**

1) Neurobasal +BSA+Антибиотики

2) DMEM-F12 +BSA+ Антибиотики

3) Neurobasal +BSA+ Антибиотики

4) DMEM-F12 +BSA+ Антибиотики + Факторы роста

5) DMEM-F12 +BSA+ Антибиотики + Факторы роста+Сыворотка

**Концентрация клеток:**

1) Мышечные клетки от 10 000 до 60 000 клеток на 100  $\mu$ л

2) Клетки, выделенные из нервной системы кишечника 20 000 до 100 000 клеток на 100  $\mu$ л

Рисунок 55 – Условия, в которых выращивали культуры мышечных клеток и клеток нервной системы кишечника. Neurobasal medium и DMEM-F12 – первичные культуральные среды к которым был добавлен глютамин и меркаптоэтанол и B27 Supplement (Gibco). BSA-Сывороточный альбумин телёнка. Антибиотики - метронидазол, гентамицин. Факторы роста – GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), EGF (epidermal growth factor), bFGF (fibroblast growth factor-basic). Сыворотка – фетальная бычья сыворотка.

В результате наших экспериментов мы выявили оптимальные условия для роста мышечных и клеток межмышечного нервного сплетения (энтеральной нервной системы) в трёхмерном матриксе. Оптимальные условия были следующими: концентрация углекислого газа в инкубаторе CO<sub>2</sub>=5%, температура в инкубаторе t=37 °C, культуральный раствор DMEM-F12 с добавлением глютамина, меркаптоэтанол, B27 Supplement, сывороточного альбумина телёнка, антибиотиков (метронидазол, гентамицин), факторов роста (GDNF, EGF, bFGF) и фетальной бычьей сыворотки. Оптимальная концентрация мышечных клеток 50000 клеток на 100 мкл матрикса, клеток энтеральной нервной системы 100000 клеток. Мы определили оптимальный состав культуральной среды: 100 мл Neurobasal medium (Gibco) или DMEM-F12 (Gibco) добавляли 1 мл альбумина (Sigma-Aldrich), 100 мкл раствора метронидазола (500 мг/100 мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глютамина (Sigma-Aldrich) и 100 мкл меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 2 мл B27 Supplement (Gibco), 100 мкл GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (1 ng/ml), 100 мкл EGF (epidermal growth

factor) (1 ng/ml) и 200 мкл bFGF (fibroblast growth factor-basic) (1 ng/ml), 2 мл фетальной бычьей сыворотки (Gibco).

Нами были изучены различные типы взаимного расположения мышечных клеток и клеток нервной системы кишечника в матриксе (Рисунок 56). В результате нам удалось выявить оптимальный тип расположения клеток: клетки нервной системы кишечника располагались в среднем слое матрикса между расположенными выше и ниже скоплениями мышечных клеток. При данном расположении мышечные и нервные клетки быстро дифференцировались и образовывали связи друг с другом.

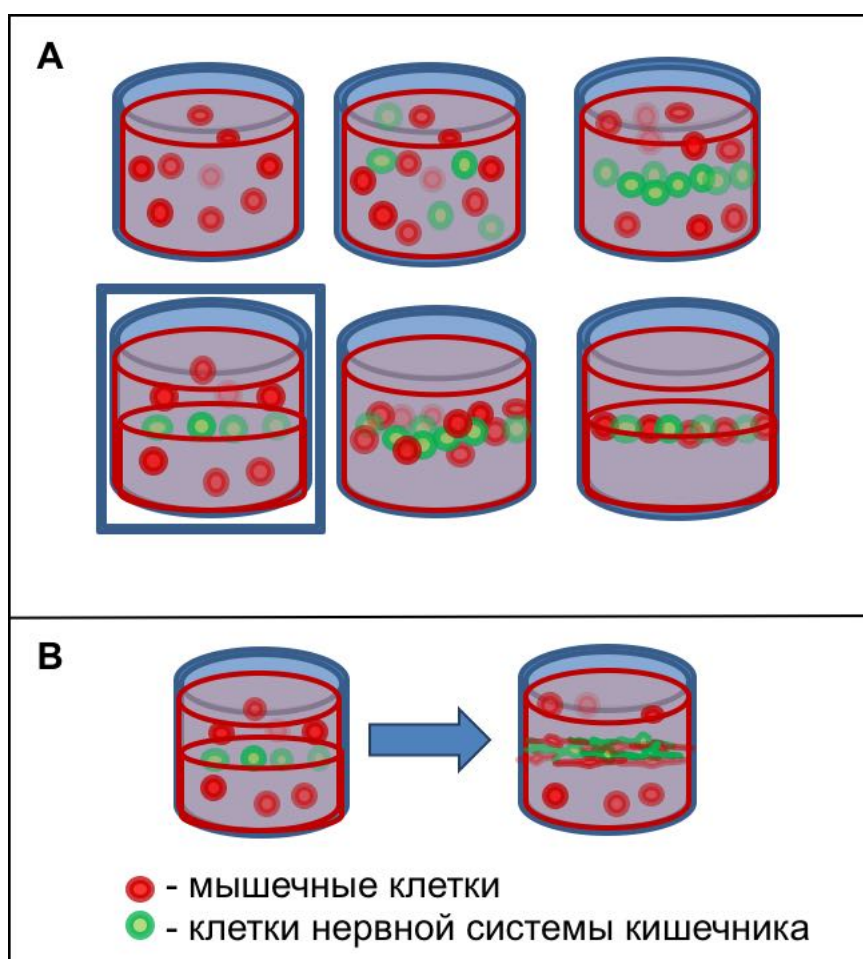


Рисунок 56 – Схематическое изображение расположения мышечных и нервных клеток в трёхмерном матриксе. А – исследованные типы взаимного расположения мышечных клеток и клеток нервной системы кишечника в матриксе. Оптимальный тип взаимного расположения клеток выделен синей рамкой. В – схематичное расположение клеток в матриксе в начале и конце культивации.

В ходе выращивания мышечных и нервных клеток при помощи световой микроскопии нами ежедневно проводилась оценка состояния клеточных структур. На 4-й день культивации клеток в среднем слое матрикса, содержащем клетки энтеральной нервной системы, наблюдались рост клеток и межклеточные взаимодействия (Рисунок 57 А). На 9-й день эксперимента нам стала отчётливо видна структура, состоящая из множества клеток, при этом четко прослеживалась граница между матриксом и новыми клетками (Рисунок 57 В). На 12-й день культивирования клеточная структура приобрела очертания мышечных пучков, при этом клетки располагались параллельно друг к другу (Рисунок 57 С). На 16-й день от начала исследования клеточные культуры зафиксировали и провели иммунофлюоресцентное окрашивание нервных клеток при помощи маркера нейронов ( $\beta$ -Tubulin III), и мышечных клеток при помощи маркера гладкомышечных клеток (smooth muscle actin (SMA)). В ходе проведения иммунофлюоресцентной микроскопии было установлено, что образовавшаяся структура состоит из мышечных и нервных клеток (Рисунок 57 D).

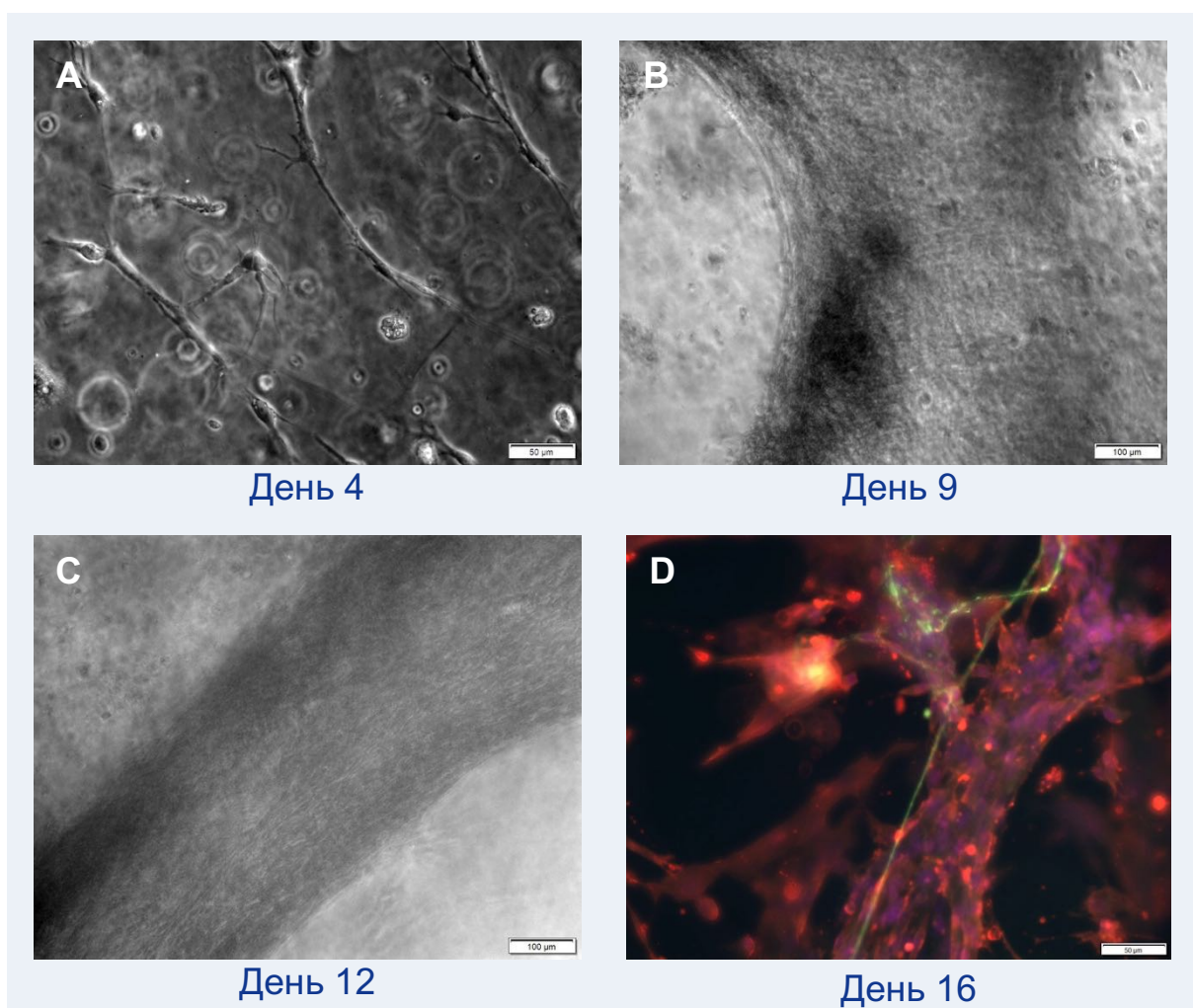


Рисунок 57 – Культура нейронов и мышечных клеток в трёхмерном матриксе NuStem-C с течением времени. А – 4-й день культивации клеток – рост нейронов и межклеточные взаимодействия. В – 9-й день культивации клеток – структура, состоящая из множества клеток, при этом четко прослеживалась граница между матриксом и новыми клетками. С – 12-й день культивации клеток – клеточная структура приобрела очертания мышечных пучков. D – 16-й день культивации клеток – иммунофлюоресцентное окрашивание нервных клеток при помощи маркера нейронов ( $\beta$ -Tubulin III) – зелёная окраска, и мышечных клеток при помощи (smooth muscle actin (SMA)) – красная окраска.

Полученная нами культура мышечных и клеток энтеральной нервной системы обладала очень важным свойством – сократительной активностью. Микроскопирование культур производилось ежедневно. С двенадцатого дня выращивания культур клеток мы наблюдали сократительную активность мышечных пучков, которая возникала спонтанно и длилась всё время микроскопирования (5 минут) (Рисунок 58). Нами впервые была создана

мышечная ткань кишечника, способная к сокращениям. Способность мышечной ткани к сокращениям играет важнейшую роль, является ключевым фактором в создании искусственной тонкой кишки и свидетельствует о функциональности данной мышечной структуры.

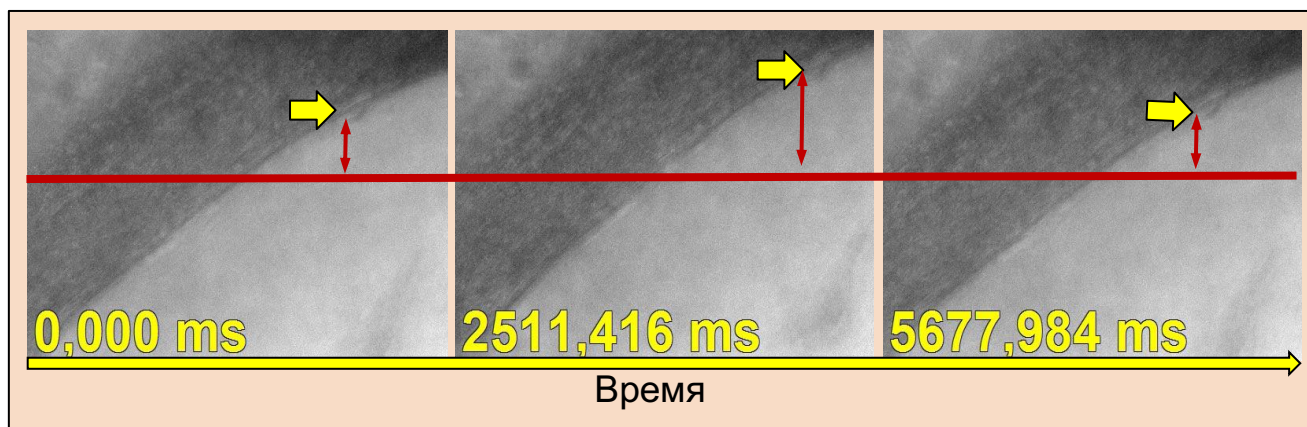


Рисунок 58 – Сокращение искусственно выращенных мышечных пучков тонкой кишки, показанное на временной ленте (в режиме реального времени). Жёлтая стрелка показывает участок на мышечном пучке, который из-за сокращения меняет свое положение. ms – микросекунды (1 секунда=1000 микросекунд). Световая микроскопия.

Просвечивающая электронная микроскопия показала, что выращенные в данном эксперименте мышечные волокна гистологически имели сходное строение с гладкомышечными волокнами кишечника: мышечные клетки плотно прилегали друг к другу, имели вытянутую форму, большие ядра и актиновые микрофиламенты. Кроме того, обнаруженные при электронной микроскопии кавеолы - небольшие колбообразные впячивания плазматической мембраны, свидетельствовали об активном метаболизме клеток (Рисунок 59).

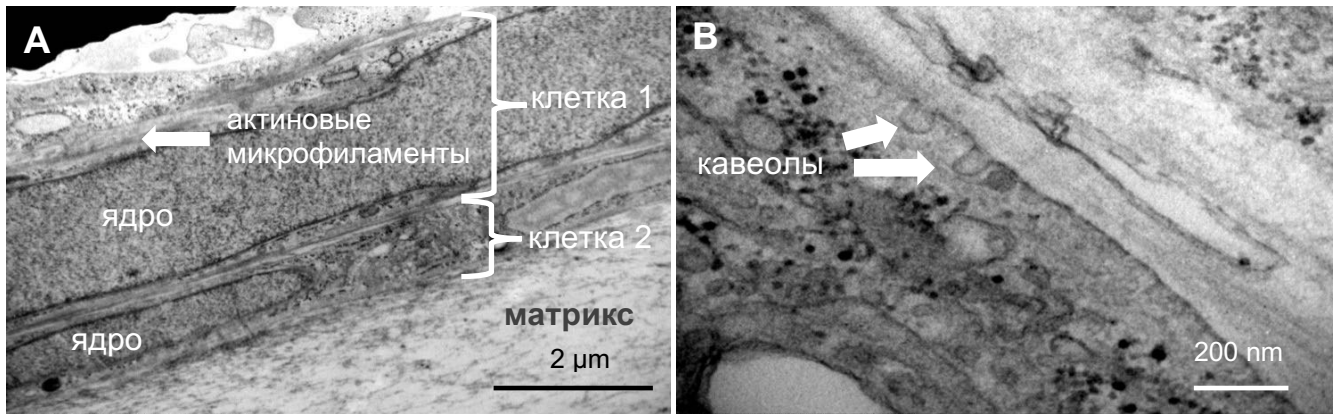


Рисунок 59 - Мышечные волокна, полученные при выращивании гладкомышечных клеток совместно с клетками нервной системы кишечника в трёхмерном матриксе. А – две мышечные клетки, находящиеся в тесном контакте в толще трёхмерного матрикса. Клетки имеют свойственные мышечным клеткам большие ядра, вытянутую форму и актиновые микрофиламенты. В – плазматическая мембрана мышечной клетки, стрелками обозначены кавеолы. Просвечивающая электронная микроскопия.

На следующем этапе было проведено исследование влияния энтеральной нервной системы на развитие мышечных клеток в трёхмерном матриксе. Гладкомышечные клетки были выращены совместно с клетками нервной системы кишечника в трёхмерном матриксе и после иммунофлюоресцентного окрашивания антителами к гладкомышечному актину (SMA), были изучены при помощи конфокального микроскопа. Особенность данного эксперимента заключалась в том, что исследовались оптические слои полученной трёхмерной культуры клеток: слой, где присутствовали только мышечные клетки и слой, где мышечные клетки располагались вместе с нервными клетками.

Из приведенных на рисунке 60 снимков видно, что в слое трёхмерного матрикса, где нет клеток энтеральной нервной системы, мышечные клетки остаются круглыми, их конфигурация не соответствует форме нормальных мышечных клеток. Кроме того, экспрессия актина в этих клетках снижена. В слое трёхмерного матрикса, где присутствуют энтеральные нейроны мы видим, что мышечные клетки имеют типичную для мышечных клеток вытянутую форму, экспрессия актина в этих клетках высокая. Как известно, актин — белок

специфический для мышечных клеток и необходимый для выполнения сократительной функции.

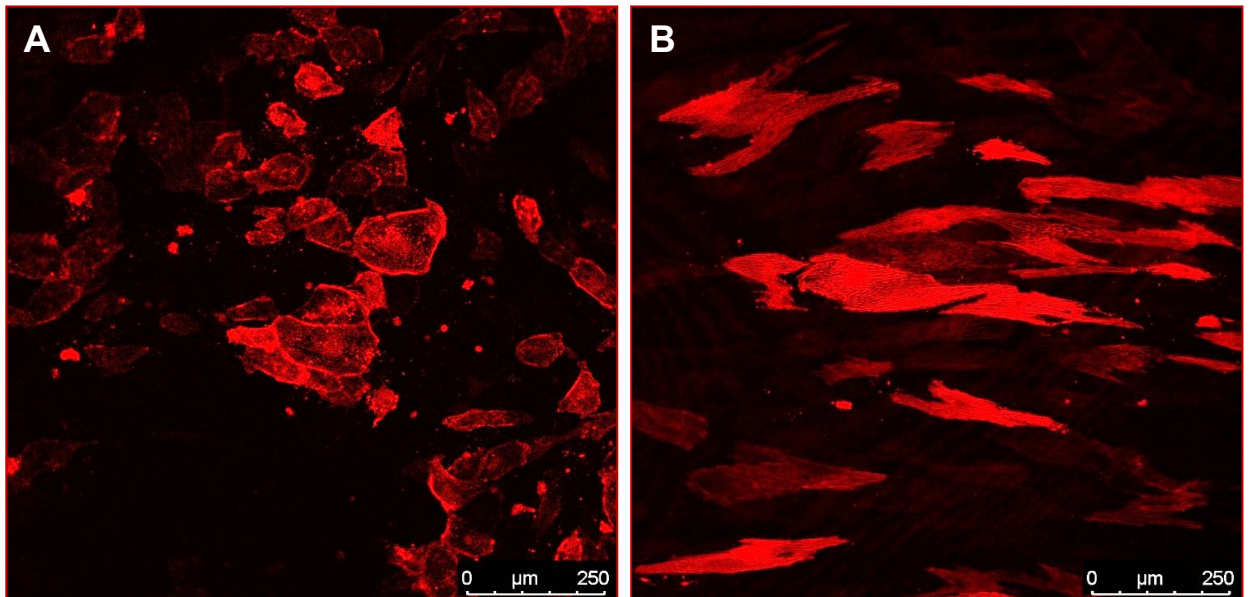


Рисунок 60 – Мышечные клетки в трёхмерном матриксе, красные (актин гладких мышц (SMA)): А- культура без клеток энтеральной нервной системы, В-культура, содержащая клетки энтеральной нервной системы. Конфокальная микроскопия.

Совместное расположение мышечных клеток энтеральной нервной системы в трёхмерной культуре существенно влияет на пролиферацию клеток. Одни и те же клетки в одном и том же матриксе демонстрировали совершенно различное поведение в зависимости от наличия или отсутствия энтеральных нервных клеток. Если компоновка мышечных клеток и энтеральной нервной системы была оптимальна, то мышечные клетки образовывали мышечные пучки, способные к сократительной активности.

Для того, чтобы изучить взаимодействие мышечных клеток и энтеральных нейронов в клеточных культурах нами проведено флюоресцентное иммуногистохимическое исследование фиксированной культуры клеток, выращенной в трёхмерном матриксе. При этом были выявлены тесные взаимодействия между мышечными клетками и энтеральными нейронами. Мы наблюдали специфическое взаимодействие мышечных клеток и клеток энтеральной нервной системы в культурах, как на уровне отдельных клеток, так и

на уровне мышечных пучков. Как видно из рисунка 61, контуры и форма мышечной клетки и нейрона полностью совпадают, а трёхмерная реконструкция позволяет увидеть, что нейрон, как бы «сидит» сверху на мышечной клетке.

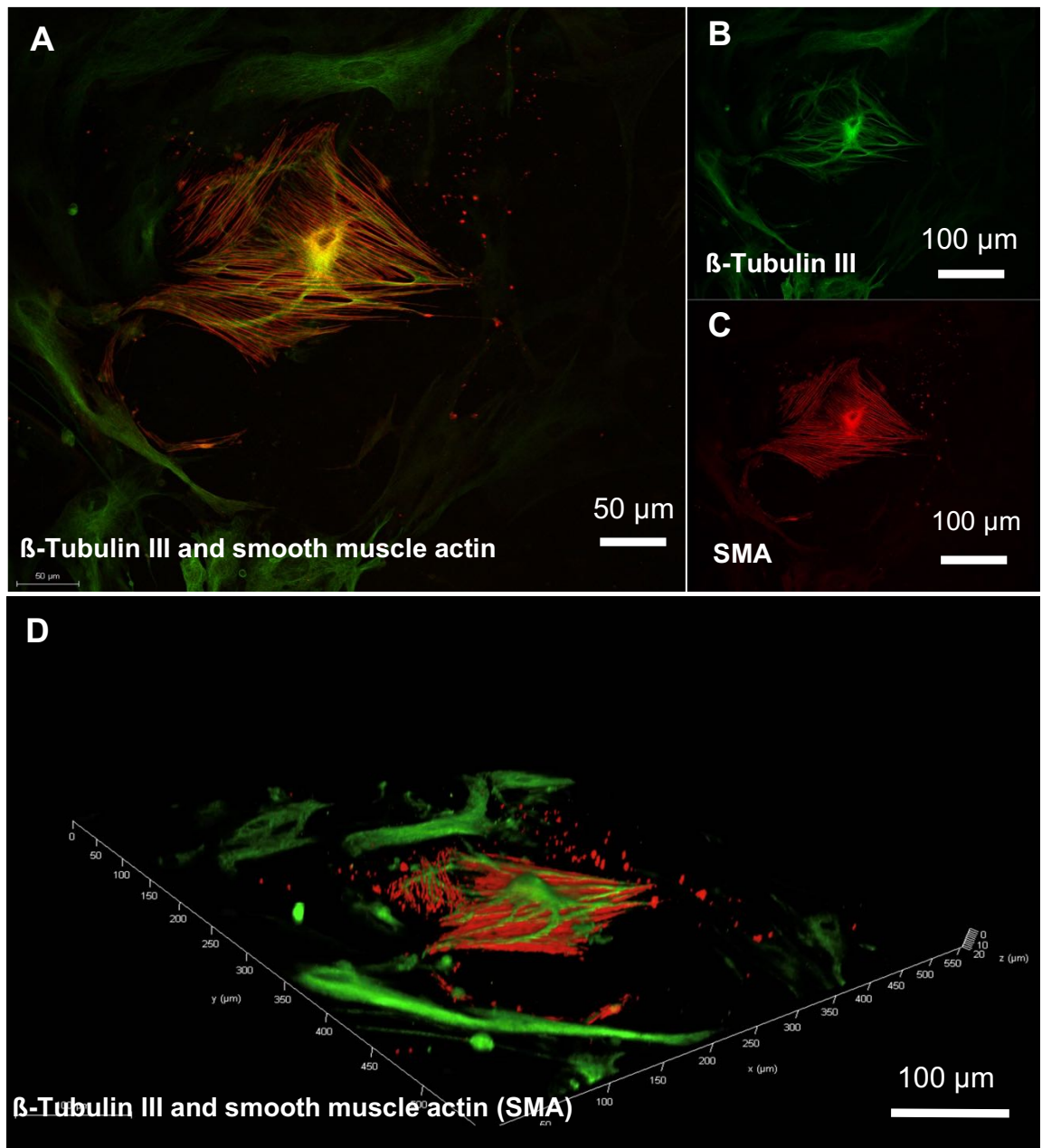


Рисунок 61 – Культура мышечных и нервных клеток, выращенных в трёхмерном матриксе. Взаимосвязь между нейроном и мышечной клеткой при совместном культивировании данных клеток в гидрогеле HyStem-C. Зеленым цветом окрашен нейрон ( $\beta$ -Tubulin III). Красным цветом окрашена мышечная клетка (актин гладких мышц (smooth muscle actin (SMA))). А – наложение зеленого и красного каналов. В – зеленый канал (нейрон). С – красный канал (мышечная клетка). D – трёхмерная реконструкция нейрона и мышечной клетки. Конфокальная микроскопия.



