

На правах рукописи

ХАСАНОВ Расуль Ринатович

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

14.01.19 - детская хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Уфа – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор
заслуженный деятель науки РФ

Гумеров Аитбай Ахметович

доктор медицинских наук, профессор

Вессель Лукас Мария

Официальные оппоненты:

Разумовский Александр Юрьевич - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой детской хирургии

Караваева Светлана Александровна - доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой детской хирургии

Новожилов Владимир Александрович - доктор медицинских наук, профессор, Областное государственное автономное учреждение здравоохранения «Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Иркутской области, главный врач.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.006.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте: [http:// www.bashgmu.ru](http://www.bashgmu.ru).

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

В.У. Сатаев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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 пациентами, рождёнными в срок: 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 терапией, 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 ранее 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 свидетель-

ствуется 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; Pakarinen 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 персонализированный 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 (по-

вторной 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 патологичны 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 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-МРТ 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 бионической 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 резуль-

татом 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 эксперимен-

тальных исследований, использованием сертифицированных расходных материалов и приборов, контролем всех иммуногистологических исследований при помощи негативного контроля, корректным анализом и интерпретацией полученных результатов, статистической обработки 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.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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.

Материалы и методы первого экспериментального исследования

В первом экспериментальном исследовании изучалась кишечная адаптация в мышечных слоях и энтеральной нервной системе кишечника при синдроме короткой кишки. Для выполнения поставленной задачи эксперимент выполнялся на 22 крысах породы Wistar со средней массой тела 260-360 г. Животные были распределены на 2 группы. В основной группе 12 крысам был смоделирован СКК, путем субтотальной резекции тонкой кишки с сохранением 5 см проксимальной части тощей кишки и 5 см дистальной части подвздошной кишки. Крысам контрольной группы (10 животным) сделана лапаротомия без резекции тонкой кишки. Через 2 недели животные выведены из опыта при помощи усыпления углекислым газом. Проведено гистологическое исследование участков тощей и подвздошной кишки крыс обеих групп, для этого использовалось окрашивание препаратов гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое окрашивание и иммунофлюоресцентное окрашивание нестином (маркером стволовых клеток). Применялся непрямой метод иммунофлюоресценции.

При помощи световой микроскопии измерялись диаметр тонкой кишки, толщина мышечных слоев тонкой кишки. Для определения площади мышечной ткани в поперечном срезе тонкой кишки использовалась следующая формула:

площадь мышечного слоя = π x диаметр x толщина мышечного слоя.

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

Материалы и методы клинического исследования

На кафедре детской хирургии с физической и медицинской реабилитацией детей с курсом ИДПО ФГБОУ 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).

Основными причинами развития СКК явились обширные резекции тонкой кишки при гастрошизисе - у 21 пациента (38,9%), некротическом энтероколите – у 14 пациентов (25,9%), атрезии тонкой кишки – у 10 пациентов (18,5%), завороте кишечника – у 8 пациентов (14,8%). У 1 пациента (1,9%) причиной СКК явился некроз тонкой кишки, развившийся в результате тромбоза мезентеральных сосудов. Резекция тонкой кишки проводилась в различных регионах России и Германии. В последующем дети с СКК регулярно получали комплексное лечение детскими хирургами, педиатрами по месту жительства, в том числе в г. Уфе, г. Москве и г. Мангейм.

В зависимости от вида удлиняющих кишечник операций, все дети были разделены на 2 группы. Первая группа - 36 пациентов, которым проводилась операция продольного кишечного удлинения и сшивания (Longitudinal intestinal lengthening and tailoring (LILT)) – группа LILT. Вторая группа - 15 пациентов с проведением операции последовательной поперечной энтероластики (Serial Transverse Enteroplasty Procedure (STEP)) - группа STEP. Кроме того, 3 пациентам обе эти операции (LILT+STEP) были проведены одновременно (Таблица 1).

Таблица 1 - Распределение пациентов с СКК в зависимости от проведенной удлиняющей кишечник операции

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

Удлиняющие кишечник операции проводились в возрасте от 6 месяцев до 15 лет.

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

Методы исследования. Всем детям, поступившим с СКК, проводилось комплексное обследование, которое, кроме осмотра и физикальных методов исследования, включало лабораторное, биохимическое, бактериологическое, лучевые методы (УЗИ органов брюшной полости, рентген-контрастное исследование (РКИ), гидро-магнитно-резонансную томографию (гидро-МРТ)).

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.

Все биоптаты окрашивались двумя методами:

- с использованием гематоксилина и эозина;
- с использованием антител для иммуногистохимического окрашивания с целью флюоресцентной маркировки нервных клеток (антителами к PGP 9.5) и стволовых клеток (антителами к Nestin) в межмышечном нервном сплетении.

Материалы и методы второго экспериментального исследования

Во втором экспериментальном исследовании были выращены межмышечное нервное сплетение и иннервированные мышечные слои тонкой кишки в трёхмерном матриксе *in vitro*, пригодные для тканевой инженерии кишечника, и изучены взаимосвязи между нервной системой кишечника и гладкомышечными клетками. В ходе эксперимента нами были использованы клетки межмышечного нервного сплетения, изолированные от новорождённых крыс в возрасте 5-8 дней по методике, описанной в 1999 году Schäfer К.Н. с соавторами, и кишечные гладкомышечные клетки крыс (Sprague–Dawley), приобретенные в Pelo Biotech (Германия). В качестве трёхмерного матрикса применялся гидрогель на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, USA).

Для иммунофлюоресцентного окрашивания нервных клеток применяли иммуногистохимический метод при помощи антител к anti- β III Tubulin (для маркировки нейронов) и антител к anti-Smooth Muscle Actin (SMA) (для маркировки гладкомышечных клеток). Для идентификации ядер клеток использовался антрахиноновый краситель с высоким сродством к двухцепочечной ДНК - DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific).

Для проведения электронной микроскопии препараты фиксировали 2% глутаровым альдегидом и обрабатывали 1% OsO₄. 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).

Статистический анализ производили при помощи программ Microsoft Excel (Версия 16.30) и JMP 13.0 (SAS). При нормальном распределении показателей дан-

ные описывались при помощи среднего и стандартного отклонения и записывались в тексте как: μ (среднее) \pm σ (стандартное отклонение). При ненормальном распределении показатели описывались при помощи медианы и 25-ого и 75-ого перцентилей и записывались в тексте как: медиана (25 перцентиль; 75 перцентиль).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 (Рисунок 1).

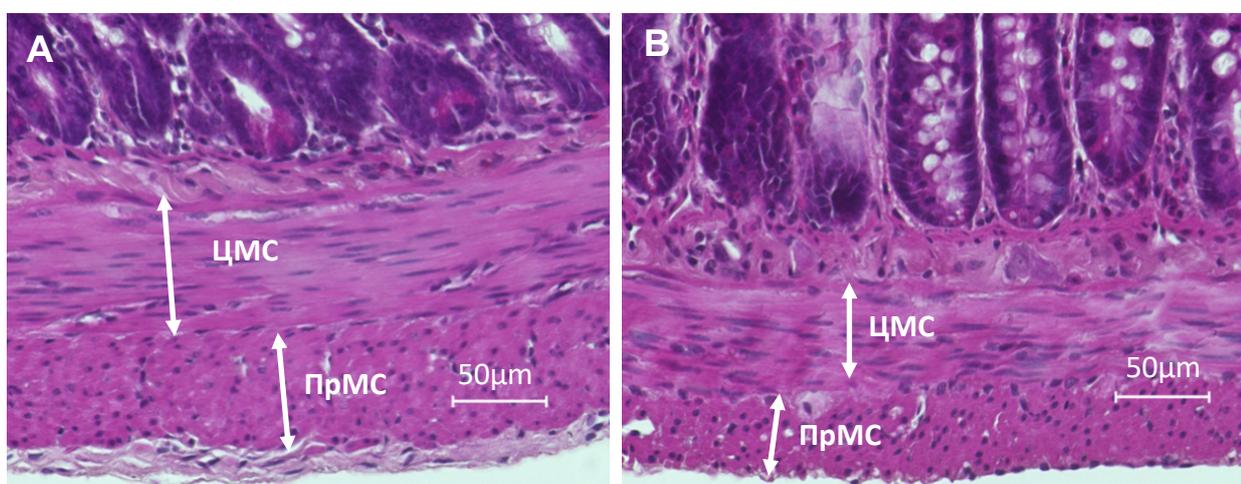


Рисунок 1 – Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. Толщина продольного и циркулярного слоёв тонкой кишки. А – группа с СКК, В- контрольная группа. ЦМС – циркулярный мышечный слой, ПрМС – продольный мышечный слой. Световая микроскопия.

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 - $5846,62 \pm 931,8 \mu\text{m}$ и также оказался достоверно ($p < 0,0023$) больше (в 1,2 раза) контроля ($4771,8 \pm 526,0 \mu\text{m}$). Толщина продольного мышечного слоя тощей кишки в группе с СКК составила 27 (17;47) μm , что было 1,8

раза больше по сравнению с контрольной группой, где это значение составило 15 (10;22) μm . Разница была статистически достоверной ($p < 0,0001$). Толщина продольного мышечного слоя подвздошной кишки составила в группе с СКК – 20 (14;29) μm , в контрольной группе – 20 (11;27) μm .

Толщина циркулярного мышечного слоя кишки у крыс с СКК была больше, чем в контрольной группе, и составила для тощей кишки 47 (23;90) μm против 22 (14,25;31,5) μm , для подвздошной - 30 (21;44) μm против 22 (16;35) μm соответственно. Толщина циркулярного мышечного слоя в группе с СКК была достоверно больше по сравнению с контрольной группой, как в тощей кишке (в 2,1 раза) ($p < 0,0001$), так и в подвздошной кишке (в 1,4 раза) ($p < 0,0001$). Следует отметить, что в тощей кишке гипертрофия мышечного слоя у крыс группы СКК была более выражена.