Основной задачей следующего этапа исследования явилось установление основных механизмов, с помощью которых энтеральные нейроны влияют на пролиферацию мышечных клеток при их совместном выращивании: контактное взаимодействие исследуемых клеток и/или их паракринное воздействие друг на друга.

В данном эксперименте был проведен сравнительный анализ трех культур клеток, выращенных в трёхмерной среде (Рисунок 62):

1. Культуры, выращенной в трёхмерном матриксе и содержащей только мышечные клетки.

2. Культуры, также состоявшей из мышечных клеток и находившейся в трёхмерном матриксе. Однако, при этом на дне пробирки располагались клетки энтеральной нервной системы, которые не имели прямого контакта с трёхмерным матриксом, но пребывали в той же культуральной среде, что и мышечные клетки. Таким образом, вещества, выделяемые энтеральными нейронами, воздействовали на мышечные клетки.

3. Культуры, содержащей, как мышечные клетки, так и клетки энтеральной системы кишечника, при этом эти клетки непосредственно контактировали друг с другом.

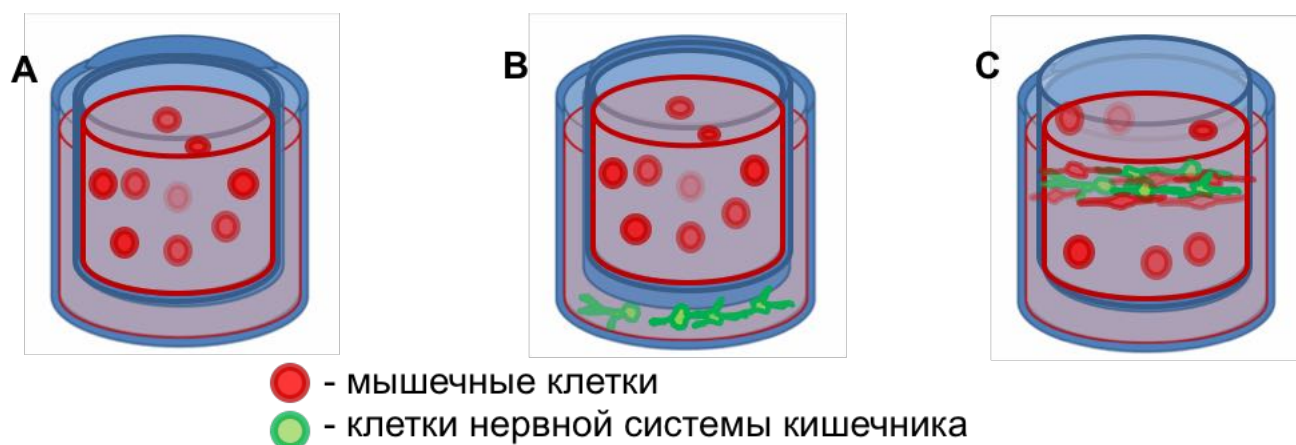


Рисунок 62 – Схематическое изображение расположения мышечных и нервных клеток в трёхмерном матриксе. А- только мышечные клетки, В- мышечные клетки в матриксе. Клетки энтеральной нервной системы вне матрикса, только паракринное взаимодействие между клетками. С- мышечные клетки и клетки энтеральной нервной системы в матриксе- непосредственный контакт между клетками.

В результате нами было выявлено, что мышечные клетки, культивируемые отдельно в трехмерной среде, сохраняли свою круглую форму, не удлинялись и не росли (Рисунок 63 А). В случае паракринного взаимодействия между гладкомышечными клетками и клетками энтеральной нервной системы мы наблюдали умеренную пролиферацию мышечных клеток (Рисунок 63 В) и формирование мышечных пучков. Интересно, что в мышечных пучках мы обнаружили единичные нейроны (Рисунок 64 А). Мы полагаем, что нейроны пролиферировали из остатков нейрон-стволовых клеток в культуре клеток гладкой мускулатуры тонкого кишечника крысы под влиянием паракринных факторов энтеральной нервной системы.

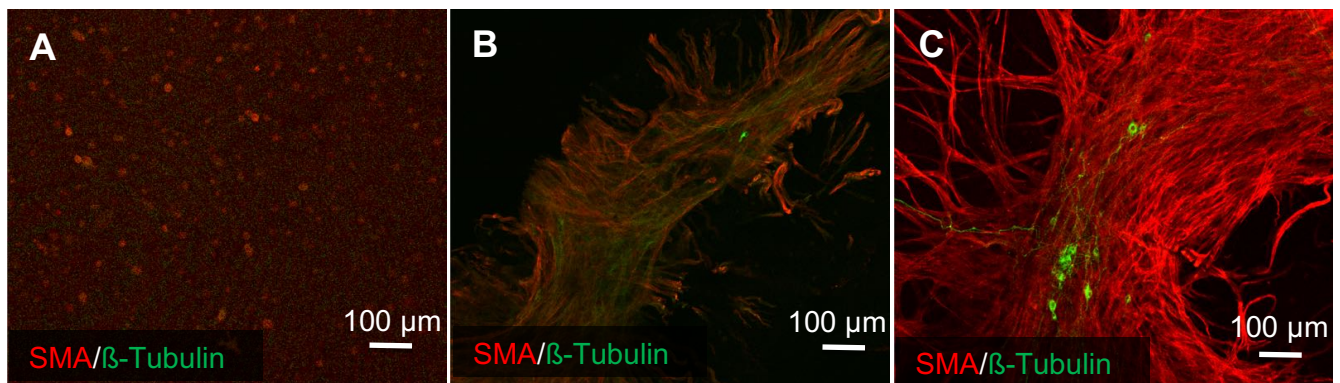


Рисунок 63 – Культура мышечных и нервных клеток, выращенных в трёхмерном матриксе, возраст три недели. А – только гладкомышечные клетки без клеток ENS, В-паракринное взаимодействие между гладкомышечными клетками и клетками ENS, С – непосредственный контакт между гладкомышечными клетками и клетками ENS. Зеленые ( $\beta$ -тубулин III) – нейроны, красные (smooth muscle actin (SMA)) – мышечные клетки. Конфокальная микроскопия.

Культивирование клеток гладких мышц в непосредственном контакте с клетками энтеральной нервной системы привело к формированию большого количества мышечных пучков (мышечной такни) с сократительной активностью (Рисунок 63 С). Помимо мышечных клеток, мышечные пучки состояли из множества нейронов, которые были расположены в виде групп клеток, а также отдельных клеток с длинными взаимосвязанными отростками (Рисунок 64 В).

При этом наблюдалось тесное взаимодействие клеток энтеральной нервной системы с мышечными клетками.

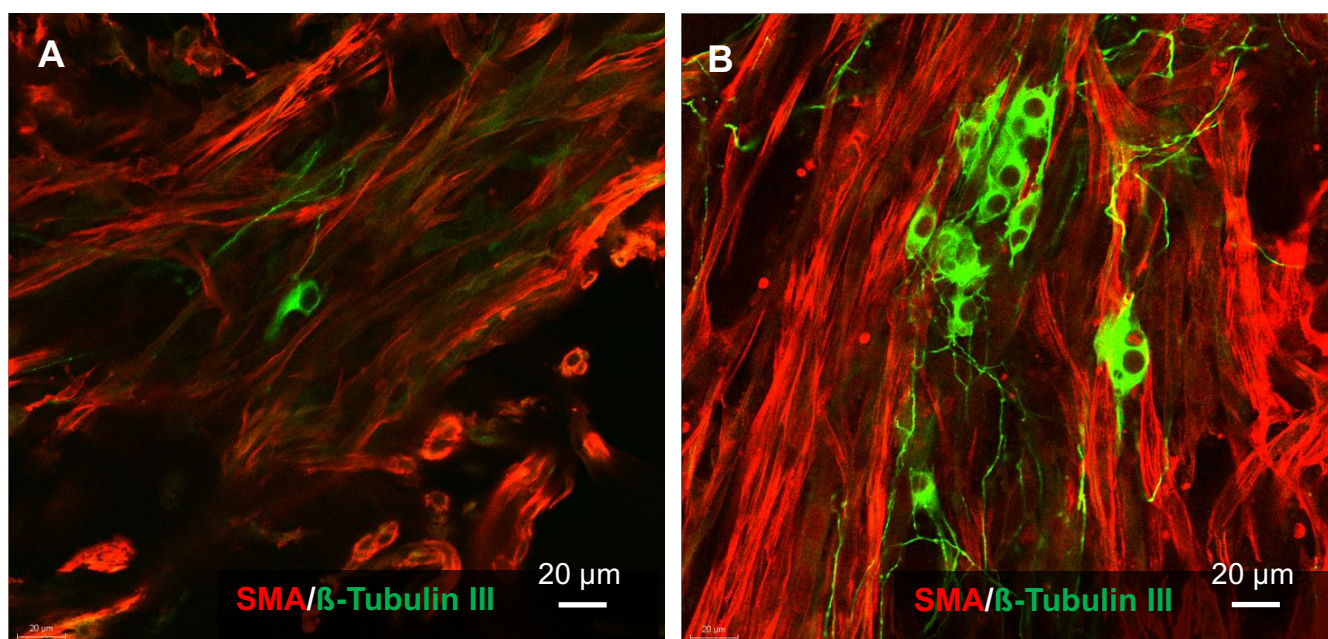


Рисунок 64 – Культура мышечных клеток и нейронов в гидрогеле HyStem-C. Рост сокультурных клеток ENS и мышечных клеток в различных формах: А – паракринное взаимодействие между гладкомышечными клетками и ENS, В – Непосредственный контакт между гладкими мышцами и ENS клетками. Зеленые ( $\beta$ -тубулин III) – нейроны, красные (smooth muscle actin (SMA)) – мышечные клетки. Конфокальная микроскопия.

Трёхмерная реконструкция мышечных пучков (мышечной такни), микроскопированных при помощи конфокальной микроскопии, показала, что клетки энтеральной нервной системы, расположенные в мышечных пучках не только тесно контактируют с мышечными клетками (Рисунок 65 А), но также образуют трёхмерную нейронную сеть внутри мышечных слоев (Рисунок 65 В). Наши наблюдения позволяют утверждать, что клетки энтеральной нервной системы формируют остов для мышечных клеток, стимулируют их рост и дифференцировку, и согласованный ответ в виде сокращения, что, по нашему мнению, имеет решающее значение для создания функциональных мышечных слоев.

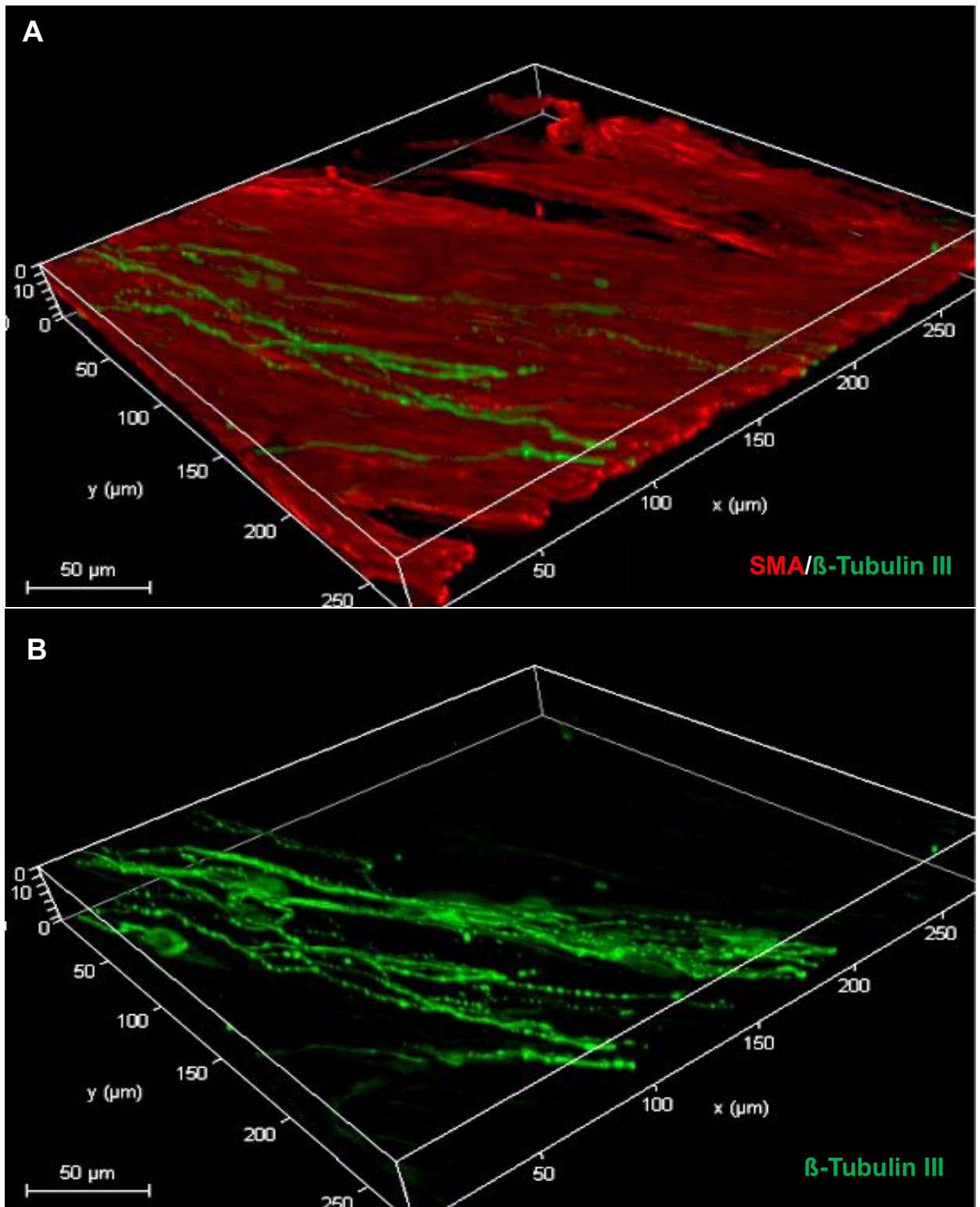


Рисунок 65 – Выращенные при помощи тканевой инженерии иннервированные мышечные пучки (мышечная ткань) тонкой кишки. А- трёхмерная реконструкция мышечных пучков и нейронной сети при помощи конфокальной микроскопии. В - трёхмерная реконструкция нейронной сети, без визуализации мышечных клеток при помощи конфокальной. Зеленые (β-тубулин III) - нейроны, красные (актин гладких мышц (SMA)) - мышечные клетки. Конфокальная микроскопия.

Таким образом, совместное культивирование энтеральных нейронов и мышечных клеток при правильном их расположении в трёхмерном мактриксе делает возможным создание иннервированного мышечного слоя, способного к сокращениям. Клетки энтеральной нервной системы специфически взаимодействуют с миоцитами как на уровне отдельных клеток, так и на тканевом уровне, посредством прямого контактного воздействия друг на друга, а также путем паракринного взаимодействия между собой. Очевидно, это имеет решающее значение для функционального взаимодействия между гладкими мышцами и нервными клетками кишечника и для создания функционального мышечного слоя тонкой кишки, способного к созданию перистальтических сокращений.

В нашей работе мы показали, что, несмотря на передовые диагностические и лечебные методы, у части пациентов энтеральное питание не восстанавливается. Из литературных данных достоверно известно, что трансплантация кишечника не является подходящим решением для таких пациентов. Биоинженерная тонкая кишка открывает новые перспективы хирургического лечения детей с синдромом короткой кишки.

Благодаря разработке методов культивирования межмышечного нервного сплетения и создания иннервируемого мышечного слоя тонкой кишки, мы вносим вклад в конструирование биоинженерной тонкой кишки. Таким образом, мы решаем одну из ключевых задач – создание иннервированной, способной к перистальтике гладкомышечной ткани, которая будет основой биоинженерной тонкой кишки – нового метода лечения СКК. В этой части работы мы разрабатываем метод лечения СКК для тех пациентов, у которых все остальные методы лечения неэффективны.

В нашей работе мы рассматриваем методы лечения как для пациентов с СКК, у которых применяемые хирургические методы дают возможность полностью перейти на полное энтеральное питание, так и для тех, у которых применение существующих методов лечения СКК не позволяет достичь такого результата, в связи с чем необходима разработка инновационных методов лечения

(тканевая инженерия тонкой кишки). Создание биоинженерной тонкой кишки, проведение экспериментов на мелких животных, затем на крупных и получение разрешения для применения у людей – сложный, длительный (10-15 лет), дорогой и наукоёмкий процесс. Решённые в этом исследовании задачи значительно приближают применение этой технологии в клинической практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До настоящего времени синдром короткой кишки (СКК) остается серьезной медицинской и социальной проблемой. Кардинальное решение вопросов, связанных с диагностикой и лечением синдрома короткой кишки, возможно при разработке и внедрении инновационных методов лечения на стыке детской хирургии, педиатрии, интенсивной терапии, нутрициологии и фундаментальных медико-биологических исследований. Перспективными являются изучение патогенетических механизмов развития СКК и его осложнений, разработка стратегически новых подходов хирургической коррекции при СКК, в том числе с использованием новейших технологии тканевой инженерии.

Синдром короткой кишки (СКК) – тяжёлое заболевание, возникающее в результате значительного уменьшения всасывательной поверхности тонкой кишки, развивающееся после обширных резекций тонкой кишки, приводящее к хронической кишечной недостаточности, проявляющейся мальабсорбцией, мальдигестией, мальнутрицией и расстройствами гомеостаза [29, 49, 51, 60, 66, 142, 281]. Парентеральное питание пациентов с СКК является важнейшей и первостепенной основой терапии, которая длится на протяжении нескольких лет или всю жизнь [39, 45, 75, 130, 247, 270]. В то же время, длительное применение ПП сопровождается риском развития серьёзных осложнений (поражение печени, катетер-ассоциированный сепсис и катетер-индуцированной венозный тромбоз) [48, 66, 71, 119, 186, 282, 344, 345, 351].

Стратегической целью лечения СКК является наиболее раннее восстановление функции кишечника, полный отказ от парентерального питания и перевод пациентов на полное энтеральное питание [11], что определяет перспективы благоприятного прогноза у данного контингента больных [142, 210].

Однако, несмотря на внедрение в клиническую практику новых терапевтических и хирургических методик у 30-50% пациентов не удаётся

восстановить полное энтеральное питание [14, 39, 75, 247, 252]. Летальность у таких пациентов остаётся высокой [384], достигая до 37,5% у детей и 45% у взрослых [142, 262, 388]. Кроме того, СКК является не только сложной медицинской проблемой, но и оказывает социально-экономическое давление на членов семьи больного ребёнка и подразумевает значительное финансовое обеспечение [136, 201].

Высокая инвалидизация и смертность, значительное снижение качества жизни, сложные социально-экономические аспекты и неэффективность современных методов лечения у ряда пациентов свидетельствует о том, что на сегодняшний день проблема лечения данного заболевания ещё далека от своего окончательного решения, что диктует необходимость совершенствования существующих и разработку новых методов лечения синдрома короткой кишки [68, 368, 369].

В отечественной и зарубежной литературе опубликованы единичные работы клинической направленности и небольшое количество экспериментальных исследований, посвящённых изучению морфологических изменений мышечного слоя тонкой кишки, а также нервной системы кишечника и тканевой инженерии кишечника [64, 124].

Не изучены патоморфологические изменения мышечного слоя тонкой кишки и нервной системы в кишечнике. В литературе не освещены возможности применения методов лучевой диагностики для определения показаний для удлиняющих кишечник операций, мониторинга состояния пациентов и выявления осложнений при СКК. В настоящее время не систематизированы показания к таким удлиняющим кишечник операциям, как кишечное удлинение и ушивание (Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT)) и последовательная поперечная энтеропластика (STEP). Отсутствует единое мнение о влиянии остаточной длины тонкой кишки, илеоцекального клапана, остаточной длины толстой кишки и редилатации тонкой кишки после удлиняющих кишечник операций на нутритивный статус пациентов.



Перспективным направлением изучения этой проблемы является тканевая инженерия тонкой кишки, которая может стать инновационным методом лечения таких пациентов. Несмотря на то, что одной из важных проблем является необходимость воссоздания нервной системы кишечника и получения перистальтики в образованной кишке, до сих пор, не существует работ, в которых были бы сконструированы нервные сплетения в кишечнике и получен иннервированный функциональный мышечный слой, способный к сокращениям, что диктует необходимость проведения научных исследований в этом направлении, для того, чтобы кишечник, полученный с помощью тканевой инженерии можно было применять в клинической практике в будущем [68, 110, 368, 369].

Всё вышеизложенное определяет актуальность, теоретическую и практическую значимость разработки новых стратегических подходов лечения детей с синдромом короткой кишки, что и явилось основанием для решения данной проблемы в качестве экспериментально-клинического исследования.

Для выполнения поставленных задач была проведена экспериментальная работа (первая экспериментальная часть) по изучению кишечной адаптации в мышечных слоях и нервной системе кишечника при СКК. В клинической части работы нами проанализированы результаты диагностики и оперативного лечения 54 детей с СКК, находившихся на лечении с 1999-2019 годы. Вторая экспериментальная часть заключалась в создании иннервированного мышечного слоя тонкой кишки в рамках тканевой инженерии кишечника.

Экспериментальное исследование на лабораторных животных проводилось при строгом соблюдении правил асептики, антисептики, этических норм и положений приказов МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», № 791 от 27 июня 1978 г. «О внесении дополнений в приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.», положениями Хельсинкской декларации по вопросам медицинской этики и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических

исследований с использованием животных, международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных от 1989 г. и в соответствии с немецким законом о защите животных и с разрешения комитета по работе с животными медицинского факультета Мангейм университета Гайдельберг (Германия) и университета Любек (Германия).

В первой экспериментальной части был проведён эксперимент на 22 крысах породы Wistar со средней массой тела 260–360 г, у 12 из которых был смоделирован синдром короткой кишки, путём субтотальной резекции тонкой кишки (80%) с сохранением 5 см тощей кишки и 5 см подвздошной кишки от илеоцекального угла. Остальным 10 крысам была проведена лапаротомия без резекции тонкой кишки. Через 2 недели животные были усыплены, и тонкая кишка была изъята для гистологических исследований.

Были изучены изменения мышечного слоя тонкой кишки и экспрессия стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях при СКК, и их участие в кишечной адаптации. На первом этапе препараты тонкой кишки окрашивали гематоксилин-эозином и измеряли длину кишечника, толщину продольного и циркулярного мышечных слоев, и диаметр кишечника.

В нашем исследовании было выявлено достоверное увеличение диаметра тощей кишки (в 1,8,  $p < 0,0001$ ) и подвздошной кишки (в 1,2,  $p < 0,0023$ ) в группе крыс с СКК по сравнению с контрольной группой, что совпадает с исследованием Martin С.А. с соавторами [308] в отношении подвздошной кишки, однако тощая кишка автором не исследовалась. В других исследованиях на животных, в которых производилась массивная резекция тонкой кишки диаметр тонкой кишки не изучался [124, 151, 153, 227, 365].

Изучение мышечных слоёв тонкой кишки показало увеличение толщины продольного мышечного слоя тощей кишки 1,8 раза ( $p < 0,0001$ ) у крыс с СКК по сравнению с контрольной группой. В то же время толщина продольного мышечного слоя подвздошной кишки при СКК не увеличилась. Толщина циркулярного мышечного слоя была больше в 2,1 раза ( $p < 0,0001$ ) в тощей кишке и в 1,4 раза ( $p < 0,0001$ ) – в подвздошной кишке у крыс с СКК по сравнению с

контрольной группой. Выявленные нами данные о гипертрофии циркулярного мышечного слоя совпадают с результатами исследования Chen J. с соавторами [124], в котором описывается, что после резекции 80% тонкой кишки у крыс развивается гипертрофия циркулярного мышечного слоя подвздошной кишки, однако в данной работе, не изучалась тощая кишка при СКК. В другом исследовании у мышей, которым резецировали 50% тонкой кишки, гипертрофия мышечных слоёв подвздошной кишки не происходила, здесь также не исследовалась тощая кишка [308]. Причиной расхождения наших данных с данными Martin С.А. с соавторами [308] относительно гипертрофии мышечных слоёв, считаем разный объем резекции тонкой кишки у мелких животных (в нашей работе 80% тонкой кишки, в работе Martin С.А. с соавторами – 50% тонкой кишки), что влияет на выраженность изменений, характерных для кишечной адаптации. Наши результаты также подтверждают результаты исследования на более крупных животных – собаках, у которых исследовалась толщина мышечных слоёв через 4 и 12 недель после резекции 50% тонкой кишки, где отмечалась гипертрофия продольного и циркулярного мышечных слоёв [365]. Наши данные о гипертрофии мышечных слоёв согласуются с данными Chen J. [151], где была так же показана гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки после резекции 75% тонкой кишки. Кроме того, в данной работе при помощи электронной микроскопии были выявлены характерные для гипертрофии изменения внутри мышечных клеток [151].

В отличие от перечисленных выше работ, мы провели комплексное изучение мышечной массы в стенке тонкой кишки, учитывающее, как дилатацию тонкой кишки, так и гипертрофию её мышечных слоёв:

$$\text{площадь мышечного слоя} = \pi \times \text{диаметр} \times \text{толщина мышечного слоя} \quad (2).$$

Площадь мышечного слоя в поперечном срезе тонкой кишки у крыс с СКК была достоверно больше по сравнению с контрольной группой как в тощей ( $p < 0,0001$ ), так и в подвздошной кишке ( $p < 0,0056$ ). Наши данные показали, что при СКК развивается выраженная дилатация тощей кишки и подвздошной кишки, а также гипертрофия мышечных слоёв.

Важным является тот факт, что дилатация тощей кишки и подвздошной кишки при СКК не является атонической дилатацией с гипотрофией мышечных слоёв, а, наоборот, сопровождается выраженной гипертрофией мышечных слоёв. Данный феномен значительно увеличивает мышечную массу оставшейся после резекции тонкой кишки и является следствием кишечной адаптации.

Таким образом, выявленная нами взаимосвязь дилатации тонкой кишки с гипертрофией мышечного слоя тонкой кишки раскрывает еще один механизм кишечной адаптации при синдроме короткой кишки. Так, наряду с описанными ранее проявлениями кишечной адаптации в слизистой тонкой кишки [298, 308], увеличение диаметра тонкой кишки позволяет квадратично увеличить площадь абсорбционной поверхности тонкой кишки. С другой стороны, увеличение диаметра тонкой кишки ухудшает эффективность перистальтики и затрудняет проталкивание кишечного содержимого по кишечнику. Кроме того, доказано снижение сократимости циркулярного слоя после резекции тонкой кишки [126, 151]. В сложившихся условиях гипертрофия мышечных слоёв является ответной реакцией организма на увеличение диаметра тонкой кишки и на ее сниженную сократимость, и предназначена для увеличения эффективности перистальтики тонкой кишки.

Описано, что кишечные нейроны участвуют в адаптационном ответе после резекции кишечника [195], однако, работы, посвященные изучению роли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях при СКК в литературе отсутствуют. В нашем исследовании экспрессия стволовых клеток изучалась при помощи иммуногистохимического окрашивания препаратов антителами к нестину (маркеру стволовых клеток). Анализ для оценки кишечной адаптации при помощи нестина оправдан, так как исследование Grundmann D. с соавторами [293], проведённое на трансгенных моделях мышей, имеющих нестин-флюоресцирующий протеин (nestin-green fluorescent protein transgenic model) доказало, что нестин является маркером нейрональной адаптации. Окрашивание антителами к нестину с маркировкой пероксидазой, позволяющее оценить количество межмышечных нервных сплетений, имеющих стволовые клетки,

выявило, что при СКК количество таких сплетений достоверно увеличивается, как в тощей ( $p < 0,001$ ), так и в подвздошной кишке ( $p < 0,001$ ). Иммунофлюоресцентное окрашивание нестином, которое в отличие от окрашивания нестином с пероксидазой, позволило изучать экспрессию стволовых клеток внутри межмышечного нервного сплетения при большем увеличении выявило достоверное увеличение доли стволовых клеток внутри межмышечных нервных сплетений, как в тощей кишке ( $p = 0,0125$ ), так и в подвздошной кишке ( $p < 0,0001$ ). До настоящего времени в литературе не описана реакция стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях на массивную резекцию тонкой кишки и синдром короткой кишки. Есть работы подвещающие, что нестин-экспрессирующие стволовые клетки кишечные клетки дают начало нейросферам, дифференцируются в нейрональные, глиальные и мезенхимальные клоны *in vitro*, генерируют нейроны *in vivo* [265].

Кроме того, было показано, что в межмышечных нервных сплетениях тонкой кишки имеется высокий нейрогенный потенциал, а нестин-положительные клетки представляет собой маркер нейрональной пластичности [293]. И в норме факторы окружающей среды, такие как микробиом, сильно влияют на дифференцировку и пластичность нейронов. Источником нестин-положительных (стволовых) клеток могут быть глиальные клетки, так как показано, что кишечные глиальные клетки трансдифференцируются в нейроны на постнатальных стадиях при физиологических условиях, после кишечного заболевания или травмы [134, 161, 377].

Таким образом, значительное увеличение нестин-положительных клеток при синдроме короткой кишки продемонстрировало, что межмышечные нервные сплетения непосредственным образом участвуют в кишечной адаптации при синдроме короткой кишки, а также указывают на их большой регенеративный потенциал.

Исследование нестин-положительных клеток в мышечных слоях тонкой кишки, показало значительное увеличение количества стволовых клеток у крыс с СКК, по сравнению с контрольной группой (тощая кишка:  $p < 0,0001$ , подвздошная

кишка:  $p < 0,0001$ ). Известно, что кроме нервных сплетений нестин, также содержится в миофибробластах, однако его экспрессия там значительно ниже, по сравнению с нестином в нервных стволовых клетках [263]. В наших экспериментах выраженность экспрессии нестина в межмышечных нервных сплетениях полностью совпала с экспрессией нестина в мышечных слоях. Это указывает на то, что активированные стволовые клетки в мышечных слоях являются нервными стволовыми клетками [335]. Наши данные подтверждаются исследованиями других авторов, которые утверждают, что недавно родившиеся нейроны появляются также и за пределами нервных ганглиев, и затем мигрируют в нервные ганглии [82, 335].

Проведённый нами анализ взаимосвязей между мышечными слоями тонкой кишки и стволовыми клетками в межмышечных нервных сплетениях, и мышечных слоях, выявил сильную положительную корреляцию между гипертрофией мышечных слоёв и количеством стволовых (нестин-позитивных) клеток как в межмышечных нервных сплетениях ( $r=0,7524$ ,  $p < 0,0001$ ), так и в мышечных слоях ( $r=0,7597$ ,  $p < 0,0001$ ). Данный результат свидетельствует об участии энтеральной нервной системы и мышечных слоёв кишечника, как единой системы в процессе кишечной адаптации. Таким образом, в мышечных слоях тонкой кишки и межмышечных нервных сплетениях при СКК происходят значительные морфологические изменения. Активируется нейрогенный потенциал, как в межмышечных нервных сплетениях, так и в мышечных слоях, который, тем самым, участвует в адаптации кишечника. Эти изменения являются результатом кишечной адаптации, патофизиологичны для СКК и, поэтому присущи всем пациентам с СКК. Выраженная положительная корреляция между количеством стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет рассматривать мышечные слои тонкой кишки и энтеральную нервную систему, как единый нервно-мышечный комплекс, активация одного элемента которого ведёт к активации другого элемента.

Для того, чтобы изучить возможность экстраполяции данных, полученных в эксперименте на лабораторных животных на пациентов в СКК, мы исследовали

биоптаты тонкой кишки пациентов с СКК и пациентов с нормальной длиной тонкой кишки. При этом в качестве маркеров кишечной адаптации, как и в экспериментах на животных, были стволовые клетки, так как они являются маркерами адаптационных изменений в кишке [94, 169, 293]. Иммунофлюоресцентное окрашивание межмышечных нервных сплетений антителами к нестину для определения стволовых клеток и антител к PGP 9.5 для выявления нервных клеток в биопсиях тонкой кишки, показало, что доля стволовых клеток у пациентов с СКК достоверно увеличивается (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ) более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Доля нейронов в межмышечных нервных сплетениях не изменилась. Отмечается возрастание доли стволовых клеток по отношению к доле нейронов в межмышечном нервном сплетении (Wilcoxon Test  $p < 0,0001$ ). Увеличение доли стволовых клеток при неизменном количестве нервных клеток в межмышечных нервных сплетениях свидетельствует об увеличении/росте межмышечных нервных сплетений.

Выявленное увеличение количества стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях у пациентов с СКК, полностью совпадает с результатами, полученными при экспериментах на животных, что позволяет эти данные, экстраполировать у пациентов с СКК. Выявленная на модели крыс выраженная положительная корреляция между количеством стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет нам утверждать, что у пациентов с СКК происходит гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки. Клиническая часть нашего исследования показала, что у всех пациентов развилась выраженная дилатация тонкой кишки.

Нами впервые установлено, что у пациентов с СКК в процессе кишечной адаптации, помимо слизистой оболочки, участвуют также мышечный слой и нервная система тонкой кишки. Межмышечные нервные сплетения и мышечные слои тонкой кишки морфологически и функционально тесно взаимосвязаны, и вместе формируют нервно-мышечный комплекс, который, как мы знаем, на примере болезни Гиршпрунга, играет важнейшую роль в функционировании тонкой кишки. Выявленные нами изменения: увеличение диаметра тонкой кишки,

гипертрофия мышечных слоёв тонкой кишки и увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях тонкой кишки, являются важнейшими патофизиологическими механизмами при СКК и возникают у всех пациентов с данной патологией. Вышеперечисленные изменения приводят к формированию дилатированных участков в тонкой кишке с гипертрофией мышечной стенки. В этих участках, в отличие от тонкой кишки нормального диаметра, большая часть кишечного содержимого находится в середине просвета тонкой кишки, а не в пристеночном слое, из которого всасываются питательные элементы, что приводит к усилению мальабсорбции. Гипертрофированный мышечный слой тонкой кишки не может обеспечить адекватную перистальтику в данном участке тонкой кишки, что приводит к застою кишечного содержимого и разрастанию патогенной бактериальной флоры, что усиливает мальабсорбцию, мальдигестию и способствует транслокации бактерий из кишечника в кровяное русло. Удлиняющие кишечник операции проводятся на расширенном участке тонкой кишки и позволяют его удлинить, и сузить просвет тонкой кишки, что увеличивает долю кишечного содержимого в пристеночном слое, улучшает контакт кишечного содержимого со слизистой оболочкой кишки и делает перистальтику тонкой кишки более эффективной.

Дилатация тонкой кишки является патофизиологическим процессом при СКК, поэтому у пациентов с СКК необходимо регулярно производить измерение диаметра тонкой кишки, что позволит своевременно распознавать дилатацию тонкой кишки и своевременно выставить показания к применению удлиняющих кишечник операций.

Несмотря на успешное применение у детей УЗИ, РКИ, МРТ для диагностики заболеваний ЖКТ, использование данных методов лучевой диагностики у пациентов с СКК описано крайне скудно [78, 113, 296, 378, 379, 383]. В связи с этим, нами проведено изучение диагностической эффективности лучевых методов исследования для определения длины, дилатации и стенозов сохранившейся тонкой кишки у 8 пациентов с СКК.



Результаты РКИ, УЗИ брюшной полости, а также гидро–МРТ сопоставлялись с данными, полученными в ходе операций на тонкой кишке, операциями, принятыми за стандарт. Оценивались чувствительность, специфичность и точность в градациях: высокая, средняя, низкая.

Полученные нами результаты показали, что УЗИ обладает высокой чувствительностью при определении дилатации кишечника при СКК, однако не позволяет описать характер дилатации кишечника (протяженность, форму, отдел кишечника, в котором выявлена дилатация). Наши исследования показали, что УЗИ не позволяет измерить длину тонкой кишки, кроме того, УЗИ обладает низкой чувствительностью при выявлении стенозов тонкой кишки. Публикаций, посвящённых диагностической ценности УЗИ для изучения тонкой кишки при СКК в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют. В единичных исследованиях, посвящённых применению УЗИ у пациентов с СКК, изучалась эффективность этой методики для диагностики патологии печени у пациентов с СКК, подтверждаются наше мнение о том, что применение УЗИ у пациентов с СКК является важным для диагностики поражения печени и развития нефрокальциноза [296, 378, 379]. К недостаткам УЗИ следует отнести технические сложности, связанные с выполнением исследования у тучных больных и пациентов с метеоризмом, что совпадает с данными литературы [9].

РКИ является чувствительным методом выявления дилатации тонкой кишки, позволяющим, в отличие от УЗИ, более детально охарактеризовать дилатацию с описанием её протяжённости, формы, местоположения. Этот метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью при выявлении стенозов, однако в случае наслоения контрастированных петель кишки друг на друга, распознать стеноз становится намного сложнее, это может приводить к диагностическим ошибкам, что встречалось у одного пациента в нашем исследовании и совпадает с мнением других авторов [5]. РКИ позволяет охарактеризовать скорость пассажа кишечного содержимого по кишечнику и, тем самым, оценить перистальтику тонкой кишки.

Представленные в литературе единичные данные о применении РКИ для измерения длины тонкой кишки у детей с СКК противоречивы: Velazco C.S. с соавторами [300] утверждают, что РКИ занижает длину тонкой кишки по сравнению с реальной её длиной и этот метод не подходит для предоперационного планирования, тогда как Lodwick D. с соавторами [90] опровергают это мнение. Полученные нами данные, позволяют объяснить описанные выше противоречия. Нами впервые доказано, что при помощи РКИ возможно измерение длины тонкой кишки у пациентов с СКК, однако, точность определения длины тонкой кишки зависит от её длины: при длине тонкой кишки до 30 см точность – высокая, при длине ее от 30 до 70 см – средняя, при длине более 70 см - низкая.

Недостатками рентгенологических методов исследования кишечника являются облучение пациента и дополнительные риски, связанные с введением контрастных веществ [80]. МРТ является самым современным и дорогостоящим методом лучевого исследования тонкой кишки [9]. В ходе наших исследований показано, что гидро-МРТ у пациентов с СКК является наиболее чувствительным методом, позволяющим определить и полностью охарактеризовать дилатацию тонкой кишки, и выявить стенозы тонкой кишки. В нашем исследовании мы отметили, что способность гидро-МРТ проводить обработку изображений в трех взаимно перпендикулярных плоскостях нивелирует недостаток РКИ, связанный с наложением контрастированных петель тонкой кишки друг на друга, что позволяет наиболее точно идентифицировать стенозы кишечника. Наши данные согласуются утверждением, что МРТ по диагностической ценности превосходит РКИ при верификации патологии тонкого кишечника [245, 276].

При измерении длины тонкой кишки чувствительность гидро-МРТ совпадает с чувствительностью РКИ и напрямую зависит от длины тонкой кишки: при длине тонкой кишки до 30 см точность – высокая, при длине от 30 до 70 см – средняя, при длине более 70 см – низкая. С помощью МРТ можно оценить состояние паренхиматозных органов и сосудов брюшной полости. В литературе отсутствуют исследования, посвящённые изучению диагностической

эффективности МРТ при СКК. Однако многие авторы отмечают, что гидро-МРТ может являться приоритетным методом в изучении тонкой кишки, благодаря высокой контрастности мягких тканей, возможности обработки изображений в трех взаимно перпендикулярных плоскостях и отсутствию ионизирующего излучения [5, 9, 78, 139, 304, 381, 385, 392].

Метаанализ подтвердил высокую чувствительность и специфичность МРТ при воспалительных заболеваниях кишечника [208].

Таким образом, правильное применение комбинации УЗИ, РКИ и гидро-МРТ позволяет своевременно распознать дилатацию тонкой кишки, выявить причины нарушения пассажа кишечного содержимого и определить показания к хирургическому лечению, в том числе, к проведению удлиняющих кишечник операций. УЗИ является оптимальной скрининговой методикой для пациентов с СКК. РКИ дает возможность достаточно хорошо изучать морфологию тонкой кишки и её транспортную функцию, и должна применяться при изменениях, выявленных на УЗИ, с наличием клинических признаков острой и хронической патологии ЖКТ у детей. В осложнённых случаях, следует проводить МРТ, которая является методом, позволяющим наиболее точно оценить морфологию тонкой кишки.

В следующем разделе клинической части работы было проведено сравнительное изучение удлиняющих кишечник операций (LILT и STEP), были определены и систематизированы показания и противопоказания к удлиняющим кишечник операциям. А также определены сроки восстановления полного энтерального питания, в зависимости от проведённой удлиняющей кишечник операции, наличия или отсутствия толстой кишки, илеоцекального клапана и развития повторной дилатации тонкой кишки.

Для определения и систематизации показаний и противопоказаний к операции LILT и STEP, а также уменьшения частоты послеоперационных осложнений, были изучены результаты лечения 54 детей с СКК, которым проводились удлиняющие кишечник операции: у 36 пациентов была проведена операция LILT, у 15 – STEP, у 3 – LILT+STEP.

Количество пациентов в нашем исследовании было сравнительно большим для данного заболевания. Так, в систематическом обзоре Frongia G. с соавторами [137], посвященном удлинению кишечника операциям при СКК рассматривались 39 статей, опубликованных за 22 года, количество пациентов в большинстве статей не превышало 20, и только в 2-х исследованиях количество пациентов было более 50.

Основными причинами развития СКК явились обширные резекции тонкой кишки при гастрошизисе – у 21 пациента (38,9%), некротическом энтероколите – у 14 (25,9%), атрезии тонкой кишки – у 10 (18,5%), завороте кишечника – у 8 (14,8%). У 1 пациента (1,9%) первопричиной СКК явился некроз тонкой кишки, развившийся в результате тромбоза мезентеральных сосудов. Наши данные о перечне заболеваний, приведших к развитию СКК сходятся с мнением отечественных и зарубежных авторов, однако, частота встречаемости той или иной патологии в структуре причин развития СКК, по данным ряда авторов отличается. В нашем исследовании ведущей причиной развития СКК (38,9%) был гастрошизис, в то время как по наблюдениям ряда исследователей самой распространенной причиной СКК является некротизирующий энтероколит, встречающийся в 30% - 43% случаев [190, 258, 261, 273].

С другой стороны, имеется множество исследований, в которых описывается, что основанной причиной СКК являлась атрезия тонкой кишки [116, 328], заворот кишки [238] или, как в нашем исследовании, гастрошизис [174, 238, 328, 364].

В исследовании Аверьяновой Ю.В. с соавторами [64] СКК было обусловлено у 35 из 45 детей врожденными аномалиями кишечной трубки, у 3 из них отмечалось сочетание с гастрошизисом. У 5 из 45 пациентов причиной СКК был некротический энтероколит новорожденных.

Предоперационная подготовка проводилась в условиях хирургического стационара и не различалась для операций LILT и STEP. Критериями готовности к операции являлись: отсутствие значительного дефицита массы тела, санация очагов хронической инфекции, нормализация клинико-лабораторно-

инструментальных показателей, в том числе восстановление водно-электролитного баланса и кислотно-щелочного равновесия, уменьшение явлений холестаза, устранение белковой недостаточности, отсутствие коагулопатии, коррекция анемии и тромбоцитопении.

Нами учитывалась вероятность кровопотери во время удлиняющих кишечник операций, поэтому перед каждой операцией подбирались и заготавливались компоненты крови (эритроцитарная масса, свежезамороженная плазма).

В нашем исследовании, как в группе LILT, так и в группе STEP, удлиняющие кишечник операции были у большинства пациентов проведены в возрасте от 1 года до 3 лет. В публикациях возраст пациентов на момент операции варьировался от первого дня жизни [326] до 15 лет [207, 325], однако у большинства пациентов в опубликованных работах удлиняющие кишечник операции так же, как и в нашем исследовании, проводились в возрасте от 1 года до 3-х лет [98, 102, 137, 170, 202, 275, 325, 328].

Длительность операции LILT составила  $263 \pm 74,7$  минут и достоверно не отличалась ( $p=0,61$ ) по времени проведения операции STEP, продолжительность которой была  $283 \pm 121,1$  минут. Это связано с тем, что у более 80% пациентов в обеих группах наблюдался выраженный спаечный процесс в брюшной полости, поэтому разъединение спаек занимало большую часть времени оперативного вмешательства. Кроме того, в ряде случаев во время операции выполнялись дополнительные хирургические процедуры (биопсия печени, установка/ замена тунелизованного центрального венозного катетера). В литературных источниках так же, как и в нашем исследовании описывается, что у пациентов с СКК часто встречается выраженный спаечный процесс, усложняющий проведение операции, а длительность хирургического вмешательства составляет в среднем 2-4 часа [97, 102, 192].

Дилатация тонкой кишки в LILT группе составила  $6,6 \pm 0,39$  см, в STEP группе  $6,5 \pm 0,83$  см. Данные достоверно не отличались. Стеноз тонкой кишки играл роль в развитии дилатации тонкой кишки лишь у 18% пациентов, в остальных случаях

дилатация тонкой кишки происходила в результате кишечной адаптации. Эти данные полностью совпадают с нашими данными в экспериментах на животных.

По литературным данным диаметр тонкой кишки при выполнении удлиняющих кишечник операций по методике LILT должен быть не менее 3-5 см, по методике STEP - 4 см [102, 137, 239, 325, 359, 362].

Длина тонкой кишки до удлинения в группе LILT составляла  $37,5 \pm 24$  см (медиана 32 (22,25; 42,25) см), в группе STEP –  $62,1 \pm 33$  см (медиана 55 (39; 80) см). Тонкую кишку удалось удлинить в среднем на  $31,6 \pm 17,02$  см (медиана 30 (20; 40) см), при помощи операции LILT и на  $27,4 \pm 12,54$  см (медиана 25 (20; 38,75) см) при помощи операции STEP. Данные достоверно не отличались ( $p=0,33$ ). Полученные нами результаты согласуются с данными Shah A.A. с соавторами [98], которые удлинители тонкую кишку при помощи операции LILT на  $29,6 \pm 16,1$  см и операции STEP на  $25 \pm 17,6$  см, с данными Fitzgerald K. [362], где при операции STEP тонкую кишку удалось удлинить в среднем на 40,9%-56,8%, и с данными, опубликованными в систематическом обзоре литературы, охватывающем основные публикации применения удлиняющих кишечник операций у детей с 1991 до 2012 года, где отмечено, что при операции LILT длину тонкой кишки удавалось удлинить в 1,25-2,0 раза, при операции STEP в 1,4-2,2 раза [137].

В послеоперационном периоде энтеральное питание вводилось в рацион в группе LILT с  $5,8 \pm 0,46$  дня, группе STEP с  $4,8 \pm 0,97$  дня. Статистически достоверных различий не было ( $p=0,59$ ). В нашем исследовании начало энтерального питания в послеоперационном периоде совпадало с данными литературы, а в некоторых случаях было немного более ранним, чем у других исследователей. Так, по данным основателя методики LILT Bianchi с соавторами [102, 105] энтеральное питание вводилось с 3-5 дня, по данным основателя методики Kim H. В. с соавторами – в течение 2-х недель [324], в работе, опубликованной Shah A.A. с соавторами [98] этот показатель составлял для LILT  $9,3 \pm 1,4$  дня, для STEP  $8 \pm 2,8$  дня.

Осложнения в раннем послеоперационном периоде, потребовавшие повторного хирургического вмешательства, изучались у всех пациентов после первичной удлиняющей операции (36 пациентов, которым была произведена операция LILT, 15 пациентам, которым была произведена операция STEP) и 12 пациентам, которым была произведена повторная операция STEP (reStep) по поводу рецидива дилатации тонкой кишки. Таким образом, были изучены осложнения после 36 операций LILT и 27 операций STEP. После операции LILT в 1 случае из 36 (2,8%) развилась несостоятельность анастомоза, в 1 случае (2,8%) – точечная перфорация тонкой кишки, в 1 случае (2,8%) – непроходимость и стеноз тонкой кишки и в 1 случае (2,8%) образовался межкишечный абсцесс. После операции STEP в 3 случаях из 27 (11,1%) была несостоятельность на месте анастомоза STEP и в одном случае из 27 (3,7%) была несостоятельность на месте еюно-ректального анастомоза конец-в-конец.

В литературе описано, что основными хирургическими осложнениями как LILT, так и STEP являются кишечная непроходимость и несостоятельность анастомоза, кишечные кровотечения, которые возникают у 10–20% пациентов [281, 301].

Выявленные в нашем исследовании осложнения, возникшие в раннем послеоперационном периоде после удлиняющих кишечник операций, встречаются реже по сравнению с данными, опубликованными в систематическом обзоре литературы Frongia G. с соавторами [137]. Так, автор описал, что непроходимость и стеноз тонкой кишки в среднем наблюдались в 17,7 % случаев, несостоятельность анастомоза – в 13,3%, формирование абсцесса в брюшной полости в – 6,6% случаев. Такое специфическое осложнение, как некроз одной из сформированных кишечных трубок, возникающее только после операции LILT, в нашем исследовании не наблюдалось, хотя по данным Frongia G. [137] это осложнение встречается в среднем у 10,6% пациентов. Перфорация кишечника в нашем исследовании встречалась только в 2,8% случаев, тогда как по данным литературы отмечена в 10,1% случаев. Frongia G. с соавторами [137] описали, что несостоятельность швов после операции STEP встречалась в 12,1% случаев, что

коррелирует с нашими данными. В этой же публикации описаны кишечные кровотечения после LILT в 16,1% случаев и после операции STEP в 22,2% случаев и непроходимость, и стеноз тонкой кишки после операции STEP в 17,5 % случаев и после операции LILT в 17,7 % случаев [137]. King В. с соавторами [214] в другом систематическом обзоре литературы описали, что общая частота хирургических осложнений составляет 17% для LILT и 26% для STEP, что несколько выше данных, описанных в нашем исследовании. Хотя такие осложнения, как несостоятельность анастомоза/перфорация кишки в нашем исследовании встречались чаще, по сравнению с описанными King В. с соавторами [214] данными: после операции STEP у 2 из 42 (4,7%) пациентов, после операции LILT у 10 из 238 (1,7%) пациентов. По данным Аверьяновой Ю. В. с соавторами [64] несостоятельность анастомоза после операции STEP развилась у 1 из 37 случаев (2,7%), что ниже полученных в нашей работе данных. Несостоятельность развилась на самом начальном этапе внедрения STEP (у первого пациента). По данным Fitzgerald К. с соавторами [362] на начальном этапе внедрения STEP несостоятельность анастомоза встречались у 2 из 12 пациентов (16,7%), в дальнейшем среди 24 пациентов несостоятельности анастомозов выявлено не было. В нашем исследовании так же, как и в приведённых выше работах несостоятельность анастомоза развивалась на начальном этапе внедрения STEP в клинике.