Площадь мышечной ткани в поперечном срезе тонкой кишки (рассчитанная по формуле: площадь мышечного слоя = π x диаметр x толщина мышечного слоя) у крыс с СКК была достоверно больше по сравнению с контрольной группой как в тощей ($p < 0,0001$), так и в подвздошной кишке ($p = 0,0056$). Так в группе СКК площадь мышечного слоя в тощей кишке составила 2221325 (1050679; 3725212) μm^2 и в подвздошной кишке – 11161352 (843239; 1503000) μm^2 . Тогда как площадь мышечного слоя в контрольной группе составила 466928 (370783; 587079) μm^2 в тощей кишке и 703396 (502434; 1023298) μm^2 в подвздошной кишке.

Наши данные показали, что при СКК развивается выраженная дилатация тощей и подвздошной кишки. Гипертрофия мышечных слоёв значительно увеличивает мышечную массу тонкой кишки, оставшейся после резекции, 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. Увеличение диаметра тонкой кишки позволяет квадратично увеличить площадь абсорбционной поверхности тонкой кишки. Однако, с другой стороны, увеличение диаметра тонкой кишки ухудшает эффективность перистальтики и затрудняет проталкивание кишечного содержимого

по кишечнику. В сложившихся условиях гипертрофия мышечных слоёв является ответной реакцией организма и предназначена для увеличения эффективности перистальтики тонкой кишки.

На следующем этапе первой части эксперимента изучалась экспрессия стволовых клеток. Для этого проводилось иммуногистохимическое окрашивание препаратов антителами к нестину (маркеру стволовых клеток) двумя методиками: визуализацией препаратов пероксидазой и иммунофлюоресцентным окрашиванием. Визуализация препаратов пероксидазой позволяла провести подсчёт количества межмышечных нервных сплетений, в которых имеются стволовые клетки (Рисунок 2). 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) штуки, 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.

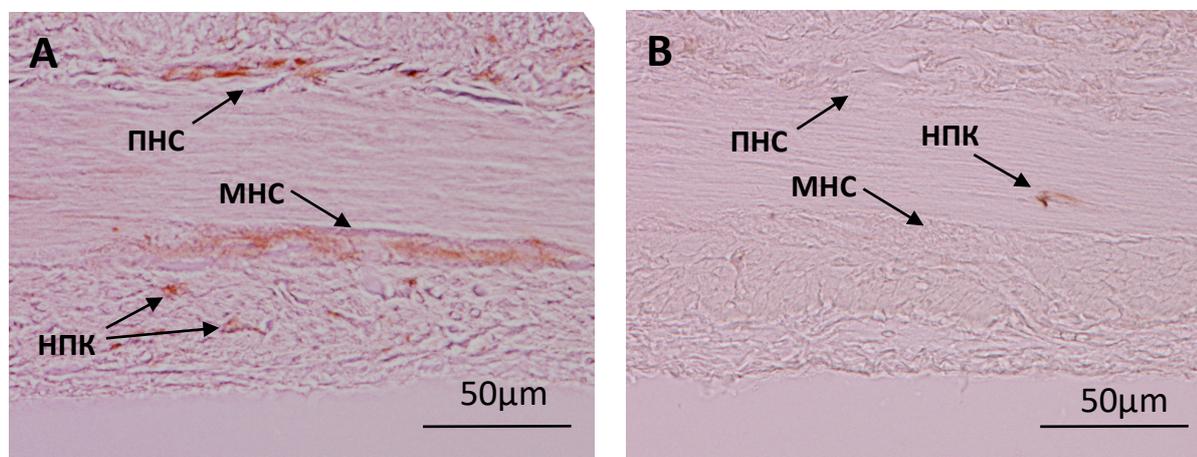


Рисунок 2 - Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. А – группа с СКК, В- контрольная группа. Окрашивание мышечного слоя тонкой кишки антителам к нестину (маркеру стволовых клеток) и визуализация при помощи пероксидазы: коричневым цветом отображается нестин. Стрелками отмечено: МНС- межмышечное 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.

Иммунофлуоресцентное окрашивание нестином, в отличие от окрашивания антителами к нестину с пероксидазой, позволило оценить экспрессию стволовых клеток внутри межмышечного нервного сплетения (Рисунок 3). 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 4).