Результаты лечения и нутритивная поддержка в отдалённом периоде были изучены у 42 пациентов в сроки от 6 месяцев до 10 лет после проведения удлиняющих кишечник операций. За период наблюдения этим пациентам было выполнено: 27 операций LILT, 12 операции STEP, 3 операции LILT+STEP и 12 операций повторных удлиняющих операции reSTEP.

В отдалённом послеоперационном периоде среди осложнений, которые потребовали проведения релапаротомии, явились кишечные кровотечения у 1 из 25 (4%) пациентов после операции LILT и у 2 из 11 (18,2%) – после операции STEP. Частота кишечных кровотечений в нашем исследовании была ниже литературных данных для операции LILT, где этот показатель был в среднем 16,1%



(0–71,4%) и соответствовала уровню опубликованных данных для операции STEP, где этот показатель в среднем составлял в среднем 22,2% (7,1–33,3%) [137, 362].

В нашей работе межкишечные свищи встречались только после операции LILT и были выявлены у 4 из 25 (16%) пациентов, что несколько выше опубликованных в литературе данных в 3,7 – 12,2% [137].

Стенозы кишечника в нашем исследовании встречались у 9 пациентов из 25 (36%) после операции LILT, и у 2 пациентов из 11 (18,2%) после операции STEP, что значительно выше литературных данных для LILT, где этот показатель в среднем составлял 17,7% (7,4–42,8%) и соответствовал литературным данным для STEP, где в среднем этот показатель 17,5 % (5,3–33,3%) [137].

Анализ причин высокой частоты развития стенозов после операции LILT выявил, что у пациентов, у которых удлинени менее 20 см тонкой кишки, стенозы встречались у 4 из 5 пациентов (80%), в группе пациентов, у которой тонкая кишка была удлинена более 20 см, стенозы встречались у 5 из 20 (25%). Разница в данных была статистически достоверной ( $p < 0,05$ ). Отношение шансов показало, что удлинение тонкой кишки по методике LILT менее, чем на 20 см с большой вероятностью вызовет развитие стеноза тонкой кишки.

Этот феномен связан с технической особенностью операции LILT, на последнем этапе которой две сформированные кишечные трубки спиралевидно укладывались и антиперистальтически анастомозировались друг с другом, и с остальными участками кишечника, при этом, при слишком короткой длине удлинённого сегмента (менее 20 см), кишечные трубки сильно закручивались относительно друг друга, создавая предрасположенность к развитию непроходимости.

У 9 из 42 пациентов (21,4%) в отдалённом периоде развилась редилатация (повторная дилатация) тонкой кишки, по поводу которой была проведена повторная удлиняющая операция STEP (reSTEP). У одного ребенка reSTEP проводили 2 раза, у 1 – 3 раза. Таким образом, было проведено 12 операций reSTEP: операции LILT – 6 раз, после операции STEP – 2 раза, после reSTEP – 3 раза, после операции LILT +STEP – 1 раз.

В связи с тем, что редилатация тонкой кишки возникла через разный промежуток времени после удлиняющих кишечник операций (от 6 месяцев до 13 лет), мы рекомендуем проводить плановое изучение диаметра тонкой кишки при помощи лучевых методов исследования после удлиняющих кишечник операций каждые 6 месяцев.

Редилатации, по поводу которых проводились reSTEP были у 6 из 27 пациентов (22,2%) после операции LILT и у 5 из 12 случаев (41,6%) после операции STEP, что несколько ниже данных Frongia G. [137], где редилатация была описана у 39% пациентов после операции LILT и 49% пациентов после операции STEP. Однако, важным является то, что Frongia G. как и другие авторы поддерживают наше наблюдение, что редилатация тонкой кишки после операции STEP возникает чаще, чем после операции LILT [137, 214, 281].

В нашем исследовании, как и в данных литературы [98, 137, 281], интраоперационной летальности не было ни в группе LILT, ни в группе STEP. Один пациент из 54 (1,9%) умер в результате осложнений в раннем послеоперационном периоде, 2 из 42 (4,8%) умерли в отдалённом периоде, в обоих случаях причиной летальных исходов были катетер-ассоциированный сепсис. По результатам нашего исследования смертность оказалась ниже опубликованной в систематическом обзоре Frongia, в котором летальность после операции LILT составила 30,2% (14,3%-68%), после операции STEP 14,3% (0%-21,4%) [137]. Основными причинами смерти пациентов с СКК по данным литературы являются катетер-ассоциированный сепсис и связанное с парентеральным питанием поражение печени (PNALD, IFALD) [122, 137, 281].

В результате ретроспективного анализа результатов хирургического лечения 54 детей с СКК, а также на основании анализа литературных данных, были систематизированы (специфицированы) показания и противопоказания к операции LILT и STEP. Операцию LILT рекомендуется проводить только при длине расширенного участка тонкой кишки 20 см и более. После операции LILT повторная дилатация развивается в 2 раза реже, чем после операции STEP. Это связано с тем, что операция LILT не меняет физиологического направления

продольного и поперечного мышечных слоёв тонкой кишки, что, впоследствии, играет положительную роль в моторике и функции кишечника, и предупреждении развитии повторных дилатаций [363]. Преимуществом STEP является возможность применения данной операции даже на коротких участках дилатированной кишки (менее 20 см), на несимметрично расширенных участках тонкой кишки, а также на двенадцатиперстной кишке. Кроме того, технически данный метод более простой в проведении, в отличие от метода LILT, кроме того при операции STEP не вскрывается просвет кишки. В случае повторной дилатации на прооперированном участке (независимо от техники LILT или STEP) возможно проведение повторной операции STEP (reSTEP).

Восстановление полного энтерального питания (отказ от парентерального питания) является важнейшим параметром эффективности проводимой терапии у пациентов с синдромом короткой кишки.

Обследование проводилось регулярно в возрасте от 1 до 10 лет после удлинняющей кишечник операции, 22 из 42 пациентов (52,4%) удалось перейти на полное энтеральное питание, остальные 20 (47,6%) на момент проведения исследования находились на парентеральном питании.

Перейти на полное энтеральное питание удалось у 59% пациентов после операции LILT и 42% после операции STEP. Однако, как мы уже описывали выше, удлинение тонкой при помощи операции LILT менее чем на 20 см, приводило к развитию стенозов тонкой кишки у 4 из 5 пациентов (80%), что значительно ухудшало клиническое состояние больных в отдалённом периоде. Им были проведены повторные операции для резекции этих стенозов. В связи с этим, мы изучили нутритивный статус пациента, в зависимости от типа проведённой операции (LILT или STEP), и от длины удвоенного участка тонкой кишки при операции LILT (менее 20 см или 20 см и более). Восстановить полное энтеральное питание после операции LILT при удлинении более тонкой кишки на 20 см и более удалось у 67%, после операции LILT при удлинении участка тонкой кишки менее 20 см удалось лишь у 33%. Отношение шансов позволяет предположить, что удлинение тонкой кишки по методике LILT более чем на 20 см

с большой вероятностью, позволит перейти на полное энтеральное питание. При более детальном изучении видно, что полное энтеральное питание восстановили через год после удлиняющей операции – 12 пациентов, в течение последующих трёх лет – 6 и через 5 лет и более – 4 пациента. По данным литературы доля пациентов, перешедших на полное энтеральное питание в различных статьях после операции LILT сильно варьировала и составляла от 4% до 100% пациентов, после операции STEP от 20% до 100% пациентов [19, 64, 103, 137, 166, 303, 359].

Из 42 обследованных пациентов у 4 присутствовал илеоцекальный клапан. В течение года после удлиняющей кишечник операции 3 из 4 пациентов (75%) были переведены на полное энтеральное питание, двум из них была проведена операция LILT, одному пациенту STEP.

Мы проанализировали время перехода на энтеральное питание в зависимости от наличия толстой кишки. Наиболее быстро (в течение одного года) восстановили полное энтеральное питание преимущественно те пациенты, у которых присутствовала вся толстая кишка и те, у которых было более половины толстой кишки. Больные с СКК, которые восстановили полное энтеральное питание через 3 года, были преимущественно с сохраненной половиной толстой кишки. Пациенты с наличием менее трети толстой кишки или с её отсутствием требовали более длительного периода времени для восстановления полного энтерального питания (5 лет и более). Важно, что длина тонкой кишки после удлинения в трёх группах колебалась от 76 до 86 см и достоверно не отличалась.

Для того, чтобы оценить статус нутритивной поддержки у пациентов с учётом фактора времени, был проведён анализ по Каплан-Майеру, который показал схожие результаты. После операции LILT при удлинении тонкой кишки более, чем на 20 см, отказ от парентерального питания достигается наиболее быстро. После операции STEP, отказ от парентерального питания происходит медленнее. После операции LILT и при удлинении тонкой кишки менее, чем на 20 см, наблюдаются наихудшие результаты, которые через год после операции не показывали положительной динамики. Пациенты, у которых имеется илеоцекальный клапан намного быстрее и эффективнее переходят на полное

энтеральное питание. Если у пациентов присутствует менее 30% тонкой кишки, вероятность перехода таких пациентов на энтеральное питание достоверно ниже ( $P=0,0467$ ) и более 60% пациентов остаются на парентеральном питании в течение следующих 10-15 лет. У пациентов, у которых присутствовала вся толстая кишка или лишь её половина, показали сходные результаты, что через 5 лет более 60% пациентов переходят на полное энтеральное питание.

Несмотря на то, что есть исследования, не выявившие влияния илеоцекального клапана и толстой кишки на переход пациентов на полное энтеральное питание [64, 98], наши данные говорят об обратном и подтверждают предположения других авторов [122, 129, 158, 281].

Предположение, что редилатация тонкой кишки препятствует переходу пациентов с СКК на энтеральное питание было высказано рядом авторов, однако влияние редилатации на скорость достижения полного энтерального питания у пациентов с СКК изучено не было [192, 253, 281, 337].

Наши исследования показали, что редилатация тонкой кишки замедляет переход на энтеральное питание на 6-7 лет. Кроме того, при СКК после гастрошизиса повторное расширение тонкой кишки возникает в два раза чаще после операции STEP, чем после LILT. Lemoine С. с соавторами [305] публикуют, что пациентам с СКК после гастрошизиса намного чаще проводилась операция reSTEP, чем при других первичных диагнозах и отмечают, что эти пациенты могут иметь менее благоприятные результаты после STEP из-за дилатации кишечника, в условиях нарушения моторики, которое может быть усугублено второй процедурой STEP.

Нами проанализировано влияние длины тонкой кишки, полученной после проведения удлиняющей кишечник операции, на статус нутритивной поддержки пациентов с СКК. На основании проведенного ранее анализа были определены факторы, влияющие на переход пациента на энтеральное питание. Для того, чтобы данные факторы не влияли на результаты исследования из 42 пациентов, обследованных в отдалённом периоде, мы выбрали 21 пациента, которым были проведены удлиняющие кишечник операции в возрасте до 3-х лет, у которых

имелось 50% и более толстой кишки и не развилась редилатация тонкой кишки. В результате анализа нами было установлено, что через 18 месяцев после проведенной удлиняющей кишечник операции, вероятность перехода на полное энтеральное питание была достоверно выше у тех пациентов, у которых длина тонкой кишки после удлинения была  $75,9 \pm 26,87$  см, по сравнению с теми, у этого показатель составил  $47,4 \pm 17,53$  см. Наши результаты согласуются с данными, опубликованными Аверьяновой Ю.В. с соавторами [64], которыми также было продемонстрировано, что длина резидуальной тонкой кишки оказывает влияние на восстановление энтерального питания. Так, было показано, что пациенты, имевшие до операции STEP длину тонкой кишки менее 30 см, не смогли перейти на полное энтеральное питание [64]. Доля достигших энтеральной автономии среди пациентов с длиной тонкой кишки более 30 см (до операции STEP) составила 56,5%. Влияние наличия толстой кишки на переход на энтеральное питание статистически доказано не было [64]. Goulet O. с соавторами [277] отметили, что зависимость от парентерального питания выше у пациентов с СКК, имеющих менее 40 см тонкой кишки. В публикации Pakarinen с соавторами [281] описано, что среди 7 прооперированных методиками LILT или STEP больных детей у всех пациентов (4 ребёнка) с длиной тонкой кишки до удлиняющей кишечник операции более 47 см и у одного - с длиной кишечника 30 см полностью удалось восстановить энтеральное питание в течении 18 месяцев, что подтверждает наши данные.

Учитывая тот факт, что у 5 пациентов в нашем исследовании переход на полное энтеральное питание наступил через 8-10 лет после проведенной удлиняющей кишечник операции, период наблюдения за пациентами должен быть не менее 10 лет.

Суммируя вышесказанное, несмотря на то, что удлиняющие кишечник операции патоморфологически обоснованы и их применение улучшает результаты лечения, более 60% пациентов с СКК с короткой остаточной тонкой кишкой, её редилатацией, отсутствием илеоцекального клапана и/или наличием менее трети толстой кишки не смогли отказаться от парентерального питания и

перейти на полное энтеральное питание. Неудовлетворённость результатами хирургического лечения детей с СКК, а также описанная в литературе, низкая эффективность трансплантации кишечника [194, 376], обосновали целесообразность разработки нового стратегического подхода хирургического лечения детей с синдромом короткой кишки – создания биоинженерной тонкой кишки при помощи тканевой инженерии для применения её в лечении пациентов с СКК. Это и поставило перед нами задачи – решение ключевых нерешённых проблем тканевой инженерии тонкой кишки.

Тканевая инженерия, способная обеспечить персонифицированный подход в хирургии, предлагает инновационный подход к лечению пациентов с СКК [3, 68, 142], используя оптимально подобранные матрицы и органоспецифические клетки самого пациента [68]. Несмотря на то, что способность иннервировать искусственно выращенный мышечный слой, является ключевым элементом для создания функционального кишечника, нервных сплетений кишечника, выращенных при помощи тканевой инженерии до настоящего времени нет [110, 147, 157, 196].

Разработка метода выращивания клеток нервной системы кишечника *in vitro*, образующих нервные сплетения в трехмерной среде проводилась в рамках разработки методики тканевой инженерии тонкой кишки. Для решения поставленной задачи нами в трёхмерном матриксе на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO – A Division of BioTime, Inc., USA) выращивались клетки межмышечных нервных сплетений, выделенные из крыс рода Sprague-Dawley по методике, разработанной Schäfer с соавторами [8585]. Размещали 100 000 клеток внутри 100 мкл HyStem®-C матрикса. Культуру клеток выращивали в течение 10-21 суток при температуре 37°C и 5% концентрации CO<sub>2</sub> в специально разработанной культуральной среде с добавлением факторов роста и антибиотиков в 100 мл Neurobasal medium (Gibco) добавляли 1 мл альбумина (Sigma-Aldrich), 100 мкл раствора метронидазола (5мг/1мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глутамина (Sigma-Aldrich) и 100 мкл меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 2 мл B27 Supplement (Gibco), 100 мкл GDNF

(glial cell line-derived neurotrophic factor) (1 нг/мл), 100 мкл EGF (epidermal growth factor) (1 нг/мл) и 200 мкл bFGF (fibroblast growth factor-basic) (1 нг/мл). Смена культуральной среды производилась каждые 48 ч.

Выбор матрикса на основе гиалуроновой кислоты основывался на том, что этот тип матрикса имеет уникальные физико-химические и биологические свойства, делающие этот матрикс пригодным для выращивания клеток нервной системы, стволовых клеток и других типов клеток в тканевой инженерии, и регенеративной медицине [92, 135, 177, 200, 254].

Изучение живой культуры клеток под микроскопом на восьмые сутки выращивания показало пролиферирующие клетки нервной системы кишечника, со сформировавшимися отростками. Клетки образовали взаимосвязи, как с другими клетками, так и с нейросферами (скоплениями стволовых нервных клеток). Хороший рост и выраженная пролиферация нейронов в созданных нами условиях подтверждает и обосновывается тем фактом, что гиалуроновая кислота, содержащаяся во внеклеточном матриксе, влияет на развитие нейронов в неокортесе человека, делает нейроны более пластичными и способными к росту, влияя на экспрессию рецепторов на нейронах [135, 173, 198].

Из-за того, что в отличие от обычных 2-х мерных культур, полученные нами клетки, выращивались в трёхмерном матриксе, возникла необходимость характеристики еще одного параметра – глубины. В связи с этим, для определения оптических слоев в трёхмерной культуре клеток нами был использован конфокальный микроскоп. При микроскопировании культур клеток нервной системы кишечника, окрашенных антителом  $\beta$  Tubulin III – для визуализации нервных клеток и DRAQ5 – для визуализации ядер, были обнаружены, как небольшие скопления, близко расположенных друг к другу нейронов, так и большие скопления нейронов, которые были объединены между собой отростками. Было изучено большое скопление нейронов, содержащее множество клеток, связанных между собой и формировавших нервное сплетение размерами 200  $\mu$ m на 250  $\mu$ m на 50  $\mu$ m. В отличие от большинства исследований, в которых описывается применение матриксов на основе гиалуроновой кислоты для



изучения роста нервных клеток в матриксе для регенерации поврежденных нервных тканей *in vivo* [135, 154, 199], в нашем исследовании мы смогли из отдельно взятых нейронов кишечника вырастить функционирующие нервные сплетения *in vitro*.

В доступной литературе не описано выращивание дифференцированных и взаимодействующих нервных клеток кишечника в трёхмерной среде с целью использования в тканевой инженерии. Методика по выделению нервных клеток кишечника, описанная Schäfer с соавторами [85], позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника только на плоскости. Однако, для тканевой инженерии ключевым условием является культивирование клеток в трёхмерных средах, что и удалось выполнить в нашей работе, благодаря выбору оптимального матрикса на основе гиалуроновой кислоты и подбору оптимальных условий для выживания, размножения и роста клеток. Применение конфокальной микроскопии и иммуноспецифического окрашивания клеток позволило доказать, что выращенные клетки являются нейронами и обнаружить взаимосвязи между клетками, и выявить комплексную трёхмерную структуру сплетений клеток в трёхмерной среде. В представленной работе показана возможность выращивания клеток нервной системы кишечника, формирующих друг с другом связи, а также нервные сплетения *in vitro* в трёхмерной среде. Разработанный нами метод позволяет вырастить клетки нервной системы кишечника, формирующих связи друг с другом в трёхмерной среде и нервные сплетения, что является важнейшим элементом для создания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки путем тканевой инженерии.

Следующим этапом наших исследований явилась разработка метода выращивания клеток нервной системы кишечника совместно с мышечными клетками в трёхмерной среде для получения иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям и выявление взаимосвязей между энтеральной нервной системой и гладкомышечными клетками. Для решения поставленной задачи помимо клеток межмышечного нервного сплетения, выделенных по вышеописанной методике и матрикса на основе гиалуроновой

кислоты HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA), были использованы кишечные гладкомышечные клетки крыс (Sprague–Dawley), приобретенные в Pelco Biotech (Германия).

В результате наших экспериментов мы выявили оптимальные условия для роста мышечных клеток и клеток энтеральной нервной системы в трёхмерном матриксе. Оптимальные условия были следующими: концентрация углекислого газа в инкубаторе  $CO_2=5\%$ , температура в инкубаторе  $t=37^{\circ}C$ , культуральный раствор DMEM-F12 с добавлением глутамина, меркаптоэтанол, B27 Supplement, сывороточного альбумина телёнка, антибиотиков (метронидазол, гентамицин), факторов роста (GDNF, EGF, bFGF) и фетальной бычьей сыворотки. Оптимальная концентрация мышечных клеток 50 000 клеток на 100 мкл матрикса, ЭНС-клеток 100 000 клеток 100 мкл матрикса.

На основании изученных различных типов взаимного расположения мышечных клеток и клеток энтеральной нервной системы в матриксе, нам удалось выявить оптимальный тип расположения клеток, когда нервные клетки располагались компактно в среднем слое матрикса, а мышечные клетки – в верхнем и нижнем слоях.

В ходе выращивания клеток при помощи световой микроскопии ежедневно проводилась оценка состояния клеточных структур. На 4-й день культивации клеток в среднем слое матрикса, содержащем клетки энтеральной нервной системы, наблюдались рост клеток и межклеточные взаимодействия. На 8-й день эксперимента нам стала отчётливо видна структура, состоящая из множества клеток, образующих сеть. На 12-й день культивирования клеточная структура приобрела очертания мышечных пучков, при этом клетки располагались параллельно друг к другу. На 16-й день от начала исследования клеточные культуры зафиксировали и провели иммунофлюоресцентное окрашивание нервных клеток при помощи маркера нейронов ( $\beta$ -Tubulin III), и мышечных клеток при помощи маркера гладкомышечных клеток (smooth muscle actin (SMA)). В ходе проведения иммунофлюоресцентной микроскопии было установлено, что образовавшаяся структура состоит из мышечных и нервных

клеток, которые обладают очень важным свойством – сократительной активностью. С 12 дня выращивания культур мы наблюдали сократительную активность мышечных пучков, которая возникала спонтанно и длилась всё время микрокопирования (5 минут). Нами впервые была создана мышечная ткань кишечника, способная к сокращениям. Наши данные принципиально отличаются от опубликованных в литературе, где что органоидные единицы успешно генерируют мышечный слой, нервные клетки при совместном культивировании клеток гладких мышц и нейральных предшественников [108, 291], которые реагируют на воздействие экзогенных сократительных/релаксантных транмиттеров [347]. Однако показанная таким образом сократимость, является автономной сократимостью отдельных мышечных клеток и не является нервно-опосредованной. Этот факт доказывает другое исследование, в котором выращенная монокультура мышечных клеток, без нервных клеток реагировала в виде сокращений на физиологически значимые вещества, что указывало на сохранение структурных рецепторов для агонистопосредованных путей сокращения/расслабления, связанных с G-белком [107], но не на скоординированную, нервно-опосредованную реакцию и неспособную создать перистальтику в биоинженерной кишке.

Просвечивающая электронная микроскопия показала, что выращенные в данном эксперименте мышечные волокна гистологически имели сходное строение с гладкомышечными волокнами кишечника: мышечные клетки плотно прилегали друг к другу, имели вытянутую форму, большие ядра и актиновые микрофиламенты. Кроме того, обнаруженные при электронной микроскопии кавеолы - небольшие колбообразные впячивания плазматической мембраны, свидетельствуют об активном метаболизме клеток. Идентификация кавеол в полученных нами мышечных волокнах является важным доказательством активности выращенных клеток. Кавеолы участвуют во множестве клеточных процессов, в разнообразных путях внутриклеточной передачи сигналов. Известно, что множество факторов роста, рецепторов, киназ и других молекул,

участвующих во внутриклеточной сигнализации, локализованы в кавеолах [284]. Кроме того, кавеолы участвуют в механотрансдукции [152].

Для того, чтобы изучить взаимодействие мышечных клеток и энтеральных нейронов в клеточных культурах нами проведено флюоресцентное иммуногистохимическое исследование фиксированной культуры клеток, выращенной в трёхмерном матриксе. При этом были обнаружены очень тесные взаимодействия между мышечными клетками и энтеральными нейронами, как на уровне отдельных клеток, так и на уровне мышечных пучков.

Основной задачей следующего этапа исследования явилось установление основных механизмов, с помощью которых энтеральные нейроны влияют на пролиферации мышечных клеток. Было выявлено, что мышечные клетки, культивируемые отдельно в трехмерной среде, сохраняли свою круглую форму, не удлинялись и не росли. В случае паракринного взаимодействия между гладкомышечными клетками и клетками нервной системы, выделенными из кишечника, наблюдалась умеренная пролиферация мышечных клеток и формирование мышечных пучков. Интересно, что в мышечных пучках были обнаружены единичные нейроны. Мы полагаем, что нейроны пролиферировали из остатков нейрон-стволовых клеток в культуре клеток гладкой мускулатуры тонкого кишечника крысы, под влиянием паракринных факторов нервной системы кишечника. Культивирование клеток гладких мышц в тесном контакте с клетками нейронами привело к формированию большого количества мышечных пучков с сократительной активностью. Помимо мышечных клеток, мышечные пучки состояли из множества нейронов, которые были расположены в виде групп клеток, а также отдельных клеток с длинными взаимосвязанными отростками. При этом наблюдалось тесное взаимодействие нейронов с мышечными клетками.

Трёхмерная реконструкция мышечных пучков, микроскопированных при помощи конфокальной микроскопии, показала, что клетки нейроны, расположенные в мышечных пучках, не только тесно контактируют с мышечными клетками, но также образуют трёхмерную нейронную сеть внутри мышечных слоев. Наши исследования позволяют утверждать, что клетки нейроны

формируют остов для мышечных клеток, стимулируют их рост и дифференцировку, и согласованный ответ в виде сокращения, что, по нашему мнению, имеет решающее значение для создания иннервированных мышечных слоев, способных к сокращениям. В отличие от опубликованных работ, где описаны единичные элементы нервной системы в кишечнике, такие как глиальные клетки [196] и нейрональные предшественники [108], в нашей работе мы создали мышечные слои тонкой кишки, содержащие межмышечные нервные сплетения, наличие которых позволяет биоинженерной тонкой кишке обладать перистальтикой.

Совместное культивирование энтеральных нейронов и мышечных клеток при правильном их расположении в трёхмерном матриксе делает возможным создание искусственного иннервированного мышечного слоя. Клетки нервной системы, выделенные из кишечника, специфически взаимодействуют с мышечными клетками, как на уровне отдельных клеток, так и на тканевом уровне, посредством прямого контактного воздействия друг на друга, а также путем паракринного взаимодействия между собой. Очевидно, это имеет решающее значение для функционального взаимодействия между гладкими мышцами и нервными клетками кишечника, для создания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к созданию перистальтических сокращений.

Таким образом, комплексный и разносторонний подход к диагностике и лечению СКК, включающий изучение патоморфологических особенностей, патогенетических механизмов развития осложнений, осознанный и обоснованный выбор диагностических и лечебных методик, использование новейших технологий и достижений современной тканевой инженерии, позволят вывести, по нашему мнению, решение проблемы на кардинально новый уровень, значительно улучшить такие целевые показатели, как выживаемость, восстановление энтерального питания и качество жизни.

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментально-клиническое исследование выявило, что, несмотря на то, что удлиняющие кишечник операции патоморфологически обоснованы и их применение улучшает результаты лечения, у более 60% пациентов с СКК с короткой остаточной длиной тонкой кишки, её редилатацией, отсутствием толстой кишки полное энтеральное питание не восстанавливается. В то же время прогресс в развитии тканевой инженерии тонкой кишки позволяет рассматривать разработку биоинженерной тонкой кишки в качестве нового стратегического подхода хирургического лечения детей с синдромом короткой кишки.

2. У крыс через 2 недели после создания СКК происходит дилатация тощей (в 1,8 раза) и подвздошной (в 1,2 раза) кишки, и гипертрофия их мышечных слоёв. При СКК наблюдается увеличение количества межмышечных нервных сплетений, содержащих стволовые клетки и увеличение доли стволовых клеток в самих межмышечных сплетениях, как в тощей, так и в подвздошной кишке. Увеличивается экспрессия стволовых клеток в мышечных слоях у крыс с СКК в тощей и подвздошной кишке. Определяется сильная корреляция гипертрофии мышечных слоёв тонкой кишки с долей стволовых клеток в межмышечном сплетении ( $r=0,7524$ ), и с экспрессией стволовых клеток в мышечных слоях ( $r=0,7597$ ), что доказывает взаимное влияние мышечных клеток и энтеральных нейронов друг на друга, их совместную реакцию на развитие СКК.

3. У пациентов с СКК процентное содержание нейронов в межмышечных нервных сплетениях при СКК остаётся неизменным, однако доля стволовых клеток увеличивается более чем в 2 раза. Увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях при СКК полностью согласуется с результатами, полученными при экспериментах на животных, и позволяет экстраполировать экспериментальные данные о дилатации тонкой кишки и гипертрофии мышечных слоёв на пациентов с СКК. Дилатация тонкой кишки с

гипертрофией её мышечного слоя является патофизиологическим механизмом СКК, позволяющим проводить удлиняющие кишечник операции.

4. При выявлении дилатации тонкой кишки УЗИ, РКИ и гидро-МРТ органов брюшной полости, обладают высокой чувствительностью. При определении стенозов УЗИ характеризуется низкой чувствительностью, в то время как РКИ и гидро-МРТ – высокой. Измерение длины сохранившейся тонкой кишки методом УЗИ не представляется возможным. Гидро-МРТ и РКИ обладают высокой точностью измерения при длине тонкой кишки до 30 см, средней – при длине 30-70 см и низкой – при длине более 70 см.

5. Предоперационная подготовка, длительность операции и послеоперационное ведение при операции LILT и операции STEP не различаются. Показания для операций LILT и STEP различаются и зависят от наличия брыжейки тонкой кишки, длины и формы дилатированного участка тонкой кишки. Одновременное проведение LILT и STEP не увеличивает интраоперационных рисков.

6. При удлинении тонкой кишки на 20 см и более методом LILT полного отказа от парентерального питания удаётся добиться у 67% пациентов, при удлинении кишки менее 20 см – у 33% больных, после операции STEP – у 42% пациентов. После удлиняющих кишечник операций при наличии более половины толстой кишки и длине тонкой кишки от 76 до 86 см, переход на полное энтеральное питание происходит в течение 1-3 лет. Через 18 месяцев после удлинения тонкой кишки до  $75,9 \pm 26,87$  см, выполненной пациентам в возрасте до 3-х лет, вероятность перехода на полное энтеральное питание статистически достоверно выше по сравнению с пациентами, кому удалось увеличить длину тонкой кишки лишь до  $47,4 \pm 17,53$  см, при наличии у пациентов более половины толстой кишки и отсутствии редилатации тонкой кишки. У пациентов, у которых отсутствует илеоцекальный клапан и имеется не более трети толстой кишки в более чем в 60% случаев не удаётся восстановить полное энтеральное питание. Редилатация тонкой кишки замедляет переход на энтеральное питание на 6-7 лет. Вышеперечисленное свидетельствует, что хирургические методы лечения не

излечивают значительную часть пациентов и диктует необходимость разработки инновационных методов лечения, таких как тканевая инженерия кишечника.

7. В эксперименте разработан метод выращивания культуры клеток межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе, позволяющий создать нервные сплетения для иннервированного мышечного слоя стенки тонкой кишки при помощи тканевой инженерии.

8. В эксперименте разработан метод выращивания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки в трёхмерном матриксе, способного к сокращениям. Нервная система кишечника тесно взаимодействует с мышечными клетками, как морфологически, так и функционально, и является ключевым элементом при создании мышечного слоя тонкой кишки, способного к созданию перистальтических сокращений в биоинженерной тонкой кишке.



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Показанием для операции LILT является симметричная дилатация тощей и подвздошной кишки, диаметром более 5 см и протяженностью более 20 см. Показанием для STEP являются симметричная и несимметричная дилатация двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишки диаметром более 5 см, а также повторная дилатация тонкой кишки после удлиняющих операций. Противопоказанием к операции LILT является дилатация тонкой кишки протяженностью менее 20 см.

2. Пациентам с СКК необходимо проводить измерение диаметра тонкой кишки при помощи УЗИ, в осложнённых случаях РКИ или МРТ каждые 6 месяцев, как до удлиняющих кишечник операций, так и в течение 10 лет после них. Это позволит выявить дилатацию и редилатацию тонкой кишки и выставить показания к применению удлиняющих кишечник операций.

3. УЗИ обладает высокой чувствительностью при выявлении дилатации тонкой кишки и является скрининговой методикой для пациентов с СКК. При выявленной на УЗИ дилатации тонкой кишки более 5 см рекомендуется проводить РКИ. В осложнённых случаях, когда РКИ не может дать требуемую информацию, следует проводить гидро-МРТ, которая является методом, позволяющим наиболее точно оценить морфологию тонкой кишки.

4. При подготовке к гидро-МРТ пациентам старше 8 лет за 1 час до проведения исследования необходимо выпить 1-1,5 литра раствора маннитола. Пациентам младше 8 лет, исследование рекомендуется проводить под наркозом. При этом раствор маннитола перед исследованием принимать не нужно.

5. Удлиняющие кишечник операции необходимо проводить детям в возрасте старше одного года, так как на протяжении первого года жизни у ребёнка происходит интенсивный рост кишечника, который может быть нарушен проведённой удлиняющей операцией.

6. Показанием для проведения повторной удлиняющей операции по методике STEP является дилатация тонкой кишки более 5 см, развившаяся после проведённой удлиняющей кишечник операции (LILT или STEP).

7. Редилатация тонкой кишки является прогностически неблагоприятным фактором и замедляет переход на энтеральное питание на 6-7 лет.

8. У пациентов с первичным диагнозом гастрошизис: после операции STEP редилатация тонкой кишки развивается в два раза чаще, чем после LILT.

9. Наличие илеоцекального клапана и более половины толстой кишки являются положительными прогностическими факторами, поэтому при обширной резекции кишечника по поводу пороков развития и заболеваний у новорождённых необходимо максимально сохранить толстую кишку и илеоцекальный клапан, что способствует переходу пациентов с СКК на полное энтеральное питание. При наличии более половины толстой кишки переход на полное энтеральное питание достигается у большинства пациентов в течение трёх лет.

10. Прогноз перехода на полное энтеральное питание через 18 месяцев после удлиняющих кишечник операций, выполненных пациентам в возрасте до 3-х лет, более благоприятный у пациентов, у которых удалось удлинить тонкую кишку до  $75,9 \pm 26,87$ , по сравнению с теми, кому удалось удлинить тонкую кишку лишь до  $47,4 \pm 17,53$  см, при наличии у пациентов более половины толстой кишки и отсутствии редилатации тонкой кишки.

11. Период наблюдения за пациентами с СКК должен быть не менее 10 лет.

12. Данные о пациентах с СКК необходимо вносить в Российский регистр детей с синдромом короткой кишки. Лечение синдрома короткой кишки должно проводиться в специализированных центрах с участием междисциплинарной команды специалистов, а курацию пациентов на местах необходимо осуществлять совместно со специалистами этих центров.

13. Метод выращивания культуры клеток межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе позволяет вырастить нейроны, которые

формируют связи в трёхмерной среде и образуют нервные сплетения, играющие ключевую роль для перистальтики биоинженерного мышечного слоя. При культивировании межмышечного нервного сплетения важными элементами являются концентрация клеток в матриксе (например, 100 000 клеток на 100 мкл в матриксе на основе гиалуроновой кислоты), использование подходящей культуральной среды (например, Neurobasal medium), добавление глутамина, меркаптоэтанола, B27 Supplement, антибиотиков (например, метронидазола и гентамицина), альбумина и факторов роста (GDNF, EGF, bFGF).

14. Метод выращивания иннервированного, способного к сокращениям мышечного слоя тонкой кишки позволяет создать иннервированный мышечный слой кишечника, способный к сокращениям, обеспечивая тем самым решение одной из важнейших задач тканевой инженерии кишечника – создание мышечного слоя кишечника, способного к перистальтическим сокращениям. Ключевыми элементами данной методики являются взаимное расположение клеток. Клетки нервной системы кишечника следует располагать в среднем слое матрикса между скоплениями мышечных клеток. Концентрация мышечных клеток 50000 клеток на 100 мкл матрикса, клеток нервной системы - 100000 клеток, использование универсальной культуральной среды, подходящей для обоих типов клеток (например, DMEM-F12), добавление глутамина, меркаптоэтанола, B27 Supplement, альбумина, антибиотиков (метронидазола, гентамицина), факторов роста (GDNF, EGF, bFGF) и фетальной бычьей сыворотки.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АХР – аутогенная хирургическая реконструкция
- БГМУ – Башкирский государственный медицинский университет
- ВДП – верхние дыхательные пути
- ИВЛ – искусственная вентиляция лёгких
- ИДПО – Институт дополнительного профессионального образования
- РДКБ – Республиканская детская клиническая больница
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- МЗ – Министерство здравоохранения
- МРТ – магнитная резонансная томография
- ОАК – общий анализ крови
- ОАМ – общий анализ мочи
- ПП – парентеральное питание
- РКИ – рентгенконтрастное исследование кишечника
- РФ – Российская Федерация
- СКК – синдром короткой кишки
- ЧСС – частота сердечных сокращений
- ЭКГ – электрокардиограмма
- ЭНС – энтеральная нервная система
- ЭОС – электрическая ось сердца
- ЭХО-КГ – эхокардиография
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- bFGF – Basic Fibroblast Growth Factor
- BSA – Bovine Serum Albumin
- DAPI – 4',6-Diamidin-2-phenylindol
- DMEM-F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DRAQ5 – 1, 5-bis {[2-(di-methylamino)ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione.

EGF – Epidermal Growth Factor

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor

GLP 2– Glucagon-like peptide-2 (глюкагоноподобный пептид 2)

ICC - интерстициальные клетки Кахаля

LILT – Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (продольное кишечное удлинение и ушивание)

MEM – Minimum Essential Media (минимально необходимая культуральная среда)

NGS – Normal Goat Serum (нормализованная козья сыворотка)

PGA – полигликолевая кислота

PLA – полилактатная кислота

PCL – поли-ε-капролактон

PLGA – гликолевая кислота

SMA – Smooth Muscle Actin (гладкомышечный актин)

STEP– Serial transverse enteroplasty (последовательная поперечная энтероластика)

SILT– Spiral Intestinal Lengthening and Tailoring (спиральное кишечное удлинение и ушивание)

reSTEP– повторная последовательная поперечная энтероластика

TBST–Tris Buffered Saline with Tween

Trypsin-EDTA – трипсин с этилендиаминтетрауксусной кислотой

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние метаболической активности кишечной микрофлоры на нутриционный статус пациентов с сочетанной резекцией кишечника / Л.Н. Костюченко, Т.Н. Кузьмина, О.А. Смирнова, С.Ю. Сильвестрова // *Consilium Medicum*. – 2016. – Т. 18, № 8. – С. 101–104.
2. Возможности применения препаратов оликлиномель (N8–800, N4–1000E, N7–1000E) в парентеральном питании / А.Е. Шестопалов [и др.] // *Вестник интенсивной терапии*. – 2013. – № 4. – С. 67–72.
3. Возможности тканевой инженерии на модели синдрома короткой кишки / А.А. Кокорина, А.В. Косулин, Л.Н. Бельдиман [и др.] // *Медицина: теория и практика*. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 40–41.
4. Геронтологические особенности негативных предпосылок для возникновения синдрома «короткой кишки» / Б.И. Слонецкий, Н.И. Тутченко, И.В. Вербицкий [и др.] // *Экстренная медицина*. – 2014. – № 3 (11). – С. 54–60.
5. Гидро МРТ в диагностике патологии тонкой кишки / В.Ю. Собко, Т.Н. Трофимова, А.К. Карпенко, О.Б. Щукина // *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. – 2009. – № 2. – С. 143–5.
6. Головач, И.Ю. Нарушения минеральной плотности костной ткани и вторичный остеопороз при патологии гепатобилиарной системы и желудочно–кишечного тракта: на перекрестке проблем / И.Ю. Головач // *Боль. Суставы. Позвоночник*. – 2012. – № 3 (7). – С. 49–60.
7. Гончарик, И.И. Синдром короткой тонкой кишки / И.И. Гончарик // *Здравоохранение (Минск)*. – 2012. – № 2. – С. 29–31.
8. Горбатюк, О.М. Особенности питания детей с синдромом короткой кишки / О.М. Горбатюк // *Современная педиатрия*. – 2011. – № 2 (36). – С. 134.

9. Дуброва, С.Э. Возможности лучевых методов в диагностике воспалительных заболеваний кишечника / С.Э. Дуброва, Г.А. Сташук // Альманах клинической медицины. – 2016. – № 6. – С. 757–69.

10. Ерпулева, Ю.В. Парентеральное и энтеральное питание детей: практические рекомендации / Ю.В. Ерпулева, А.И. Чубарова, О.Л. Чугунова. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2016.

11. Ерпулёва, Ю.В. Роль аминокислот в программе парентерального питания у детей / Ю.В. Ерпулёва // Трудный пациент. – 2014. – Т. 12, № 1–2. – С. 29–32.

12. Ерпулева, Ю.В. Синдром короткой кишки у детей: причины развития и основные подходы к лечению / Ю.В. Ерпулева, А.У. Лекманов, А.К. Коновалов // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 1. – С. 49–53.

13. Ерпулёва, Ю.В. Современные возможности нутритивной поддержки в педиатрии / Ю.В. Ерпулёва // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 5, № 1. – С. 108–110.

14. Ерпулёва, Ю.В. Современные технологии парентерального питания у новорожденных и детей раннего возраста / Ю.В. Ерпулёва, О.Л. Чугунова, Н.П. Вайнштейн // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 87–94.

15. Ерпулева, Ю.В. Эффективность нутритивной поддержки у детей в критических состояниях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.09 / Ерпулева Юлия Владимировна. – М., 2006. – 39 с.

16. Закономерности развития синдрома короткой кишки после обширной резекции тонкой кишки в эксперименте / Г.П. Титова, А.В. Гришин, П.А. Ярцев [и др.] // Гастроэнтерология Санкт–Петербурга. – 2019. – № 2. – С. 42–42.

17. Исаев, Ю.А. Синдром «короткой кишки» после операций по поводу мезентеральных тромбозов / Ю.А. Исаев // Успенские чтения: материалы научно–практической конференции врачей России с международным участием, посвященной 60–летию кафедры общей хирургии Тверского государственного медицинского университета. – Тверь, 2015. – С. 46–47.

18.Ишмуратова, А.А. Тактика лечения и ведения детей с синдромом короткой кишки / А.А. Ишмуратова // Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты: сборник материалов. – Казань, 2018. – С. 164–165.

19.Катетер–ассоциированная инфекция крови у детей с синдромом короткой кишки / Ю.В. Аверьянова, А.Э. Степанов, С.П. Макаров [и др.] // Клиническая и экспериментальная хирургия. – 2016. – Т. 4, № 2 (12). – С. 96–103.

20.Клинико–лабораторные аспекты синдрома короткой кишки у детей / В.Н. Грона, С.В. Веселый, М.В. Вакуленко [и др.] // Здоровье ребенка. – 2010. – № 3. – С. 99–102.

21.Клинический опыт ведения ребенка с синдромом короткой кишки / А.К. Коновалов, Л.М. Вессель, Ю.В. Ерпулёва [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 4. – С. 86–91.

22.Компенсаторные возможности тонкой кишки после обширной дистальной и проксимальной ее резекции (экспериментальное исследование) / П.А. Ярцев, Г.П. Титова, А.В. Гришин [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 124–131.

23.Костюченко, Л.Н. Особенности нутриционной поддержки при последствиях обширных резекций тонкой кишки / Л.Н. Костюченко, Т.Н. Кузьмина, О.А. Смирнова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – № 4 (104). – С. 32–38.

24.Костюченко, Л.Н. Парентеральное питание в лечении больного с синдромом короткой кишки / Л.Н. Костюченко, Т.Н. Кузьмина, И.Н. Ручкина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. – № 6. – С. 98–102.

25.Костюченко, Л.Н. Синдром короткой кишки: послеоперационное ведение пациентов / Л.Н. Костюченко, М.В. Костюченко // Вопросы диетологии. – 2015. – Т. 5, № 4. – С. 53–58.

26.Костюченко, Л.Н. Синдром короткой кишки: современные позиции ведения больных в раннем и отдаленном послеоперационном периоде / Л.Н. Костюченко // Справочник поликлинического врача. – 2015. – № 9. – С. 36–38.



27.Крумс, Л.М. Значение дисбактериоза кишечника в патогенезе хронической диареи при целиакии и синдроме короткой тонкой кишки / Л.М. Крумс // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 11. – С. 58–62.

28.Кульчицкий, О.А. Реабилитация детей с синдромом короткой кишки / О.А. Кульчицкий // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: материалы IV Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов с Международным участием. – М., 2018. – С. 124–125.

29.Курочкина, Ю.Д. Синдром короткой кишки у ребёнка / Ю.Д. Курочкина, В.В. Коломацкая, А.С. Иванникова // Российский педиатрический журнал. – 2019. – Т. 22, № 5. – С. 316.

30.Лазарева, Т.С. Особенности течения синдрома короткой кишки у детей / Т.С. Лазарева, Ф.Ф. Жвания, Л.А. Щеплягина // Практическая медицина. – 2008. – № 6 (30). – С. 66.

31.Лазарева, Т.С. Синдром короткой кишки у детей / Т.С. Лазарева, Ф.Ф. Жвания, Л.А. Щеплягина // Вопросы детской диетологии. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 53–56.

32.Лечение детей с синдромом короткой кишки: федеральные клинические рекомендации / Ю.А. Аверьянова, Л. Вессель, Ю.В. Ерпулева [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 4. – С. 92–108.

33.Метаболическая активность кишечной микробиоты при синдроме короткой кишки / Т.Н. Кузьмина, О.А. Смирнова, Л.Н. Костюченко, С.Ю. Сильвестрова // Актуальные вопросы научных исследований: сборник научных трудов по материалам VII Международной научно–практической конференции. – М., 2016. – С. 70–71.

34.Морозова, Т.Е. Фармакоэкономический анализ различных технологий полного парентерального питания: контейнеры «три в одном» в сравнении с

«флаконной» методикой / Т.Е. Морозова, Т.Б. Андрущишина, Е.К. Антипова // Вестник интенсивной терапии. – 2012. – № 2. – С. 38–45.

35.Нарушение минеральной плотности костной ткани у больных с заболеваниями органов пищеварения / Ю.В. Эмбутниекс, В.Н. Дроздов, И.В. Чернышева [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 2. – С. 111–116.

36.Нарушение минеральной плотности костной ткани у больных с заболеваниями органов пищеварения / Ю.В. Эмбутниекс, В.Н. Дроздов, И.В. Чернышева [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 9. – С. 80–86.

37.Никитин, А.М. Особенности интенсивной терапии детей с синдромом короткой кишки / А.М. Никитин, А.А. Шматова // Молодой ученый. – 2018. – № 13 (199). – С. 81–83.

38.Никитин, А.М. Принципы интенсивной терапии детей с синдромом короткой кишки / А.М. Никитин // Студенческий. – 2018. – № 7–1 (27). – С. 79–81.

39.Нутритивная недостаточность при синдроме короткой кишки / Л.Н. Костюченко, О.А. Смирнова, А.Э. Лычкова, Т.Н. Кузьмина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – № 7 (167). – С. 63–65.

40.Нутритивная терапия и другие методы лечения кишечной недостаточности и ее осложнений у детей. Систематический обзор / Э.Р. Барклай, Л.М. Битти, Л.Т. Вивер, Д.С. Уилсон // Неонатология: новости, мнения, обучение. – 2013. – № 1 (1). – С. 33–43.

41.Обширные резекции кишечника и синдром короткой кишки у больных с острым нарушением мезентериального кровообращения / А.И. Хрипун, С.Н. Шурыгин, А.Д. Прямикова [и др.] // Хирургия. – 2012. – № 2. – С. 14–18.

42.Опыт проведения длительного парентерального питания у ребенка с синдромом короткой кишки: клинический случай / С.В. Киган, А.В. Петрученя, А.К. Толстик, А. Наиф // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2019. – Т. 9, № 5. – С. 605–612.

43. Осложнения длительного парентерального питания новорожденных и детей грудного возраста / Ю.В. Ерпулёва, А.И. Чубарова, Н.П. Вайнштейн [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 59–69.

44. Особенности интенсивной терапии в лечении пациентов с синдромом "короткой кишки" / Р.А. Шавалеев, С.А. Пряников, М.В. Королёв, Е.А. Ладугина // Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье. – 2017. – № 6 (30). – С. 83–87.

45. Парентеральное и энтеральное питание детей: практические рекомендации / колл. авт.: Ю.В. Ерпулёва [и др.]. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2016. – 303 с.

46. Парентеральное и энтеральное питание: национальное руководство : краткое издание / под ред. проф. М.Ш. Хубутия [и др.]. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2015. – 799 с.

47. Парфенов, А.И. Нарушение всасывания – ведущий клинический признак болезни тонкой кишки / А.И. Парфенов, Л.М. Крумс // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 8. – С. 4–9.

48. Парфенов, А.И. Синдром короткой кишки / А.И. Парфенов, Е.А. Сабельникова, Т.Н. Кузьмина // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89, № 12–2. – С. 144–149.

49. Переяслов, А.А. Синдром короткой кишки у детей (обзор литературы) / А.А. Переяслов, А.А. Лосев // Хирургия. Восточная Европа. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 115–132.

50. Резолюция экспертного совета по совершенствованию специализированной медицинской помощи больным с синдромом короткой кишки / В.Т. Ивашкин, С.Ф. Багненко, А.В. Гришин [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2017. – Т. 27, № 3. – С. 101–104.

51. Результаты аутологичных интестинальных реконструкций при синдроме короткой кишки у детей / Ю.В. Аверьянова, А.Э. Степанов, А.Ю. Разумовский [и др.] // Детская хирургия. – 2015. – Т. 19, № 6. – С. 16–19.

52. Результаты хирургического лечения детей с атрезиями тонкой кишки, приведших к развитию синдрома короткой кишки / Т.Н. Шишкина, И.В. Киргизов, И.А. Шишкин, А.В. Шахтарин // Детская хирургия. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 19–21.

53. Роль парентерального питания в лечении синдрома короткой кишки / Г.Н. Щербакова, В.В. Никода, А.А. Рагимов, В.В. Титов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. – № 2. – С. 162–167.

54. Российский регистр детей с синдромом "короткой кишки" / В.М. Розинов, А.И. Чубарова, Ю.В. Ерпулева [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 38–45.

55. Синдром короткой кишки (СКК) у новорожденного. Прогнозирование, принципы лечения / С.Г. Гаймоленко, Р.А. Сущенко, С.Л. Дручкова, А.С. Мазин // Хирурги Забайкалья в России – 2: материалы межрегиональной научно–практической конференции. – Хабаровск, 2017. – С. 15–17.

56. Синдром короткой кишки в общеклинической практике / З.М. Галеева, И.А. Гималетдинова, Л.Р. Абсалямова [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 36–43.

57. Синдром короткой кишки и трансплантация кишечника / А.Д. Прямикова, А.Б. Миронков, В.В. Латонов [и др.] // Анналы хирургии. – 2011. – № 3. – С. 12–19.

58. Синдром короткой кишки у детей. Клинические рекомендации / Ю.В. Аверьянова, Л. Вессель, Ю.В. Ерпулёва [и др.]. – М., 2016.

59. Синдром короткой кишки у детей: терминология, современные аспекты патогенеза, новые подходы к диагностике и лечению (обзор литературы и собственный клинический опыт) / О.М. Горбатюк, М.О. Талько, М.М. Островерхова, Л.С. Самоваров // Современная педиатрия. – 2015. – № 3 (67). – С. 78.