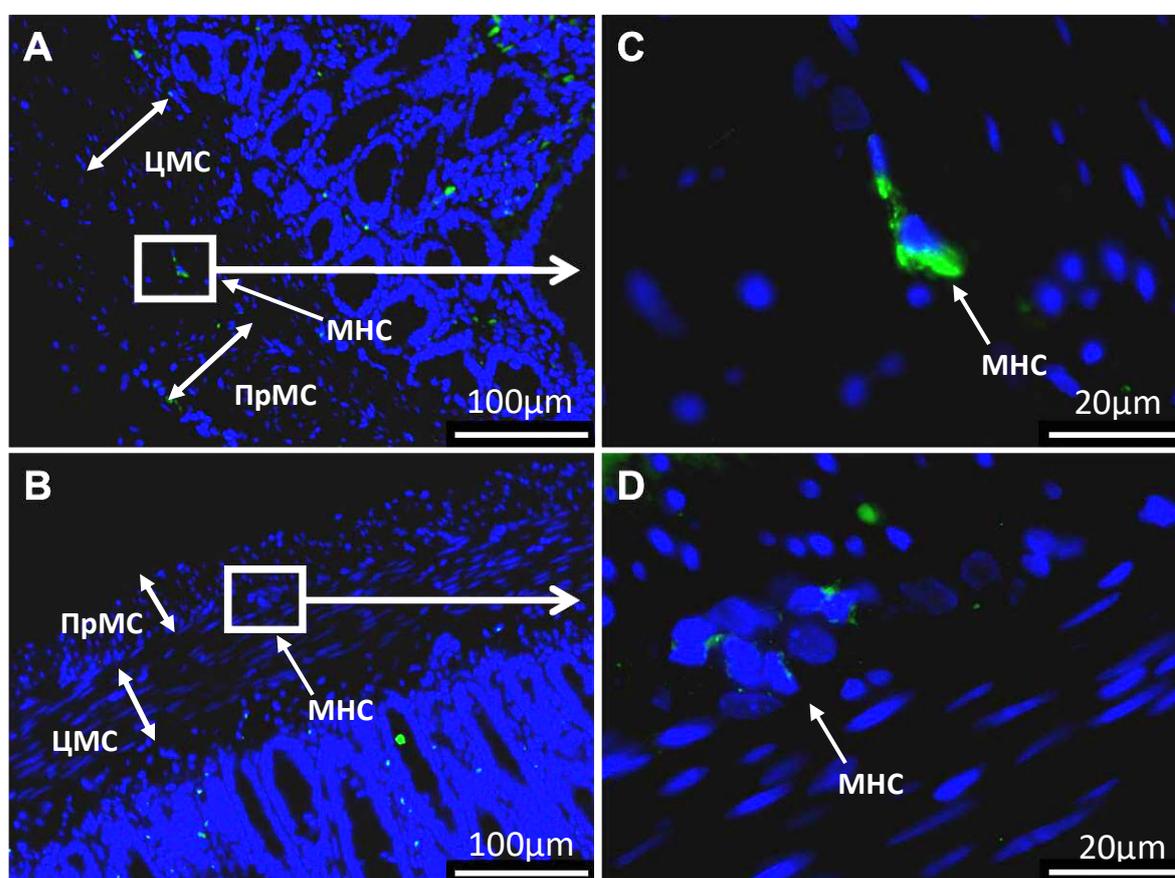


Рисунок 3 - Поперечный срез мышечной стенки тонкой кишки крысы. Иммунофлуоресцентное окрашивание нестином – маркером стволовых клеток (зеленый цвет) и клеточных ядер всех клеток DAPI (синий цвет). А и С – основная (СКК) группа в различном увеличении. В и D – контрольная группа в различном увеличении. 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. Иммунофлуоресцентная микроскопия.