60. Синдром короткой кишки у новорожденных / Д.Р. Погосова, Н.М. Ростовцев, П.Г. Бабошко, В.Н. Базалий // Педиатрический вестник Южного Урала. – 2018. – № 2. – С. 86–92.

61. Синдром короткой кишки: клиническое наблюдение больного с суперкороткой тонкой кишкой / Л.Н. Костюченко, И.Н. Ручкина, Т.Н. Кузьмина [и др.] // Consilium Medicum. Хирургия. – 2012. – № 1. – С. 51–55.

62. Слесарева, О.А. Синдром короткой кишки у детей раннего возраста / О.А. Слесарева // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 153а.

63. Снижение частоты осложнений при использовании туннелированных катетеров у детей с синдромом короткой кишки, находящихся на домашнем парентеральном питании / А.И. Чубарова, Е.А. Костомарова, Н.С. Жихарева, Е.Р. Радченко // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 5, № 1. – С. 98–106.

64. Современная стратегия лечения детей с синдромом короткой кишки: 12-летний опыт / Ю.В. Аверьянова, А.Ю. Разумовский, С.П. Макаров [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2018. – № 6. – С. 67–74.

65. Современные технологии энтерального питания у тяжелобольных детей / Ю.В. Ерпулёва, А.У. Лекманов, С.Г. Грибакин [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 80–87.

66. Сухотник, И.Г. Синдром короткой кишки у детей / И.Г. Сухотник // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 99–116.

67. Типовая программа дополнительного профессионального образования врачей по нефрологии : утв. Департаментом фармацевт. деятельности, обеспечения благополучия человека, науки, образования 24.06.05 / М-во здравоохранения и соц. развития Рос. Федерации, Федер. гос. образоват. учреждение "Всерос. учеб.–науч.–метод. центр по непрерыв. мед. и фармацевт.

Образованию Федер. агентства по здравоохранению и соц.развитию"; [перераб.: Ермоленко В.М. и др.]. – М.: ФГОУ "ВУНМЦ Росздрава", 2005. – 79 с.

68.Тканеинженерные конструкции для компенсации синдрома короткой кишки / А.В. Косулин, Л.Н. Бельдиман, С.В. Кромский [и др.] // Вестник Российской военно–медицинской академии. – 2018. – № 2 (62). – С. 259–264.

69.Успешное лечение синдрома короткой кишки у ребенка с обширной инфантильной гемангиомой брюшной полости / Ю.В. Аверьянова, А.Э. Степанов, А.Ю. Разумовский [и др.] // Детская хирургия. – 2015. – Т. 19, № 6. – С. 50–3.

70.Фомина, М.А. Клинико–лабораторная характеристика детей с синдромом короткой кишки, перенесших резекцию участка кишки на первом году жизни / М.А. Фомина, Г.В. Федотова, И.В. Вахлова // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: материалы I Международной (71 Всероссийской) научно–практической конференции молодых ученых и студентов. – М., 2016. – С. 1816–1820.

71.Хавкин, А.И. Синдром короткой кишки: современные подходы к терапии / А.И. Хавкин, Г.В. Волынец, Т.А. Скворцова // Вопросы практической педиатрии. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 70–75.

72.Хирургическое лечение тотальной формы болезни гиршпрунга у детей / В.В. Холостова, А.Ф. Дронов, А.Н. Смирнов [и др.] // Хирургия. – 2014. – № 7. – С. 44–54.

73.Хорошилов, И.Е. Клиническое питание гастроэнтерологических больных: современное состояние вопроса / И.Е. Хорошилов // Медицина: теория и практика. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 107.

74.Чубарова, А.И. Опыт организации системы домашнего парентерального питания детей с синдромом короткой кишки в г. Москве / А.И. Чубарова, Е.А. Костомарова, Н.С. Жихарева // Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста: материалы II Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов. – Рязань, 2016. – С. 164–166.

75.Чубарова, А.И. Синдром короткой кишки и хронической кишечной недостаточности у детей: оценка прогностических маркеров и эффективности

реабилитации / А.И. Чубарова, Е.А. Костомарова, Н.С. Жихарева // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 7, № 4. – С. 46–52.

76. Чубарова, А.И. Современное ведение детей с синдромом короткой кишки и другими формами хронической кишечной недостаточности / А.И. Чубарова, Ю.В. Ерпулёва. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2016. – 84 с.

77. Шептулина, А.Ф. Синдром короткой кишки: особенности патогенеза, клиники, лечения / А.Ф. Шептулина, О.З. Охлобыстина, О.С. Шифрин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26, № 2. – С. 73–78.

78. Щукина, О.Б. Фекальный кальпротектин и гидро–МРТ в оценке активности болезни Крона / О.Б. Щукина, В.Ю. Собко // Вестник Северо–западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 78–83.

79. Эффективное разноплановое лечение рецидивирующего d–лактат–ацидоза при синдроме короткой кишки: клинический случай / Ю.В. Аверьянова, А.Э. Степанов, А.Ю. Разумовский [и др.] // Детская хирургия. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 42–46.

80. Эхографическое исследование толстой кишки у детей / М.И. Пыков, Л.Н. Мазанкова, Н.Р. Овечкина, О.А. Вороненко // Ультразвуковая и функциональная диагностика. – 2006. – № 2. – С. 91–95.

81. 3D culture of human pluripotent stem cells in RGD–alginate hydrogel improves retinal tissue development / N.C. Hunt, D. Hallam, A. Karimi [et al.] // Acta Biomater. – 2017. – Vol. 49. – P. 329–43.

82. 5–HT<sub>4</sub> receptor–mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice / M.T. Liu, Y.H. Kuan, J. Wang [et al.] // J. Neurosci. – 2009. – Vol. 29. – P. 9683–99.

83. A multicellular approach forms a significant amount of tissue–engineered small intestine in the mouse / F.G. Sala, J.A. Matthews, A.L. Speer [et al.] // Tissue Eng. Part A. – 2011. – Vol. 17. – P. 1841–50.

84. A New Concept to Achieve Optimal Weight Gain in Malnourished Infants on Total Parenteral Nutrition / E. Abi Nader, C. Lambe, C. Talbotec [et al.] // JPEN. – 2018. – Vol. 42, № 1. – P. 78–86. doi: 10.1002/jpen.1014.

85. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract / K.H. Schafer, M.J. Saffrey, G. Burnstock, P. Mestres–Ventura // Brain Res. Brain Res. Protoc. – 1997. – № 1. – P. 109–13.

86. Absent ileocecal valve predicts the need for repeated step in children / T. Wester, H.E. Lilja, P. Stenström, M. Pakarinen // Surgery. – 2017. – Vol. 161, № 3. – P. 818–822. doi: 10.1016/j.surg.2016.09.011.

87. Abu–Elmagd, K.M. Intestinal transplantation for short bowel syndrome and gastrointestinal failure: Current consensus, rewarding outcomes, and practical guidelines / K.M. Abu–Elmagd // Gastroenterology. – 2006. – Vol. 130. – P. S132–S37.

88. Abu–Zidan, F.M. Diagnostic point–of–care ultrasound (POCUS) for gastrointestinal pathology: state of the art from basics to advanced / F.M. Abu–Zidan, A.A. Cevik // World J. Emerg. Surg. – 2018. – Vol. 13. – P. 47.

89. Accuracy of magnetic resonance enterography in the preoperative assessment of patients with Crohn's disease of the small bowel / S. Pous–Serrano, M. Frasson, R. Palasí Giménez [et al.] // Colorectal Dis. – 2017. – Vol. 19, № 5. – P. O126–O133. doi:10.1111/codi.13613

90. Accuracy of radiographic estimation of small bowel dimensions in pediatric patients with short bowel syndrome / D. Lodwick, M. Dienhart, E. Ambeba [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2016. – Vol. 51, № 6. – P. 953–6. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.059.

91. ACR guidance document on MR safe practices: 2013 / E. Kanal, A.J. Barkovich, C. Bell [et al.] // J. Magn. Reson. Imaging. – 2013. – Vol. 37, № 3. – P. 501–530.

92. Adipose–derived stem cells on hyaluronic acid–derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea / L. Espandar, B. Bunnell, G.Y. Wang [et al.] // Arch. Ophthalmol. – 2012. – Vol. 130. – P. 202–8.



93. Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis / S. Kulkarni, M.A. Micci, J. Leser [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2017. – Vol. 114. – P. E3709–e18.

94. An anatomic approach to understanding mechanisms of intestinal adaptation / C.M. Courtney, E.J. Onufer, K.M. Seiler, B.W. Warner // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2018. – Vol. 27. – P. 229–36.

95. Analysis of patients with longitudinal intestinal lengthening procedure referred for intestinal transplantation / J. Bueno, J. Guitierrez, G.V. Mazariegos [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2001. – Vol. 36, № 1. – P. 178–83.

96. Assessment and outcome of children with intestinal failure referred for intestinal transplantation / S. Ganousse–Mazeron, F. Lacaille, V. Colomb–Jung [et al.] // *Clin. Nutr.* – 2015. – Vol. 34, № 3. – P. 428–35. doi: 10.1016/j.clnu.2014.04.015.

97. Autologous intestinal reconstruction surgery / B.A. Jones, M.A. Hull, M.M. McGuire, H.B. Kim // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 19, № 1. – P. 59–67. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2009.11.007.

98. Autologous intestinal reconstruction: a single institution study of the serial transverse enteroplasty (STEP) and the longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT) / A.A. Shah, M. Petrosyan, A.L. Franklin [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2019. – Vol. 35, № 6. – P. 649–655. doi: 10.1007/s00383–019–04468–3.

99. Autologous Intestinal Reconstructive Surgery in the Management of Total Intestinal Aganglionosis / F. Fusaro, F. Morini, A. Mutanen [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2019. – Vol. 68, № 5. – P. 635–641. doi: 10.1097/MPG.0000000000002260.

100. Autologous intestinal reconstructive surgery to reduce bowel dilatation improves intestinal adaptation in children with short bowel syndrome / S.L. Almond, Z. Haveliwala, B. Khalil, A. Morabito // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2013. – Vol. 56, № 6. – P. 631–4. doi: 10.1097/MPG.0b013e318287de8d.

101. Baldwin–Price, H.K. Reversed intestinal segments in the management of anenteric malabsorption syndrome / H.K. Baldwin–Price, D. Copp, A.O. Singleton Jr. // *Ann. Surg.* – 1965. – Vol. 161. – P. 225–30.

102. Bianchi, A. Experience with longitudinal intestinal lengthening and tailoring / A. Bianchi // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1999. – Vol. 9, № 4. – P. 256–9.
103. Bianchi, A. From the cradle to enteral autonomy: the role of autologous gastrointestinal reconstruction / A. Bianchi // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130. – P. S138–46.
104. Bianchi, A. Intestinal loop lengthening a technique for increasing small intestinal length / A. Bianchi // *J. Pediatr. Surg.* – 1980. – Vol. 15. – P. 145–51.
105. Bianchi, A. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: results in 20 children / A. Bianchi // *J. R. Soc. Med.* – 1997. – Vol. 90, № 8. – P. 429–32. doi: 10.1177/014107689709000804.
106. Bines, J.E. Intestinal failure: A new era in clinical management / J.E. Bines // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2009. – Vol. 24, Suppl. 3. – P. S86–92.
107. Bioengineered three-dimensional physiological model of colonic longitudinal smooth muscle in vitro / S. Raghavan, M.T. Lam, L.L. Foster [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2010. – Vol. 16. – P. 999–1009.
108. Bioengineering of physiologically functional intrinsically innervated human internal anal sphincter constructs / R.R. Gilmont, S. Raghavan, S. Somara, K.N. Bitar // *Tissue Eng. Part A.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1603–11.
109. Biological effects and safety in magnetic resonance imaging: a review / V. Hartwig, G. Giovannetti, N. Vanello [et al.] // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2009. – Vol. 6, № 6. – P. 1778–1798.
110. Bitar, K.N. Tissue engineering in the gut: developments in neuromusculature / K.N. Bitar, S. Raghavan, E. Zakhem // *Gastroenterology.* – 2014. – Vol. 146. – P. 1614–24.
111. Bjerknes, M. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons / M. Bjerknes, H. Cheng // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – Vol. 98. – P. 12497–502.
112. Boluda, E.R. Pediatric small bowel transplantation / E.R. Boluda // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 550–6. doi: 10.1097/MOT.0000000000000231.

113. Bowel Ultrasound State of the Art: Grayscale and Doppler Ultrasound, Contrast Enhancement, and Elastography in Crohn Disease / C. Lu, C. Merrill, A. Medellin [et al.] // *J. Ultrasound Med.* – 2019. – Vol. 38, № 2. – P. 271-288. doi:10.1002/jum.14920
114. Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development / M. Fichter, M. Klotz, D.L. Hirschberg [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2011. – Vol. 55. – P. 1592–6.
115. Brown, R. Total nutrient admixture: a review / R. Brown, R.A. Quercia, R. Sigman // *JPEN.* – 1986. – № 10. – P. 650–8.
116. Caniano, D.A. Extensive short-bowel syndrome in neonates: outcome in the 1980s / D.A. Caniano, J. Starr, M.E. Ginn-Pease // *Surgery.* – 1989. – Vol. 105, № 2. – P. 119-24.
117. Careskey, J. Ileocecal valve replacement. Its effect on transit time, survival, and weight change after massive intestinal resection / J. Careskey, T.R. Weber, J.L. Grosfeld // *Arch. Surg.* – 1981. – Vol. 116, № 5. – P. 618–622.
118. Carlson, G.L. Surgical management of intestinal failure / G.L. Carlson // *Proc. Nutr. Soc.* – 2003. – Vol. 62. – P. 711–8.
119. Central catheter-associated bloodstream infection reduction with ethanol lock prophylaxis in pediatric intestinal failure: broadening quality improvement initiatives from hospital to home / M.I. Ardura, J. Lewis, J.L. Tansmore [et al.] // *JAMA Pediatr.* – 2015. – Vol. 169, № 4. – P. 324–31. doi: 10.1001/jamapediatrics.2014.3291.
120. Central venous thrombosis in children with intestinal failure on long-term parenteral nutrition / J. Gonzalez-Hernandez, Y. Daoud, J. Styers [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2016. – Vol. 51, № 5. – P. 790–3. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.024.
121. Chan, C.F. Recent advances in the management of pediatric intestinal failure / C.F. Chan, T.C. Wu // *Pediatr. Neonatol.* – 2014. – Vol. 55, № 6. – P. 426–30. doi: 10.1016/j.pedneo.2013.11.005.
122. Chandra, R. Current treatment paradigms in pediatric short bowel syndrome / R. Chandra, A. Kesavan // *Clin. J. Gastroenterol.* – 2018. – Vol. 11, № 2. – P. 103–112. doi: 10.1007/s12328-017-0811-7.

123. Change of Outcomes in Pediatric Intestinal Failure: Use of Time–Series Analysis to Assess the Evolution of an Intestinal Rehabilitation Program / C. Oliveira, N.T. de Silva, S. Stanojevic [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 2016. – Vol. 222, № 6. – P. 1180–1188.e3. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2016.03.007.
124. Chen, J. Smooth muscle adaptation and recovery of contractility after massive small bowel resection in rats / J. Chen, J. Wen, W. Cai // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2012. – Vol. 237. – P. 578–84.
125. Chen, M.K. Animal models for intestinal tissue engineering / M.K. Chen, E.A. Beierle // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 1675–81.
126. Chin, B.C. Depressed smooth muscle contractility after massive intestinal resection in rat: role of alterations in muscarinic receptor status or source of calcium for excitation–contraction coupling / B.C. Chin, D.T. Tan, R.B. Scott // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 74. – P. 1187–95.
127. Chronic intestinal failure in children. [Review] / M.B. Krawinkel, D. Scholz, A. Busch [et al.] // *Deutsch. Arztebl. Int.* – 2012. – Vol. 109, № 22–23. – P. 409–15.
128. Classification, epidemiology and aetiology / G.I. Koffeman, W.G. van Gemert, E.K. George, R.A. Veenendaal // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 17. – P. 879–93.
129. Clinical report: intestinal rehabilitation programs in the management of pediatric intestinal failure and short bowel syndrome / R.J. Merritt, V. Cohran, B.P. Raphael [et al.] // *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* – 2017. – Vol. 65. – P. 588–96.
130. Cole, C.R. Nutrition management of infants with surgical short bowel syndrome and intestinal failure / C.R. Cole, S.A. Kocoshis // *Nutr. Clin. Pract.* – 2013. – Vol. 28. – P. 421–8.
131. Coletta, R. Institutional Experience with Spiral Intestinal Lengthening and Tailoring / R. Coletta, B. Aldeiri, A. Morabito // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 2019. – Vol. 29, № 5. – P. 412–416. doi: 10.1055/s–0038–1660850.

132. Coletta, R. Non-transplant Surgical Management of Short Bowel Syndrome in Children: An Overview / R. Coletta, A. Morabito // *Curr. Pediatr. Rev.* – 2019. – Vol. 15, № 2. – P. 106–110. doi: 10.2174/1573396315666181129164112.
133. Coletta, R. Short bowel syndrome in children: surgical and medical perspectives / R. Coletta, B.A. Khalil, A. Morabito // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2014. – Vol. 23. – P. 291–7.
134. Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT<sub>4</sub>-dependent mechanism / J. Belkind-Gerson, R. Hotta, N. Nagy [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21. – P. 870–878.
135. Collins, M.N. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—a review / M.N. Collins, C. Birkinshaw // *Carbohydr. Polym.* – 2013. – Vol. 92. – P. 1262–79.
136. Colomb, V. Economic aspects of paediatric home parenteral nutrition / V. Colomb // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2000. – № 3. – P. 237–9.
137. Comparison of LILT and STEP procedures in children with short bowel syndrome — a systematic review of the literature / G. Frongia, M. Kessler, S. Weih [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2013. – Vol. 48. – P. 1794–805.
138. Computed Tomography and Magnetic Resonance Small Bowel Enterography: Current Status and Future Trends Focusing on Crohn's Disease / S.H. Park, B.D. Ye, T.Y. Lee, J.G. Fletcher // *Gastroenterol. Clin. North Am.* – 2018. – Vol. 47, № 3. – P. 475-499. doi:10.1016/j. gtc.2018.04.002
139. Consensus Recommendations for Evaluation, Interpretation, and Utilization of Computed Tomography and Magnetic Resonance Enterography in Patients With Small Bowel Crohn's Disease / D.H. Bruining, E.M. Zimmermann, E.V. Loftus Jr. [et al.] // *Radiology.* – 2018. – Vol. 286, № 3. – P. 776-799. doi:10.1148/radiol.2018171737
140. Construction of an ileocecal valve and its role in massive resection of the small intestine / J. Ricotta, G.D. Zuidema, T.R. Gadacz, D. Sadri // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1981. – Vol. 152, № 3. – P. 310–314.

141. Controlled tissue expansion in the initial management of the short bowel state / F. Murphy, B.A. Khalil, S. Gozzini [et al.] // *World J. Surg.* – 2011. – Vol. 35. – P. 1142–5.
142. Current practice and future perspectives in the treatment of short bowel syndrome in children—a systematic review / S. Weih, M. Kessler, H. Fonouni [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2012. – Bd. 397. – S. 1043–51.
143. Data on the safety of repeated MRI in healthy children / S.K. Holland, M. Altaye, S. Robertson [et al.] // *Neuroimage Clin.* – 2014. - № 4. – P. 526–530.
144. Delayed primary serial transverse enteroplasty as a novel management strategy for infants with congenital ultra–short bowel syndrome / P.W. Wales, T. Jancelewicz, R.L. Romao [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2013. – Vol. 48. – P. 993–9.
145. Does ileal reverse segment in rats with short bowel syndrome change intestinal morphology? / A. Sencan, B. Akcora, E. Mir [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2002. – Vol. 34, № 2. – P. 165–168.
146. Double barrel enteroplasty for the management of short bowel syndrome in children / A. Shun, G. Thomas, J. Puppi [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2021. – Vol. 37, № 1. – P. 169–177. doi: 10.1007/s00383-020-04767-0.
147. Dunn, J.C. Is the tissue–engineered intestine clinically viable? / J.C. Dunn // *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – № 5. – P. 366–7.
148. Duodenal lengthening in an adult with ultra–short bowel syndrome. A case report / J. Bueno, R. Burgos, S. Redecillas [et al.] // *Rev. Esp. Enferm. Dig.* – 2018. – Vol. 110, № 1. – P. 59–62. doi: 10.17235/reed.2017.5187/2017.
149. Duodenal lengthening in short bowel with dilated duodenum / J. Bueno, S. Redecillas, L. García [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2015. – Vol. 50, № 3. – P. 493–6. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.11.047.
150. Duro, D. Overview of pediatric short bowel syndrome / D. Duro, D. Kamin, C. Duggan // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2008. – Vol. 47, Suppl. 1. – P. S33–6.
151. Early Adaptation of Small Intestine After Massive Small Bowel Resection in Rats / J. Chen, Z. Qin, H. Shan [et al.] // *Iran. J. Pediatr.* – 2015. – Vol. 25. – P. e530.

152. Echarri, A. Caveolae – mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments / A. Echarri, M.A. Del Pozo // *J. Cell Sci.* – 2015. – Vol. 128. – P. 2747–275.
153. Effect of bowel resection on TLR signaling during intestinal adaptation in a rat model / I. Sukhotnik, B. Haj, Y. Pollak [et al.] // *Surg. Endosc.* – 2016. - № 10. – P. 4416-24. doi: 10.1007/s00464-016-4760-x.
154. Effect of hyaluronic acid hydrogels containing astrocyte–derived extracellular matrix and/or V2a interneurons on histologic outcomes following spinal cord injury / R.E. Thompson, J. Pardieck, L. Smith [et al.] // *Biomaterials.* – 2018. – Vol. 162. – P. 208–23.
155. Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine–induced changes in neurotransmitter content and release / S.M. Collins, S.M. Hurst, C. Main [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1992. – Vol. 664. – P. 415–24.
156. Effect of MRI strength and propofol sedation on pediatric core temperature change / D.L. Isaacson, D.J. Yanosky, R.A. Jones [et al.] // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2011. – Vol. 33, № 4. – P. 950–956.
157. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue–engineered small intestine / Y. Nakase, T. Nakamura, S. Kin [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2007. – Vol. 137. – P. 61–8.
158. Enteral autonomy in pediatric short bowel syndrome: predictive factors one year after diagnosis. P. 1 / F.R. Demehri, L. Stephens, E. Herrman [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2015. – Vol. 50. – P. 131–5.
159. Enteral autonomy in pediatric short bowel syndrome: predictive factors one year after diagnosis. P. 2 / F.R. Demehri, L. Stephens, E. Herrman [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2015. – Vol. 50. – P. 135–141.
160. Enteral nutrient deprivation in patients leads to a loss of intestinal epithelial barrier function / M.W. Ralls, F.R. Demehri, Y. Feng [et al.] // *Surgery.* – 2015. – Vol. 157. – P. 732–42.

161. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut / N.M. Joseph, S. He, E. Quintana [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121. – P. 3398–3411.
162. Epidemiology, management and outcome of ultrashort bowel syndrome in infancy / A. Batra, S.C. Keys, M.J. Johnson [et al.] // *Arch. Dis. Child Fetal. Neonatal. Ed.* – 2017. – Vol. 102, № 6. – P. F551–F556. doi: 10.1136/archdischild–2016–311765.
163. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: home parenteral nutrition (HPN) in adult patients / M. Staun, L. Pironi, F. Bozzetti [et al.] // *Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 28. – P. 467–79.
164. Establishing norms for intestinal length in children / M.–C. Struijs, I.R. Diamond, N. de Silva [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2009. – Vol. 44, № 5. – P. 933–8.
165. Estimation of effective dose and radiation risk in pediatric barium studies procedures / A. Sulieman, B. Elhag, M. Alkhorayef [et al.] // *Appl. Radiat. Isot.* – 2018. – Vol. 138. – P. 40–44.
166. Evaluation of intestinal absorption after longitudinal intestinal lengthening for short bowel syndrome / A. Bonnard, G. Staub, J.F. Segura [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2005. – Vol. 40. – P. 1587–91.
167. Evaluation of the longitudinal musculature of segments of the distal colon interposed following extended jejunum–ileum resection / M.O. Taha, M.A. Ribeiro, Jr., P. de Oliveira Gomes [et al.] // *Microsurgery.* – 1999. – Vol. 19. – P. 306–10.
168. Evidence–Based Strategies and Recommendations for Preservation of Central Venous Access in Children / K.M. Baskin, L.A. Mermel, T.F. Saad [et al.] // *JPEN.* – 2019. – Vol. 43, № 5. – P. 591–614. doi: 10.1002/jpen.1591.
169. Expansion of intestinal stem cells associated with long–term adaptation following ileocecal resection in mice / C.M. Dekaney, J.J. Fong, R.J. Rigby [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. G1013–22.
170. Experience of 49 longitudinal intestinal lengthening procedures for short bowel syndrome / S. Hosie, S. Loff, H. Wirth [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 2006. – Vol. 16, № 3. – P. 171–5.



171. Experience with intestinal lengthening for the short-bowel syndrome / J.S. Thompson, L.W. Pinch, N. Murray [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1991. – Vol. 26. – P. 721–24.
172. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding / Y. Hori, T. Nakamura, D. Kimura [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2002. – Vol. 102. – P. 156–60.
173. Extracellular Matrix Components HAPLN1, Lumican, and Collagen I Cause Hyaluronic Acid-Dependent Folding of the Developing Human Neocortex / K.R. Long, B. Newland, M. Florio [et al.] // *Neuron.* – 2018. – Vol. 99. – P. 702–19.
174. First report of the international serial transverse enteroplasty data registry: indications, efficacy, and complications / B.P. Modi, P.J. Javid, T. Jaksic [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 2007. – Vol. 204. – P. 365–71.
175. Fishbein, T.M. Intestinal transplantation / T.M. Fishbein // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 36. – P. 998–1008.
176. Fujioka, W.K. Infectious complications following serial transverse enteroplasty in infants and children with short bowel syndrome / W.K. Fujioka, R.A. Cowles // *J. Pediatr. Surg.* – 2015. – Vol. 50, № 3. – P. 428–30. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.07.009.
177. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel / K. Cheng, A. Blusztajn, D. Shen [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33. – P. 5317–24.
178. Furness, J.B. The enteric nervous system and neurogastroenterology / J.B. Furness // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – № 9. – P. 286–94.
179. Gadolinium-based contrast agents in pediatric magnetic resonance imaging / E.M. Gale, P. Caravan, A.G. Rao [et al.] // *Pediatr. Radiol.* – 2017. – Vol. 47, № 5. – P. 507–521.
180. Gargasz, A. Neonatal and pediatric parenteral nutrition / A. Gargasz // *Adv. Crit. Care.* – 2012. – Vol. 23. – P. 451–64.

181. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids / S.R. Finkbeiner, J.J. Freeman, M.M. Wieck [et al.] // *Biol. Open.* – 2015. – № 4. – P. 1462–72.
182. Gongidi, P. Ultrasound of the pediatric appendix / P. Gongidi, R.D. Bellah // *Pediatr. Radiol.* – 2017. – Vol. 47. – P. 1091–100.
183. Goulet, O. Causes and management of intestinal failure in children / O. Goulet, F. Ruemmele // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130. – P. S16–28.
184. Goulet, O. Short bowel syndrome and intestinal transplantation in children / O. Goulet, F. Sauvat // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2006. – № 9. – P. 304–13.
185. Growth factors: possible roles for clinical management of the short bowel syndrome / M.E. McMellen, D. Wakeman, S.W. Longshore [et al.] // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 19. – P. 35–43.
186. Growth in Infants and Children With Intestinal Failure-associated Liver Disease Treated With Intravenous Fish Oil / B.P. Raphael, P.D. Mitchell, K.M. Gura [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2020. – Vol. 70, № 2. – P. 261–268. doi: 10.1097/MPG.0000000000002551.
187. Heine, R.G. Новые подходы к парентеральному питанию младенцев и детей / R.G. Heine, J.E. Bines // Здоровье ребенка. – 2011. – № 8. – С. 77–81.
188. Hill, S. Practical management of home parenteral nutrition in infancy / S. Hill // *Early Hum. Dev.* – 2019. – Vol. 138. – P. 104876. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2019.104876.
189. Hockfield, S. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system / S. Hockfield, R.D. McKay // *J. Neurosci.* – 1985. – № 5. – P. 3310–28.
190. Höllwarth, M.E. Surgical strategies in short bowel syndrome / M.E. Höllwarth // *Pediatr. Surg. Int.* – 2017. – Vol. 33, № 4. – P. 413–419. doi: 10.1007/s00383-016-4043-6.
191. Home Parenteral Nutrition in Adult Patients With Chronic Intestinal Failure: The Evolution Over 4 Decades in a Tertiary Referral Center / C.F. Brandt, M.

Hvistendahl, R.M. Naimi [et al.] // JPEN. – 2017. – Vol. 41, № 7. – P. 1178–1187. doi: 10.1177/0148607116655449.

192. Hommel, M.J. Surgical management and autologous intestinal reconstruction in short bowel syndrome / M.J. Hommel, R. van Baren, J.W. Haveman // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2016. – Vol. 30, № 2. – P. 263–80. doi: 10.1016/j.bpg.2016.03.006.

193. Human and mouse enteric nervous system neurosphere transplants regulate the function of aganglionic embryonic distal colon / R.M. Lindley, D.B. Hawcutt, M.G. Connell [et al.] // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 135. – P. 205–16.

194. Human and mouse tissue-engineered small intestine both demonstrate digestive and absorptive function / C.N. Grant, S.G. Mojica, F.G. Sala [et al.] // Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol. – 2015. – Vol. 308. – P. G664–G77.

195. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model / F. Toumi, M. Neunlist, E. Cassagnau [et al.] // Neurogastroenterol. Motil. – 2003. – Vol. 15. – P. 239–42.

196. Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells / D.E. Levin, E.R. Barthel, A.L. Speer [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2013. – Vol. 48. – P. 129–37.

197. Hutcher, N.E. Prejejunal transposition of colon to prevent the development of short bowel syndrome in puppies with 90 per cent small intestine resection / N.E. Hutcher, G. Mendez-Picon, A.M. Salzberg // J. Pediatr. Surg. – 1973. – № 8. – P. 771–7.

198. Hyaluronic acid based extracellular matrix regulates surface expression of GluN2B containing NMDA receptors / B. Schweitzer, J. Singh, A. Fejtova [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – № 7. – P. 10991.

199. Hyaluronic acid scaffold has a neuroprotective effect in hemisection spinal cord injury / S.V. Kushchayev, M.B. Giers, D. Hom Eng [et al.] // J. Neurosurg. Spine – 2016. – Vol. 25. – P. 114–24.

200. Hyaluronic acid-based scaffold for central neural tissue engineering / X. Wang, J. He, Y. Wang, F.Z. Cui // Interface Focus. – 2012. – № 2. – P. 278–91.

201. Impact of infantile short bowel syndrome on long-term health-related quality of life: a cross-sectional study / J.F. Olieman, C. Penning, M.J. Poley [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2012. – Vol. 47. – P. 1309–16.

202. Impact of intestinal lengthening on the nutritional outcome for children with short bowel syndrome / R. Figueroa-Colon, P.R. Harris, E. Birdsong [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1996. – Vol. 31. – P. 912-6.

203. Improved 3D Hydrogel Cultures of Primary Glial Cells for In Vitro Modelling of Neuroinflammation / K.M. Koss, M.A. Churchward, A.F. Jeffery [et al.] // *J. Vis. Exp.* – 2017. – № 8 (130). doi: 10.3791/56615.

204. Improved enteral tolerance following step procedure: systematic literature review and meta-analysis / M.A. Fernandes, D. Usatin, I.E. Allen [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2016. – Vol. 32, № 10. – P. 921–6. doi: 10.1007/s00383-016-3927-9.

205. Improved survival in a multidisciplinary short bowel syndrome program / B.P. Modi, M. Langer, Y.A. Ching [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2008. – Vol. 43. – P. 20–4.

206. Improved tolerance for enteral nutrition after serial transverse enteroplasty (STEP) in infants and children with short bowel syndrome—a seven-year single-center experience / P.S. Oh, A.L. Fingeret, M.Y. Shah [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2014. – Vol. 49, № 11. – P. 1589–92. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.07.019.

207. Improvement in the quality of life using both Bianchi's procedure and the closure of a jejunostomy in a case with short bowel syndrome / K. Masumoto, R. Souzaki, K. Nagata [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2007. – Vol. 23. – P. 285-8.

208. Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: meta-analysis of prospective studies / K. Horsthuis, S. Bipat, R.J. Bennink, J. Stoker // *Radiology.* – 2008. – Vol. 247. – P. 64–79.

209. Intensive care and the surgical treatment children with the short bowel syndrome (review) / A.A. Pereyaslov, A.A. Losev, V.F. Rybalchenko [et al.] // *Хирургия детского возраста.* – 2019. – № 1 (62). – С. 62–74.

210. Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: A 10-year review of rehabilitation and transplantation / A. Nucci, R. Cartland Burns, A. Tichianaa [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2008. – № 12. – P. 429–35.

211. Interposed colon between remnants of the small intestine exhibits small bowel features in a patient with short bowel syndrome / K. Kono, T. Sekikawa, H. Iizuka [et al.] // *Dig. Surg.* – 2001. – Vol. 18. – P. 237–41.

212. Interposition of a reversed jejunal segment enhances intestinal adaptation in short bowel syndrome: an experimental study on pigs / M. Digalakis, M. Papamichail, C. Glava [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol. 171, № 2. – P. 551-557. doi:10.1016/j.jss.2010.06.035

213. Intestinal adaptation: structure, function, and regulation / D.P. O'Brien, L.A. Nelson, F.S. Huang, B.W. Warner // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2001. – № 1. – P. 56–64.

214. Intestinal bowel lengthening in children with short bowel syndrome: systematic review of the Bianchi and STEP procedures / B. King, G. Carlson, B.A. Khalil, A. Morabito // *World J. Surg.* – 2013. – Vol. 37. – P. 694–704.

215. Intestinal lengthening and nutritional outcomes in children with short bowel syndrome / P.J. Javid, S.E. Sanchez, S.P. Horslen, P.J. Healey // *Am. J. Surg.* – 2013. – Vol. 205, № 5. – P. 576–80.

216. Intestinal lengthening in rats after massive small intestinal resection / S. Shekherdimian, A. Scott, A. Chan, J.C. Dunn // *Surgery.* – 2009. – Vol. 146. – P. 291–5.

217. Intestinal rehabilitation and bowel reconstructive surgery: improved outcomes in children with short bowel syndrome / B.A. Khalil, M.E. Ba'ath, A. Aziz [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2012. – Vol. 54. – P. 505–9.

218. Intestinal rehabilitation of infantile onset very short bowel syndrome / M.P. Pakarinen, N. Pakkasjärvi, L. Merras-Salmio [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2015. – Vol. 50, № 2. – P. 289–92. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.11.018.

219. Intestinal Rehabilitation Programs in the Management of Pediatric Intestinal Failure and Short Bowel Syndrome / R.J. Merritt, V. Cohran, B.P. Raphael [et

al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2017. – Vol. 65, № 5. – P. 588–596. doi: 10.1097/MPG.0000000000001722.

220. Intestinal smooth muscle cell maintenance by basic fibroblast growth factor / M. Lee, B.M. Wu, M. Stelzner [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2008. – Vol. 14. – P. 1395–402.

221. Intestinal transplant registry report: global activity and trends / D. Grant, K. Abu-Elmagd, G. Mazariegos [et al.] // *Am. J. Transplant.* – 2015. – Vol. 15. – P. 210–9.

222. Intrinsic myenteric denervation: a new model to increase the intestinal absorptive surface in short-bowel syndrome / S.B. Garcia, M.C. Kawasaky, J.C. Silva [et al.] // *J. Surg. Res.* – 1999. – Vol. 85. – P. 200–3.

223. Irreversible intestinal failure / O. Goulet, F. Ruemmele, F. Lacaille, V. Colomb // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2004. – Vol. 38. – P. 250–69.

224. Is MRI imaging in pediatric age totally safe? A critical reprisal / S. Salerno, C. Granata, M. Trapenese [et al.] // *Radiol. Med.* – 2018. – Vol. 123, № 9. – P. 695–702. doi: 10.1007/s11547-018-0896-1.

225. Iyer, K.R. Surgical management of short bowel syndrome / K.R. Iyer // *JPEN.* – 2014. – Vol. 38. – P. 53S–59S.

226. Javid, P.J. Organization and outcomes of multidisciplinary intestinal failure teams / P.J. Javid, D. Wendel, S.P. Horslen // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 218–222. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2018.07.005.

227. Katz, M.S. Chronology of the effect of massive small bowel resection and hepatocyte growth factor (HGF) on intestinal adaptation / M.S. Katz, K.A. Thatch, M.Z. Schwartz // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol. 171, № 2. – P. 399-403. doi: 10.1016/j.jss.2011.04.007.

228. Kaufman, S.S. Management of pediatric intestinal failure / S.S. Kaufman, C.S. Matsumoto // *Minerva Pediatr.* – 2015. – Vol. 67, № 4. – P. 321–40.

229. Kelly, D.A. Preventing parenteral nutrition liver disease / D.A. Kelly // *Early Hum. Dev.* – 2010. – Vol. 86. – P. 683–7.

230. Kelly, D.G. Short bowel syndrome: highlights of patient management, quality of life, and survival / D.G. Kelly, K.A. Tappenden, M.F. Winkler // JPEN. – 2014. – Vol. 38. – P. 427–37.

231. Key issues in end point selection for heart failure trials: composite end points / J.D. Neaton, G. Gray, B.D. Zuckerman, M.A. Konstam // J. Card. Fail – 2005. – № 11. – P. 567–75.

232. Khatri, G. Magnetic Resonance Enterography for Inflammatory and Noninflammatory Conditions of the Small Bowel / G. Khatri, J. Coleman, J.R. Leyendecker // Radiol. Clin. North Am. – 2018. – Vol. 56, № 5. – P. 671-689. doi:10.1016/j.rcl.2018.04.003

233. Kumpf, V.J. Home parenteral nutrition: safe transition from hospital to home / V.J. Kumpf, E.M. Tillman // Nutr. Clin. Pract. – 2012. – Vol. 27. – P. 749–57.

234. Lauro, A. Short bowel syndrome in children and adults: from rehabilitation to transplantation / A. Lauro, F. Lacaille // Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2019. – Vol. 13, № 1. – P. 55–70. doi: 10.1080/17474124.2019.1541736.

235. Lavazza, A. Transperineal ultrasound for assessment of fistulas and abscesses: a pictorial essay / A. Lavazza, G. Maconi // J. Ultrasound. – 2019. – Vol. 22, № 2. – P. 241-249. doi:10.1007/s40477-019-00381-6

236. Lee, M. Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue engineering / M. Lee, P.C. Chang, J.C. Dunn // J. Surg. Res. – 2008. – Vol. 147. – P. 168–71.

237. Lendahl, U. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein / U. Lendahl, L.B. Zimmerman, R.D. McKay // Cell. – 1990. – Vol. 60. – P. 585–95.

238. Long term outcomes of intestinal rehabilitation in children with neonatal very short bowel syndrome: Parenteral nutrition or intestinal transplantation / L. Norsa, S. Artru, C. Lambe [et al.] // Clin. Nutr. – 2019. – Vol. 38, № 2. – P. 926-933. doi: 10.1016/j.clnu.2018.02.004.

239. Long-term controlled outcomes after autologous intestinal reconstruction surgery in treatment of severe short bowel syndrome / M.P. Pakarinen, A. Kurvinen,

A.I. Koivusalo [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2013. – Vol. 48, № 2. – P. 339–44. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.11.014.

240. Long-term outcome in patients with short bowel syndrome after longitudinal intestinal lengthening and tailoring / K. Reinshagen, C. Kabs, H. Wirth [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2008. – Vol. 47, № 5. – P. 573–8.

241. Long-Term Outcomes of Intestinal and Multivisceral Transplantation at a Single Center in Argentina / D. Ramisch, C. Rumbo, C. Echevarria [et al.] // *Transplant. Proc.* – 2016. – Vol. 48, № 2. – P. 457–62. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.12.066.

242. Long-term survival and parenteral nutrition dependence in adult patients with the short bowel syndrome / B. Messing, P. Crenn, P. Beau [et al.] // *Gastroenterology.* – 1999. – Vol. 117. – P. 1043–50.

243. Long-term total parenteral nutrition-induced hepatobiliary dysfunction in a rabbit model / S. Loff, K.L. Waag, B. Kranzlin [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1998. – Vol. 33. – P. 694–9.

244. Maccioni, F. Double-contrast magnetic resonance imaging of the small and large bowel: effectiveness in the evaluation of inflammatory bowel disease / F. Maccioni // *Abdom. Imaging.* – 2010. – Vol. 35. – P. 31–40.

245. Magnetic resonance imaging of the bowel: today and tomorrow / S. Kinner, M.L. Hahnemann, M. Forsting, T.C. Lauenstein // *Rofo.* – 2015. – Vol. 187. – P. 160–7.

246. Management of Five Hundred Patients With Gut Failure at a Single Center: Surgical Innovation Versus Transplantation With a Novel Predictive Model / K.M. Abu-Elmagd, S.R. Armanyous, M. Fujiki [et al.] // *Ann. Surg.* – 2019. – Vol. 270, № 4. – P. 656–674. doi: 10.1097/SLA.0000000000003523.

247. Managing Successful Pregnancies in Patients with Chronic Intestinal Failure on Home Parenteral Nutrition: Experience from a UK National Intestinal Failure Unit / A. Bond, D.H. Vasant, W. Gashau [et al.] // *J. Gastrointest. Liver Dis.* – 2017. – Vol. 26, № 4. – P. 375–379. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.264.ukn.

248. Martinez Rivera, A. Intestinal transplantation in children: current status / A. Martinez Rivera, P.W. Wales // *Pediatr. Surg. Int.* – 2016. – Vol. 32, № 6. – P. 529–40. doi: 10.1007/s00383-016-3885-2.



249. Matsuda, Y. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis / Y. Matsuda, M. Hagio, T. Ishiwata // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19. – P. 42–8.
250. McKeage, K. Teduglutide: a guide to its use in short bowel syndrome / K. McKeage // *Clin. Drug. Investig.* – 2015. – Vol. 35. – P. 335–40.
251. Methods of increasing the efficiency of residual small bowel segments: a preliminary study / M.J. Mackby, V. Richards, R.S. Gilfillan, R. Florida // *Am. J. Surg.* – 1965. – Vol. 109. – P. 32–38.
252. Mishchuk, V.R. Challenging issues on nutrition of children after extensive bowel resection (literature review) / V.R. Mishchuk // *Медицина неотложных состояний.* – 2019. – № 4 (99). – С. 38–43.
253. Miyasaka, E.A. Redilation of bowel after intestinal lengthening procedures—an indicator for poor outcome / E.A. Miyasaka, P.I. Brown, D.H. Teitelbaum // *J. Pediatr. Surg.* – 2011. – Vol. 46, № 1. – P. 145–9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.09.084.
254. Modified hyaluronan hydrogels support the maintenance of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells / Y. Liu, L.F. Charles, T.I. Zarembinski [et al.] // *Macromol. Biosci.* – 2012. – № 12. – P. 1034–42.
255. Mollard, B.J. Pediatric MR enterography: technique and approach to interpretation-how we do it / B.J. Mollard, E.A. Smith, J.R. Dillman // *Radiology.* – 2015. – Vol. 274, № 1. – P. 29–43. doi: 10.1148/radiol.14122449.
256. MR enterography: what is next after Crohn's disease? / G. Cicero, G. Ascenti, A. Bottari [et al.] // *Jpn J. Radiol.* – 2019. – Vol. 37, № 7. – P. 511-517. doi:10.1007/s11604-019-00838-y
257. Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture / D. Natarajan, M. Grigoriou, C.V. Marcos-Gutierrez [et al.] // *Development.* – 1999. – Vol. 126. – P. 157–68.
258. Mutanen, A. Etiology and prognosis of pediatric short bowel syndrome / A. Mutanen, P.W. Wales // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 209-217. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2018.07.009.

259. Natural history of pediatric intestinal failure: initial report from the Pediatric Intestinal Failure Consortium / R.H. Squires, C. Duggan, D.H. Teitelbaum [et al.] // *J. Pediatr.* – 2012. – Vol. 161. – P. 723–8.
260. Neonatal Onset Intestinal Failure: An Italian Multicenter Study / S. Gennaro, A. Guarino, G. Terrin [et al.] // *J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 153. – P. 674–76.
261. Neonatal short bowel syndrome: a cohort study / P.W. Wales, N. de Silva, J.H. Kim [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2005. – Vol. 40, № 5. – P. 755-62. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2005.01.037.
262. Neonatal short bowel syndrome: Population-based estimates of incidence and mortality rates / P.W. Wales, N. de Silva, J. Kim [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2004. – Vol. 39. – P. 690–95.
263. Nestin expression is lost in ventricular fibroblasts during postnatal development of the rat heart and re-expressed in scar myofibroblasts / P.C. Beguin, H. Gosselin, M. Mamarbachi, A. Calderone // *J. Cell Physiol.* – 2012. – Vol. 227. – P. 813–20.
264. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? / C. Wiese, A. Rolletschek, G. Kania [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 2510–22.
265. Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells / J. Belkind-Gerson, A. Carreon-Rodriguez, L.A. Benedict [et al.] // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2013. – Vol. 25, № 1. – P. 61-9.e7. doi: 10.1111/nmo.12015.
266. Neural plasticity in the gastrointestinal tract: chronic inflammation, neurotrophic signals, and hypersensitivity / I.E. Demir, K.H. Schafer, E. Tieftrunk [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2013. – Vol. 125. – P. 491–509.
267. New idea of intestinal lengthening and tailoring / T. Cserni, H. Takayasu, Z. Muzsnay [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2011. – Vol. 27. – P. 1009–13.
268. New Insights into the Indications for Intestinal Transplantation – Consensus in the Year 2019 / S.S. Kaufman, Y. Avitzur, S.V. Beath [et al.] // *Transplantation.* – 2019. doi: 10.1097/TP.0000000000003065.

269. Ngitudinal enteroplasty as a method of primary treatment in newborns with proximal jejunal atresia / O. Sliopov, M. Migur, O. Ponomarenko [et al.] // Хирургия детского возраста. – 2018. – № 4 (61). – С. 87–92.

270. Non-interventional, retrospective data of long-term home parenteral nutrition in patients with benign diseases: Analysis of a nurse register (SERECARE) / A. De Francesco, A. Diamanti, P. Gandullia [et al.] // Nutrition. – 2019. – Vol. 66. – P. 131–141. doi: 10.1016/j.nut.2019.01.006.

271. Novel Long-Acting GLP-2 Analogue, FE 203799 (Apraglutide), Enhances Adaptation and Linear Intestinal Growth in a Neonatal Piglet Model of Short Bowel Syndrome with Total Resection of the Ileum / G.M. Slim, M. Lansing, P. Wizzard [et al.] // JPEN. – 2019. – Vol. 43, № 7. – P. 891–898. doi: 10.1002/jpen.1500.

272. Nutrition Deficiencies in Children With Intestinal Failure Receiving Chronic Parenteral Nutrition / S.S. Namjoshi, S. Muradian, H. Bechtold [et al.] // JPEN. – 2018. – Vol. 42, № 2. – P. 427–435.

273. Nutritional and other postoperative management of neonates with short bowel syndrome correlates with clinical outcomes / D.J. Andorsky, D.P. Lund, C.W. Lillehei [et al.] // J. Pediatr. – 2001. – Vol. 139, № 1. – P. 27-33. doi: 10.1067/mpd.2001.114481.

274. O'Keefe, S.J. Recurrent sepsis in home parenteral nutrition patients: an analysis of risk factors / S.J. O'Keefe, J.U. Burnes, R.L. Thompson // JPEN. – 1994. – Vol. 18. – P. 256–63.

275. Oliveira, C. Five-year outcomes after serial transverse enteroplasty in children with short bowel syndrome / C. Oliveira, N. de Silva, P.W. Wales // J. Pediatr. Surg. – 2012. – Vol. 47. – P. 931–7.

276. Optimal assessment of paediatric IBD with MRI and barium follow-through / E. Giles, O. Hanci, A. McLean [et al.] // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. – 2012. – Vol. 54. – P. 758–62.

277. Outcome and long-term growth after extensive small bowel resection in the neonatal period: a survey of 87 children / O. Goulet, S. Baglin-Gobet, C. Talbotec [et al.] // Eur. J. Pediatr. Surg. – 2005. – Vol. 15. – P. 95–101.

278. Outcome of home parenteral nutrition in 251 children over a 14–y period: report of a single center / E. Abi Nader, C. Lambe, C. Talbotec [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2016. – Vol. 103, № 5. – P. 1327–36. doi: 10.3945/ajcn.115.121756.

279. Outcomes in patients with short bowel syndrome after autologous intestinal reconstruction: Does etiology matter? / F. Pederiva, A. Sgrò, R. Coletta [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2018. – Vol. 53, № 7. – P. 1345–1350. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.03.009.

280. Outcomes of Children With Chronic Intestinal Failure: Experience Over 2 Decades at a Tertiary Paediatric Hospital / S.C. Jo, Z. McCallum, H. Shalley [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2019. – Vol. 69, № 3. – P. e79–e87. doi: 10.1097/MPG.0000000000002384.

281. Pakarinen, M.P. Autologous intestinal reconstruction surgery as part of comprehensive management of intestinal failure / M.P. Pakarinen // *Pediatr. Surg. Int.* – 2015. – Vol. 31, № 5. – P. 453–64. doi: 10.1007/s00383–015–3696–x.

282. Parenteral nutrition–associated liver disease in extremely low–birthweight infants with intestinal disease / K. Hirano, A. Kubota, M. Nakayama [et al.] // *Pediatr. Int.* – 2015. – Vol. 57, № 4. – P. 677–81. doi: 10.1111/ped.12609.

283. Parenteral nutrition–induced hepatobiliary dysfunction in infants and prepubertal rabbits / S. Loff, B. Kranzlin, M. Moghadam [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 1999. – Vol. 15. – P. 479–82.

284. Parton, R.G. Caveolae / R.G. Parton, V.A. Tillu, B.M. Collins // *Curr. Biology.* – 2018. – Vol. 28. – P. R402–R405.

285. Pediatric Chronic Intestinal Failure in Italy: Report from the 2016 Survey on Behalf of Italian Society for Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (SIGENP) / A. Diamanti, T. Capriati, P. Gandullia [et al.] // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 9, № 11. – P. E1217. doi: 10.3390/nu9111217.

286. Pediatric intestinal failure: nutrition, pharmacologic, and surgical approaches / Y.A. Ching, K. Gura, B. Modi, T. Jaksic // *Nutr. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 22. – P. 653–63.