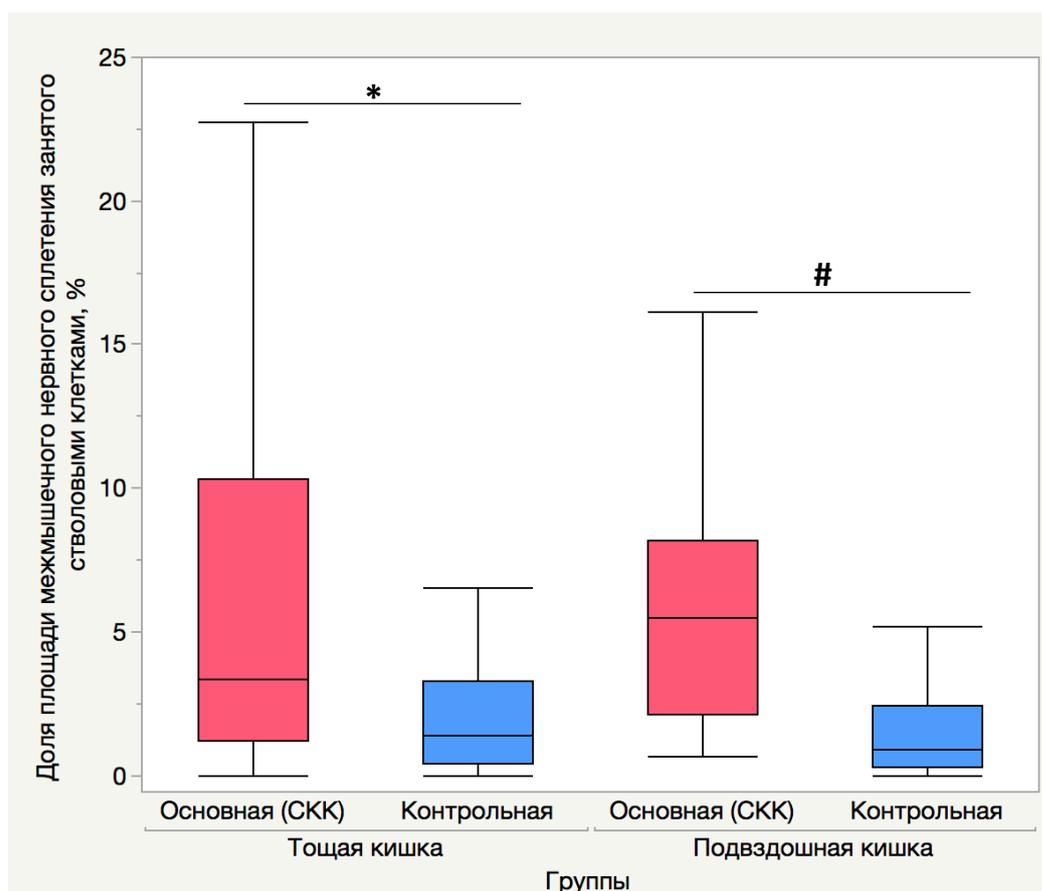


Рисунок 4 – Доля площади межмышечного нервного сплетения занятого стволовыми клетками (окрашенного нестином). Сравнение основной (СКК) группы и контрольной группы. В группе СКК достоверно больше окрашенных нестином областей. Значения: Медиана, верх и низ коробки представляют 25-ый и 75-ый перцентиль, усы показывают максимальное и минимальные значения (без выбросов). Критерии Уилкоксона (Wilcoxon test): * $p=0,0125$; # $p<0,0001$.

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

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. Изучение взаимосвязей между мышечными слоями тонкой кишки и стволовыми клетками в межмышечных нервных сплетениях и мышечных слоях выявило сильную положительную связь ($r=0,7524$, $p<0,0001$) между площадью мышечной ткани и долей занимаемой стволовыми (нестин-позитивными) клетками в межмышечном нервном сплетении, и сильную положительную корреляцию ($r=0,7597$,

$p < 0,0001$) между площадью мышечной ткани и экспрессией стволовых (нестин-положительных) клеток в мышечных слоях.

Таким образом, в мышечных слоях тонкой кишки и межмышечных нервных сплетениях при СКК происходят значительные морфологические изменения. Выявленные изменения являются результатом кишечной адаптации и патофизиологичны для СКК. Сильная положительная корреляция между долей стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях, экспрессией стволовых клеток в мышечных слоях и гипертрофией гладких мышц позволяет рассматривать мышечные слои тонкой кишки и энтеральную нервную систему, как единый нервно-мышечный комплекс, участвующий в процессе кишечной адаптации.

Характеристика процессов кишечной адаптации в энтеральной нервной системе у пациентов с синдромом короткой кишки

Для определения возможности экстраполяции данных, полученных в эксперименте на лабораторных животных, на пациентов с СКК, мы исследовали биоптаты тонкой кишки у четырёх пациентов с СКК и у четырёх больных с нормальной длиной тонкой кишки. Проведенное картирование межмышечных нервных сплетений с определением доли стволовых клеток (нестин-положительных) и нервных клеток (PGP 9.5-положительных) (Рисунок 5), показало, что экспрессия стволовых клеток у пациентов с СКК достоверно увеличивается ($p < 0,0001$), и составляет от общей площади межмышечного сплетения у пациентов с СКК $21,3 \pm 12,34\%$ (17% ($11,5\%; 34,5\%$)), у пациентов контрольной группы $6,8 \pm 3,98\%$ (7% ($3\%; 8,5\%$)). 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 ($p < 0,0001$): у пациентов с СКК этот показатель составил $0,71 \pm 0,66\%$ ($0,53\%$ ($0,32\%; 0,76\%$)), у пациентов в контрольной группе – $0,24 \pm 0,16\%$ ($0,17\%$ ($0,11\%; 0,33\%$)). Увеличение доли стволовых клеток при неизменном количестве нейронов в межмышечных нервных сплетениях свидетельствует об увеличении/росте межмышечных нервных сплетений.

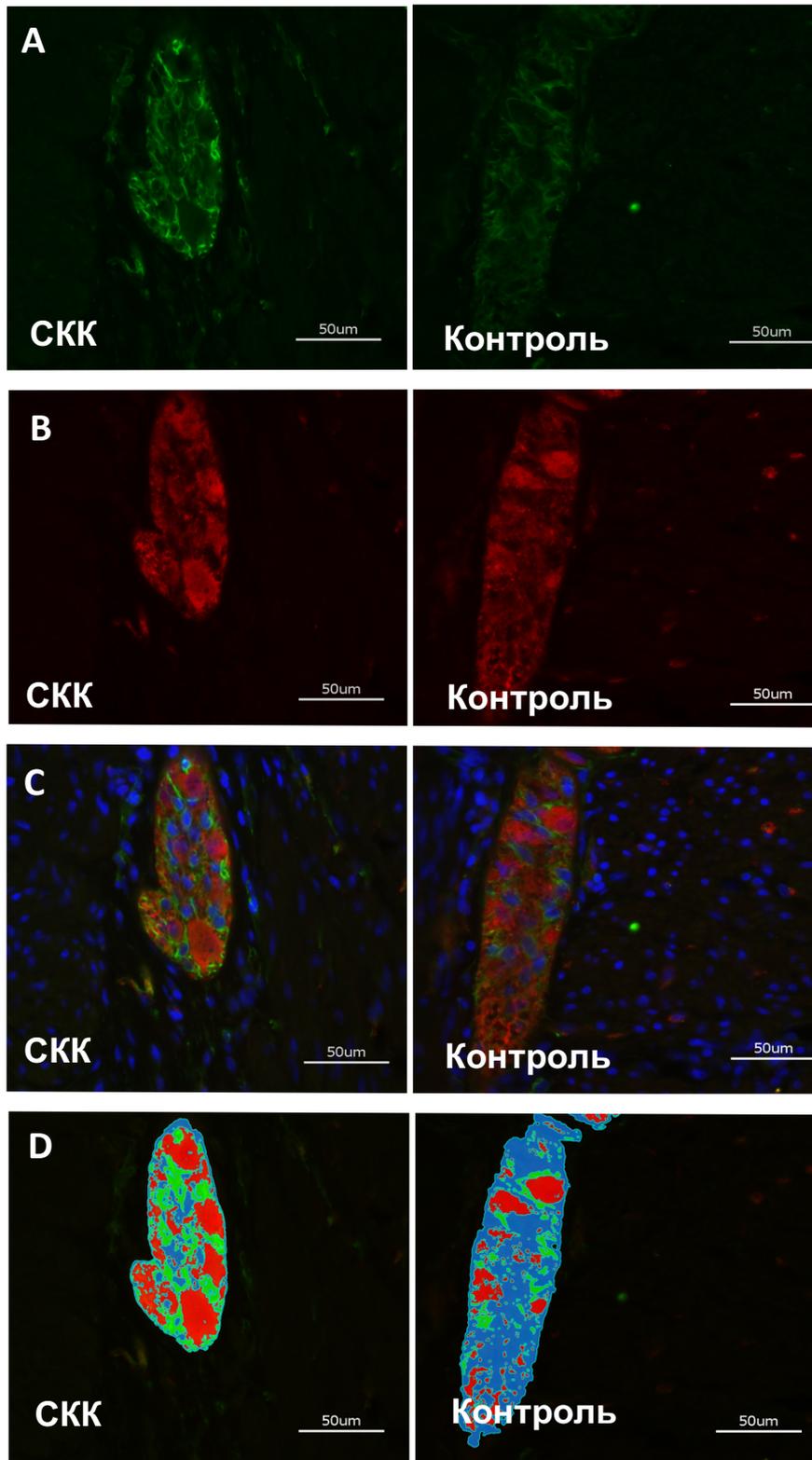


Рисунок 5 - Межмышечное нервное сплетение (Plexus myentericus) в биоптате тонкой кишки человека. Иммунофлюоресцентное окрашивание Стволовые клетки -Nestin (зелёный цвет), нейроны - PGP 9.5 (красный цвет), ядра клеток - DRAQ5 (синий цвет). А – исследование стволовых клеток, В – исследование нервных клеток, С – анализ двойного окрашивания (стволовые и нервные клетки), D – картирование межмышечных нервных сплетений (зелёный цвет – стволовые клетки, красный цвет – нейроны).

Таким образом, у пациентов с СКК, выявлено увеличение количества стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях более чем в 2 раза. Это совпадает с данными, полученными в экспериментах на животных. Идентичность полученных результатов позволила нам экстраполировать данные, полученные на экспериментальных животных, на пациентов с СКК. Доказанная нами на модели крыс положительная корреляция между увеличением доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях и гипертрофией гладких мышц позволяет нам утверждать, что выявленное у пациентов с СКК увеличение доли стволовых клеток в межмышечных нервных сплетениях сопровождается гипертрофией мышечных слоёв.

Нами впервые доказано, что у пациентов с СКК в процессе кишечной адаптации участвуют мышечные слои тонкой кишки и межмышечные нервные сплетения, которые морфологически и функционально тесно взаимосвязаны, и вместе формируют нервно-мышечный комплекс. 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 содержи-

мого со слизистой оболочкой кишки и делает перистальтику тонкой кишки более эффективной.

Лучевые методы исследования тонкой кишки при синдроме короткой кишки у детей

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, нами проведено изучение диагностической эффективности лучевых методов исследования для определения длины, дилатации и стенозов сохранившейся тонкой кишки у 8 пациентов с СКК.

Установлено, что УЗИ обладает низкой точностью, и ни у одного пациента нам не удалось правильно измерить длину тонкой кишки. В то же время РКИ и гидро-МРТ показали сходные результаты. Точность РКИ и МРТ напрямую зависит от длины тонкой кишки. Так, при длине тонкой кишки до 30 см точность РКИ и гидро-МРТ была высокая (погрешность измерений составила не более 15 см), при длине тонкой кишки от 30 до 70 см – средняя (погрешность измерений - от 15 до 25 см), при длине тонкой кишки более 70 см низкая (погрешность измерений - более 25 см).