287. Pediatric Intestinal Transplantation / N. Celik, G.V. Mazariegos, K. Soltys [et al.] // *Gastroenterol. Clin. North Am.* – 2018. – Vol. 47, № 2. – P. 355–368. doi: 10.1016/j.gtc.2018.01.007.
288. Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success / A.U. Spencer, A. Neaga, B. West [et al.] // *Ann. Surg.* – 2005. – Vol. 242. – P. 403–9.
289. Pediatric short–bowel syndrome: the cost of comprehensive care / A.U. Spencer, D. Kovacevich, M. McKinney–Barnett [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2008. – Vol. 88. – P. 1552–9.
290. Pediatric small bowel transplantation / N. Nayyar, G. Mazariegos, S. Ranganathan [et al.] // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 19. – P. 68–77.
291. Perianal implantation of bioengineered human internal anal sphincter constructs intrinsically innervated with human neural progenitor cells / S. Raghavan, E.A. Miyasaka, R.R. Gilmont [et al.] // *Surgery.* – 2014. – Vol. 155. – P. 668–74.
292. Persistence of hepatic fibrosis in pediatric intestinal failure patients treated with intravenous fish oil lipid emulsion / C. Belza, R. Thompson, G.R. Somers [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2017. – Vol. 52, № 5. – P. 795–801. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.01.048.
293. Phenotype and distribution pattern of nestin–GFP–expressing cells in murine myenteric plexus / D. Grundmann, F. Markwart, A. Scheller [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2016. – Vol. 366. – P. 573–86.
294. Poor Prognostic Factors in Patients with Parenteral Nutrition–Dependent Pediatric Intestinal Failure / S.J. Choi, K.J. Lee, J.S. Choi [et al.] // *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* – 2016. – Vol. 19, № 1. – P. 44–53. doi: 10.5223/pghn.2016.19.1.44.
295. Poth, E.J. Use of gastrointestinal reversal in surgical procedures / E.J. Poth // *Am. J. Surg.* – 1969. – Vol. 118, № 6. – P. 893–899.
296. Practical measurement of body composition using bioelectrical impedance, air displacement plethysmography and ultrasound in stable outpatients with short bowel syndrome receiving home parenteral nutrition: comparison of agreement between the

methods / D.J. Jones, S. Lal, M. Gittins [et al.] // *J. Hum. Nutr. Diet.* – 2019. – Vol. 32, № 3. – P. 288-294. doi:10.1111/jhn.12613

297. Predicting Intestinal Adaptation in Pediatric Intestinal Failure: A Retrospective Cohort Study / C. Belza, K. Fitzgerald, N. de Silva [et al.] // *Ann. Surg.* – 2017. – Vol. 269, № 5. – P. 988–993. doi: 10.1097/SLA.0000000000002602.

298. Proteomic analysis of the intestinal adaptation response reveals altered expression of fatty acid binding proteins following massive small bowel resection / A.N. Stephens, P.M. Pereira–Fantini, G. Wilson [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2010. – № 9. – P. 1437–49.

299. Quigley, E.M. Effects of artificial ileocolonic sphincter on motility in intestinal remnant following subtotal small intestinal resection in the dog / E.M. Quigley, J.S. Thompson // *Dig. Dis. Sci.* – 1994. – Vol. 39, № 6. – P. 1222–1229.

300. Radiographic measurement of intestinal length among children with short bowel syndrome: Retrospective determination remains problematic / C.S. Velazco, B.S. Fullerton, J.A. Brazzo 3rd [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2017. – Vol. 52, № 12. – P. 1921–1924. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.055.

301. Ramos-Gonzalez, G. Autologous intestinal reconstruction surgery / G. Ramos-Gonzalez, H.B. Kim // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2018. – Vol. 27, № 4. – P. 261-266. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2018.08.001.

302. Randomised placebo–controlled trial of teduglutide in reducing parenteral nutrition and/or intravenous fluid requirements in patients with short bowel syndrome / P.B. Jeppesen, R. Gilroy, M. Pertkiewicz [et al.] // *Gut.* – 2011. – Vol. 60. – P. 902–14.

303. Rege, A.S. Autologous gastrointestinal reconstruction: review of the optimal nontransplant surgical options for adults and children with short bowel syndrome / A.S. Rege, D.L. Sudan // *Nutr. Clin. Pract.* – 2013. – Vol. 28. – P. 65–74.

304. Reliability of radiographic measurement of small intestinal length / T. Shatari, M.A. Clark, J.R. Lee, M.R. Keighley // *Colorectal Dis.* – 2004. – Vol. 6, № 5. – P. 327–9.

305. Repeat serial transverse enteroplasty procedure (reSTEP): Is it worth it? / C. Lemoine, K. Larkin, K. Brennan [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2021. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2020.12.026.
306. Report of 111 consecutive patients enrolled in the International Serial Transverse Enteroplasty (STEP) Data Registry: a retrospective observational study / B.A. Jones, M.A. Hull, K.M. Potanos [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* – 2013. – Vol. 216. – P. 438–46.
307. Reporting on outcome measures in pediatric chronic intestinal failure: A systematic review / S.C.J. Nagelkerke, D.J. Mager, M.A. Benninga, M.M. Tabbers // *Clin. Nutr.* – 2019 – pii: S0261–5614(19)33039–0. doi: 10.1016/j.clnu.2019.08.027.
308. Resection–induced intestinal adaptation and the role of enteric smooth muscle / C.A. Martin, K.Q. Bernabe, J.A. Taylor [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2008. – Vol. 43. – P. 1011–7.
309. Ret heterozygous mice have enhanced intestinal adaptation after massive small bowel resection / M.C. Hitch, J.A. Leinicke, D. Wakeman [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2012. – Vol. 302. – P. G1143–50.
310. Review article: the management of long–term parenteral nutrition / M. Dibb, A. Teubner, V. Theis [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 37. – P. 587–603.
311. Richardson, L. What is the evidence on the practice of mucous fistula refeeding in neonates with short bowel syndrome? / L. Richardson, S. Banerjee, H. Rabe // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2006. – Vol. 43. – P. 267–70.
312. Risk factors and outcomes of tapering surgery for small intestinal dilatation in pediatric short bowel syndrome / M. Hukkinen, R. Kivisaari, A. Koivusalo, M.P. Pakarinen // *J. Pediatr. Surg.* – 2017. – Vol. 52, № 7. – P. 1121–1127. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.01.052.
313. Role of small bowel follow–through in diagnosing inflammation of the terminal ileum in pediatric patients / M. Stenerson, E. Vittinghoff, M.B. Heyman [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2010. – Vol. 51, № 4. – P. 433–436. doi:10.1097/MPG.0b013e3181d67ea7

314. Rowland, K.J. The "cryptic" mechanism of action of glucagon-like peptide-2 / K.J. Rowland, P.L. Brubaker // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2011. – Vol. 301. – P. G1–8.

315. Safety and efficacy of teduglutide after 52 weeks of treatment in patients with short bowel intestinal failure / S.J. O'Keefe, P.B. Jeppesen, R. Gilroy [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2013. – № 11. – P. 815–23.

316. Schafer, K.H. Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system / K.H. Schafer, C.I. Hagl, U. Rauch // *Pediatr. Surg. Int.* – 2003. – Vol. 19. – P. 340–4.

317. Segmental reversal of the small bowel as an alternative to intestinal transplantation in patients with short bowel syndrome / Y. Panis, B. Messing, P. Rivet [et al.] // *Ann. Surg.* – 1997. – Vol. 225. – P. 401–07.

318. Segmental reversal of the small bowel can end permanent parenteral nutrition dependency: an experience of 38 adults with short bowel syndrome / L. Beyer-Berjot, F. Joly, L. Maggiori [et al.] // *Ann. Surg.* – 2012. – Vol. 256. – P. 739–44.

319. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices / J.P. Vacanti, M.A. Morse, W.M. Saltzman [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1988. – Vol. 23. – P. 3–9.

320. Sequential intestinal lengthening procedures for refractory short bowel syndrome / K. Georgeson, D. Halpin, R. Figueroa [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 1994. – Vol. 29. – P. 316–20.

321. Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure / H.B. Kim, D. Fauza, J. Garza [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2003. – Vol. 38. – P. 425–9.

322. Serial transverse enteroplasty (STEP): intermediate outcomes in children with short bowel syndrome / L. Lourenco, M. Campos, J. Monteiro [et al.] // *Eur. J. Pediatr.* – 2012. – Vol. 171. – P. 1265–8.



323. Serial transverse enteroplasty allows children with short bowel to wean from parenteral nutrition / D.F. Mercer, B.D. Hobson, B.K. Gerhardt [et al.] // *J. Pediatr.* – 2014. – Vol. 164. – P. 93–8.

324. Serial transverse enteroplasty for short bowel syndrome: a case report / H.B. Kim, P.W. Lee, J. Garza [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2003. – Vol. 38, № 6. – P. 881-5. doi: 10.1016/s0022-3468(03)00115-5.

325. Serial transverse enteroplasty for short bowel syndrome: Hong Kong experience / M.W. Leung, I.H. Chan, N.S. Chao [et al.] // *Hong Kong Med. J.* – 2012. – Vol. 18. – P. 35-9.

326. Serial transverse enteroplasty in a newborn patient / R.A. Cowles, S.J. Lobritto, S. Stylianos [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2007. – Vol. 45. – P. 257-60.

327. Serial transverse enteroplasty to facilitate enteral autonomy in selected children with short bowel syndrome / T. Wester, H. Borg, H. Naji [et al.] // *Br. J. Surg.* – 2014. – Vol. 101, № 10. – P. 1329–33. doi: 10.1002/bjs.9583.

328. Short bowel mucosal morphology, proliferation and inflammation at first and repeat STEP procedures / A. Mutanen, M. Barrett, Y. Feng [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2019. – Vol. 54, № 3. – P. 511–516. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2018.04.016.

329. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview / S.J. O'Keefe, A.L. Buchman, T.M. Fishbein [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* – 2006. – № 4. – P. 6–10.

330. Short Bowel Syndrome as the Leading Cause of Intestinal Failure in Early Life: Some Insights into the Management / O. Goulet, E. Abi Nader, B. Pigneur, C. Lambe // *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* – 2019. – Vol. 22, № 4. – P. 303–329. doi: 10.5223/pghn.2019.22.4.303.

331. Short bowel syndrome in children as a surgical, general medical and social problem / I.R. Dilanian, O.O. Losev, N.R. Gavrylyshchen, I.S. Belestov // *Хирургия детского возраста.* – 2017. – № 4 (57). – С. 92–96.

332. Short bowel syndrome in Germany. Estimated prevalence and standard of care / M.W. von Websky, U. Liermann, B.M. Buchholz [et al.] // *Chirurg.* – 2014. – Vol. 85. – P. 433–9.

333. Short bowel syndrome: a practical pathway leading to successful enteral autonomy / M.E. Ba'ath, S. Almond, B. King [et al.] // *World J. Surg.* – 2012. – Vol. 36, № 5. – P. 1044–8. doi: 10.1007/s00268–012–1512–5.

334. Simultaneous Serial Transverse Enteroplasty (STEP) in Size Mismatch Small Bowel Transplantations / G. Frongia, A. Majlesara, A. Saffari [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2019. – Vol. 23, № 2. – P. 331–338. doi: 10.1007/s11605–018–3893–8.

335. Skeletal muscle neural progenitor cells exhibit properties of NG2–glia / A. Birbrair, T. Zhang, Z.M. Wang [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2013. – Vol. 319. – P. 45–63.

336. Slonetsky, B.I. Achievements and realities of surgical treatment for short bowel syndrome(literature review) / B.I. Slonetsky, M.I. Tutchenko, I.V. Verbitsky // *Медицина неотложных состояний.* – 2017. – № 8 (87). – С. 15–21.

337. Small Bowel Diameter in Short Bowel Syndrome as a Predictive Factor for Achieving Enteral Autonomy. P. 1 / G.C. Ives, F.R. Demehri, R. Sanchez [et al.] // *J. Pediatr.* – 2016. – Vol. 178. – P. 275–277.

338. Small Bowel Diameter in Short Bowel Syndrome as a Predictive Factor for Achieving Enteral Autonomy. P. 2 / G.C. Ives, F.R. Demehri, R. Sanchez [et al.] // *J. Pediatr.* – 2016. – № 178. – P. 278–281.e1.

339. Society of Abdominal Radiology Crohn's Disease-Focused Panel. Consensus Recommendations for Evaluation, Interpretation, and Utilization of Computed Tomography and Magnetic Resonance Enterography in Patients With Small Bowel Crohn's Disease / D.H. Bruining, E.M. Zimmermann, E.V. Loftus Jr. [et al.] // *Radiology.* – 2018. – Vol. 286, № 3. – P. 776-799. doi: 10.1148/radiol.2018171737.

340. Sommovilla, J. Surgical options to enhance intestinal function in patients with short bowel syndrome / J. Sommovilla, B.W. Warner // *Curr. Opin. Pediatr.* – 2014. – Vol. 26, № 3. – P. 350–5. doi: 10.1097/MOP.000000000000103.

341. Spiral intestinal lengthening and tailoring (SILT)" for a child with severely short bowel / D. Alberti, G. Boroni, G. Giannotti [et al.] // *Pediatr. Surg. Int.* – 2014. – Vol. 30. – P. 1169–72.
342. Spiral intestinal lengthening and tailoring – first in vivo study / T. Cserni, G. Varga, D. Erces [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2013. – Vol. 48. – P. 1907–13.
343. Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders / T.A. Markel, P.R. Crisostomo, T. Lahm [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2008. – Vol. 43. – P. 1953–63.
344. Strang, B.J. Improvement in Parenteral Nutrition–Associated Cholestasis With the Use of Omegaven in an Infant With Short Bowel Syndrome / B.J. Strang, B.A. Reddix, R.A. Wolk // *Nutr. Clin. Pract.* – 2016. – Vol. 31, № 5. – P. 647–53. doi: 10.1177/0884533616643697.
345. Substantial harm associated with failure of chronic paediatric central venous access devices / A.J. Ullman, T. Kleidon, M. Cooke, C.M. Rickard // *BMJ Case Rep.* – 2017. – 2017. – P. bcr–2016–218757. doi: 10.1136/bcr–2016–218757.
346. Success of serial transverse enteroplasty in an adult with extreme short bowel syndrome: a case report / S. Fan, Y. Li, S. Zhang [et al.] // *Int. Surg.* – 2015. – Vol. 100, № 4. – P. 626–31. doi: 10.9738/INTSURG–D–14–00177.1.
347. Successful implantation of an engineered tubular neuromuscular tissue composed of human cells and chitosan scaffold / E. Zakhem, M. Elbahrawy, G. Orlando, K.N. Bitar // *Surgery.* – 2015. – Vol. 158. – P. 1598–608.
348. Surgical rehabilitation of short and dysmotile intestine in children and adults / M. Hukkinen, L. Merras–Salmio, T. Sipponen [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 50. – P. 153–61.
349. Surgical Rehabilitation Techniques in Children with Poor Prognosis Short Bowel Syndrome / M. Dore, P.T. Junco, A.M. Andres [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 112–6. doi: 10.1055/s–0035–1567805.
350. Survival and nutritional dependence on home parenteral nutrition: Three decades of experience from a single referral centre / M. Dibb, M. Soop, A. Teubner [et

al.] // Clin. Nutr. – 2017. – Vol. 36, № 2. – P. 570–576. doi: 10.1016/j.clnu.2016.01.028.

351. Systematic Review and Meta–Analysis of the Utilization of Ethanol Locks in Pediatric Patients With Intestinal Failure / R. Rahhal, M.A. Abu–El–Haija, L. Fei [et al.] // JPEN. – 2018. – Vol. 42, № 4. – P. 690–701. doi: 10.1177/0148607117722753.

352. Taking a STEP back: Assessing the outcomes of multiple STEP procedures / M. Barrett, F.R. Demehri, G.C. Ives [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2017. – Vol. 52, № 1. – P. 69–73. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.10.024.

353. Tannuri, U. Treatment of short bowel syndrome in children. Value of the Intestinal Rehabilitation Program / U. Tannuri, F. Barros, A.C. Tannuri // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2016. – Vol. 62, № 6. – P. 575–583. doi: 10.1590/1806–9282.62.06.575.

354. Tappenden, K.A. Intestinal adaptation following resection / K.A. Tappenden // JPEN. – 2014a. – Vol. 38, Suppl. 1. – P. 23S–31S.

355. Tappenden, K.A. Pathophysiology of short bowel syndrome: considerations of resected and residual anatomy / K.A. Tappenden // JPEN. – 2014. – Vol. 38, Suppl. 1. – P. 14S–22S. doi: 10.1177/0148607113520005.

356. Teduglutide for the Treatment of Short Bowel Syndrome / S.M. Wilhelm, M. Lipari, J.K. Kulik, P.B. Kale–Pradhan // Ann. Pharmacother. – 2014. – Vol. 48, № 9. – P. 1209–1213.

357. Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure / P.B. Jeppesen, M. Pertkiewicz, B. Messing [et al.] // Gastroenterology. – 2012. – Vol. 143. – P. 1473–81.

358. Ten–Year Experience With Bowel Transplantation at Seoul St. Mary's Hospital / H.K. Chang, S.Y. Kim, J.I. Kim [et al.] // Transplant. Proc. – 2016. – Vol. 48, № 2. – P. 473–8. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.12.065.

359. The Bianchi procedure: a 20-year single institution experience / S.R. Walker, A. Nucci, J.A. Yaworski [et al.] // J. Pediatr. Surg. – 2006. – Vol. 41. – P. 113–119.

360. The Bianchi procedure: a 20-year single institution experience / S.R. Walker, A. Nucci, J.A. Yaworski, E.M. Barksdale Jr. // *J. Pediatr. Surg.* – 2006. – Vol. 41. – P. 113–9.
361. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment / K. Reinshagen, R. Adams, M. Trunk, L.M. Wessel // *Minerva Pediatr.* – 2009. – Vol. 61. – P. 273–81.
362. The evolution of the serial transverse enteroplasty for pediatric short bowel syndrome at a single institution / K. Fitzgerald, M. Muto, C. Belza [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2019. – Vol. 54, № 5. – P. 993–998. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2019.01.051.
363. The first clinical application of the spiral intestinal lengthening and tailoring (silt) in extreme short bowel syndrome / T. Cserni, B. Biszku, I. Guthy [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2014. – Vol. 18. – P. 1852–7.
364. The impact of longitudinal intestinal lengthening and tailoring on liver function in short bowel syndrome / K. Reinshagen, K. Zahn, C. Buch [et al.] // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 2008. – Vol. 18. – P. 249–53.
365. Thompson, J.S. Smooth muscle adaptation after intestinal transection and resection / J.S. Thompson, E.M. Quigley, T.E. Adrian // *Dig. Dis. Sci.* – 1996. – Vol. 41. – P. 1760–7.
366. Thompson, J.S. Surgical approach to the short-bowel syndrome: procedures to slow intestinal transit / J.S. Thompson // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1999. – № 9. – P. 263–6.
367. Three-dimensional CT enterography versus barium follow-through examination in measurement of remnant small intestinal length in short bowel syndrome patients / W. Cheng, S. Zhang, J. Wang [et al.] // *Abdom. Radiol. (NY)*. – 2018. – Vol. 43, № 11. – P. 2955-2962. doi:10.1007/s00261-018-1597-x
368. Tissue engineering for the treatment of short bowel syndrome in children / L.Y. Martin, M.R. Ladd, A. Werts [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2018. – Vol. 83. – P. 249–57.

369. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine / R.H. Dosh, N. Jordan–Mahy, C. Sammon, C.L. Le Maitre // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2018. – Vol. 24. – P. 98–111.
370. Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells / Y. Nakase, A. Hagiwara, T. Nakamura [et al.] // *Tissue Eng.* – 2006. – № 12. – P. 403–12.
371. Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting / Y. Hori, T. Nakamura, K. Matsumoto [et al.] // *Int. J. Artif. Organs.* – 2001. – Vol. 24. – P. 50–4.
372. Tissue–engineered large intestine resembles native colon with appropriate in vitro physiology and architecture / T.C. Grikscheit, E.R. Ochoa, A. Ramsanahie [et al.] // *Ann. Surg.* – 2003. – Vol. 238. – P. 35–41.
373. Tissue–engineered small intestine and stomach form from autologous tissue in a preclinical large animal model / F.G. Sala, S.M. Kunisaki, E.R. Ochoa [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2009. – Vol. 156. – P. 205–12.
374. Tissue–engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection / T.C. Grikscheit, A. Siddique, E.R. Ochoa [et al.] // *Ann. Surg.* – 2004. – Vol. 240. – P. 748–54.
375. Tunable methacrylated hyaluronic acid–based hydrogels as scaffolds for soft tissue engineering applications / B.S. Spearman, N.K. Agrawal, A. Rubiano [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2020. – Vol. 108. – P. 279–91.
376. Twenty–eight years of intestinal transplantation in Paris: experience of the oldest European center / F. Lacaille, S. Irtan, L. Dupic [et al.] // *Transpl. Int.* – 2017. – Vol. 30. – P. 178–86.
377. Uesaka, T. Neuronal differentiation in schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system / T. Uesaka, M. Nagashimada, H. Enomoto // *J. Neurosci.* – 2015. – Vol. 35. – P. 9879–9888.
378. Ultrasound Elastography as a Non–Invasive Method to Monitor Liver Disease in Children with Short Bowel Syndrome: Updated Results / A.E. Lawrence, M.

Dienhart, J.N. Cooper [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* – 2019. – Vol. 54, № 6. – P. 1179-1183. doi:10.1016/j.jpedsurg.2019.02.039

379. Ultrasound of portal venous gas in a child with short bowel syndrome / T. Hosokawa, Y. Yamada, Y. Tanami [et al.] // *Pediatr. Int.* – 2019. – Vol. 61, № 7. – P. 733-735. doi:10.1111/ped.13900

380. Ultrasound scanning may reduce the need for barium radiology in the assessment of small-bowel Crohn's disease / A.R. Bremner, J. Pridgeon, J. Fairhurst, R.M. Beattie // *Acta Paediatr.* – 2004. – Vol. 93, № 4. – P. 479-481. doi:10.1080/08035250410023089

381. Use of small bowel MRI enteroclysis in the management of paediatric IBD / S. Sanka, A. Gomez, P. Set [et al.] // *J. Crohns Colitis.* – 2012. – Vol. 6, № 5. – P. 550-6. doi: 10.1016/j.crohns.2011.10.014.

382. Utility of Aminotransferase/Platelet Ratio Index to Predict Liver Fibrosis in Intestinal Failure-Associated Liver Disease in Pediatric Patients / C. Rumbo, M.I. Martinez, A. Cabanne [et al.] // *JPEN.* – 2017. – Vol. 41, № 5. – P. 884–889. doi: 10.1177/0148607115625779.

383. Utilization of ultrasound for the evaluation of small bowel obstruction: A systematic review and meta-analysis / M. Gottlieb, G.D. Peksa, A.V. Pandurangadu [et al.] // *Am. J. Emerg. Med.* – 2018. – Vol. 36, № 2. – P. 234-242. doi:10.1016/j.ajem.2017.07.085

384. Very low birth weight preterm infants with surgical short bowel syndrome: incidence, morbidity and mortality, and growth outcomes at 18 to 22 months / C.R. Cole, N.I. Hansen, R.D. Higgins [et al.] // *Pediatrics.* – 2008. – Vol. 122. – P. e573–82.

385. Vestri, A.R. MRI reveals different Crohn's disease phenotypes in children and adults / A.R. Vestri, C. Catalano, S. Cucchiara // *Eur. Radiol.* – 2019. – Vol. 29, № 9. – P. 5082-5092. doi: 10.1007/s00330-019-6006-5.

386. Vitamin D deficiency in children with intestinal failure receiving home parenteral nutrition / L.J. Wozniak, H.M. Bechtold, L.E. Reyen [et al.] // *JPEN.* – 2015. – Vol. 39, № 4. – P. 471–5. doi: 10.1177/0148607114527135.

387. Waag, K.L. What do children look like after longitudinal intestinal lengthening / K.L. Waag, S. Hosie, L. Wessel // *Eur. J. Pediatr. Surg.* – 1999. – № 9. – P. 260–2.
388. Wales, P.W. Short bowel syndrome: epidemiology and etiology / P.W. Wales, E.R. Christison–Lagay // *Semin. Pediatr. Surg.* – 2010. – Vol. 19. – P. 3–9.
389. Weaning Off Prognosis Factors of Home Parenteral Nutrition for Children With Primary Digestive Disease / L.M. Petit, D. Girard, S. Ganousse–Mazeron [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2016. – Vol. 62, № 3. – P. 462–8. doi: 10.1097/MPG.0000000000000980.
390. Weaver, L.T. Small intestinal length: a factor essential for gut adaptation / L.T. Weaver, S. Ausfin, T. Cale // *Gut.* – 1991. – Vol. 32, № 11. – P. 1321–1323.
391. Winkler, M.F. Clinical, social, and economic impacts of home parenteral nutrition dependence in short bowel syndrome / M.F. Winkler, C.E. Smith // *JPEN.* – 2014. – Vol. 38. – P. 32S–37S.
392. Wnorowski, A.M. How to perform and interpret cine MR enterography / A.M. Wnorowski, F.F. Guglielmo, D.G. Mitchell // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2015. – Vol. 42, № 5. – P. 1180–1189. doi:10.1002/jmri.24981
393. Wood, J.D. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology / J.D. Wood // *Gastroenterology.* – 2004. – Vol. 127. – P. 635–57.
394. Zemrani, B. Monitoring of long–term parenteral nutrition in children with intestinal failure / B. Zemrani, J.E. Bines // *JGH Open.* – 2019. – Vol. 3, № 2. – P. 163–172. doi: 10.1002/jgh3.12123.