Чувствительность лучевых методов исследования при определении дилатации тонкой кишки была высокой для всех методов исследования. 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. 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. 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. При помощи РКИ и гидро-МРТ стенозы можно было идентифицировать с высокой степенью чувствительности, специфичности и точности. При гидро-МРТ, которая была проведена 6 пациентам, наличие стенозов было правильно диагностировано у 2, отсутствие стенозов у 4 пациентов. РКИ было так же 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 наилучшую чувствительность для верификации стенозов (Рисунок 6). 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 6 - Гидро- МРТ у пациента с синдромом короткой кишки. Во фронтальной плоскости определяется стеноз и расширенная петля тонкой кишки (дилатация).

Правильное применение комбинации УЗИ, РКИ и МРТ обеспечивает комплексную диагностику изменений и своевременное определение дальнейшей тактики лечения пациента с СКК. УЗИ является оптимальной скрининговой методикой для пациентов с СКК. РКИ и гидро-МРТ позволяют детально охарактеризовать морфологию тонкой кишки, поэтому должны применяться при изменениях, выявленных на УЗИ или при наличии клинических признаков острой и хронической патологии ЖКТ у детей с СКК. В осложнённых случаях, следует проводить гидро-МРТ, которая позволяет наиболее точно изучить тонкую кишку.

Удлиняющие кишечник операции при синдроме короткой кишки у детей

Предоперационная подготовка проводилась в условиях хирургического стационара и не различалась для операций LILT и STEP.

Удлиняющие кишечник операции у большинства пациентов были проведены в возрасте от 1 года до 3 лет: в группе LILT у 26 из 36 пациентов (72,2%), в группе STEP у 9 из 15 пациентов (60%).

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

Дилатация тонкой кишки в LILT группе составила $6,7 \pm 0,41$ см, в STEP группе $6,5 \pm 0,87$ см. Данные достоверно не отличались ($p=0,43$). Стеноз тонкой кишки был выявлен и мог быть значим в развитии дилатации тонкой кишки лишь 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 удлинения в группе LILT составила $37,5 \pm 24$ 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 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 статистически не отличались ($p=0,33$).

Большинство пациентов в обеих группах (86,2% в группе LILT и 81,8% в группе STEP) были переведены из отделения интенсивной терапии в хирургическое отделение в течение двух суток. Сроки удаления перидурального катетера составили

в группе LILT 4 ± 1 и в группе STEP $3,5\pm 0,71$ дня, и статистически не отличались ($p=0,49$). В послеоперационном периоде энтеральное питание вводилось в рацион в группе LILT на $5,8\pm 0,46$ день, в группе STEP на $4,8\pm 0,97$ день. Статистически достоверных различий не было ($p=0,59$).

У 3 пациентов была произведена комбинированная операция LILT и STEP (LILT+STEP). 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. Дополнительных интраоперационных рисков выявлено не было. У всех пациентов отсутствовал илеоцекальный клапан. У двух пациентов присутствовала только сигмовидно-ободочная и прямая кишка, у одного пациента толстая кишка отсутствовала полностью. 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.

Осложнения в раннем послеоперационном периоде, потребовавшие повторного хирургического вмешательства, оценивались у всех пациентов после первичной удлиняющей операции (36 пациентов, которым была произведена операция 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.

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

При анализе причин высокой частоты развития стенозов после операции LILT установлено, что данное осложнение чаще встречалось у пациентов, у которых удлиненили менее 20 см тонкой кишки - у 4 из 5 пациентов (80%). Среди пациентов, у которых произведено удлинение участка тонкой кишки протяжённостью более 20 см, стенозы встречались реже - у 5 из 20 пациентов (25%). Разница в данных была статистически достоверной (точный тест Фишера, $p < 0,05$). Отношение шансов показало, что удлинение тонкой кишки по методике LILT менее чем на 20 см, с большой вероятностью вызовет развитие стеноза тонкой кишки. Это феномен связан с технической особенностью операции LILT, на последнем этапе которой, две сформированные кишечные трубки спиралевидно укладывались и анастомозировались как друг с другом, так 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 стенозов и клинической картины кишечной непроходимости.

В отдалённом периоде у 9 из 42 пациентов (21,4%) развилась повторная дилатация тонкой кишки, по поводу которой была проведена повторная удлиняющая операция STEP (reSTEP). Оперативную коррекцию по методике reSTEP проводили у 9 пациентов однократно, у 1 пациента - 2 раза, у 1 пациента – 3 раза. reSTEP проводилась для коррекции редилатации после операции LILT у 6 из 27 пациентов (22,2%) и для коррекции редилатации после операции STEP и reSTEP у 5 из 12 пациентов (41,6%). В связи с тем, что редилатация тонкой кишки происходит через разный промежуток времени после удлиняющих кишечник операций (от 6 месяцев до 13 лет), мы рекомендуем проводить плановое изучение диаметра тонкой при помощи лучевых методов исследования каждые 6 месяцев после проведённых удлиняющих кишечник операций.

В ходе оперативного лечения (LILT, STEP) интраоперационная летальность не зафиксирована. Один пациент из 54 (1,85%) умер в результате осложнений в раннем послеоперационном периоде, 2 пациентов из 42 (4,8%) умерли в отдалённом периоде, причиной обоих летальных исходов был катетер-ассоциированный сепсис.

На основе ретроспективного анализа результатов хирургического лечения 54 детей с СКК и литературных данных, были систематизированы (специфицированы) показания и противопоказания к операции LILT и операции STEP (Таблица 2).

Таблица 2 – 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	

Факторы, влияющие на нутритивную поддержку после применения удлиняющих кишечник операций у детей 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.

После удлиняющих кишечник операций перейти на полное энтеральное питание удалось 22 из 42 пациентов (52,4%), остальные 20 пациентов (47,6%) на момент проведения исследования нуждались в парентеральном питании. Восстановить полное энтеральное питание после операции LILT при удлинении тонкой кишки на 20 см и более удалось у 67% пациентов, после оперативного лечения по методике STEP – у 42% пациентов, после операции LILT при удлинении участка тонкой кишки менее 20 см - лишь у 33% больных. 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.

У 4 из 42 обследованных пациентов 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.

Наиболее быстро (в течение одного года) восстановили полное энтеральное питание преимущественно те пациенты, у которых присутствовала вся толстая кишка или более ее половины. Пациенты, восстановившие полное энтеральное питание через 3 года после операции, как правило, имели сохраненную половину 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 средняя длина тонкой кишки после удлинения в этих группах достоверно не отличалась и составила от 76 до 86 см.

Для того, чтобы оценить статус нутритивной поддержки (потребность в парентеральном питании) у пациентов с учётом фактора времени, был проведён анализ по Каплан-Майеру. При удлинении тонкой кишки более чем на 20 см при по-

мощи операции LILT потребность в парентеральном питании пропала 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 пациентов нуждалось на парентеральном питании, которые через год после операции не показывали положительной динамики (Рисунок 7).

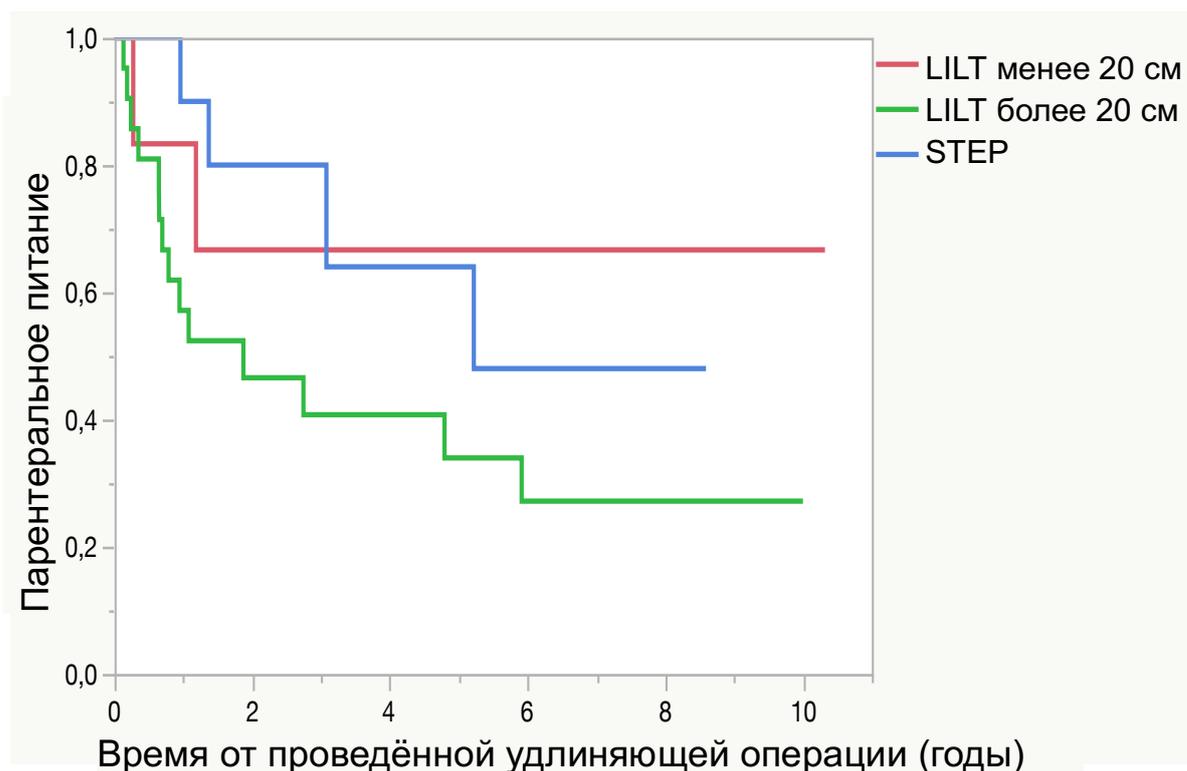


Рисунок 7 – Отказ от парентерального питания у пациентов, прооперированных по методике LILT и методике STEP. Анализ по Каплан-Майеру.

При сохранении менее трети толстой кишки, 90% пациентов нуждались в парентеральном питании в течение 6 лет после развития СКК. Через 15 лет парентеральное питание было необходимо 60% таких пациентов. Больные, у которых присутствовало 50% и более толстой кишки, показали сходные результаты с пациентами, у которых присутствовала вся толстая кишка: через 6 лет лишь 40% пациентов 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 8).

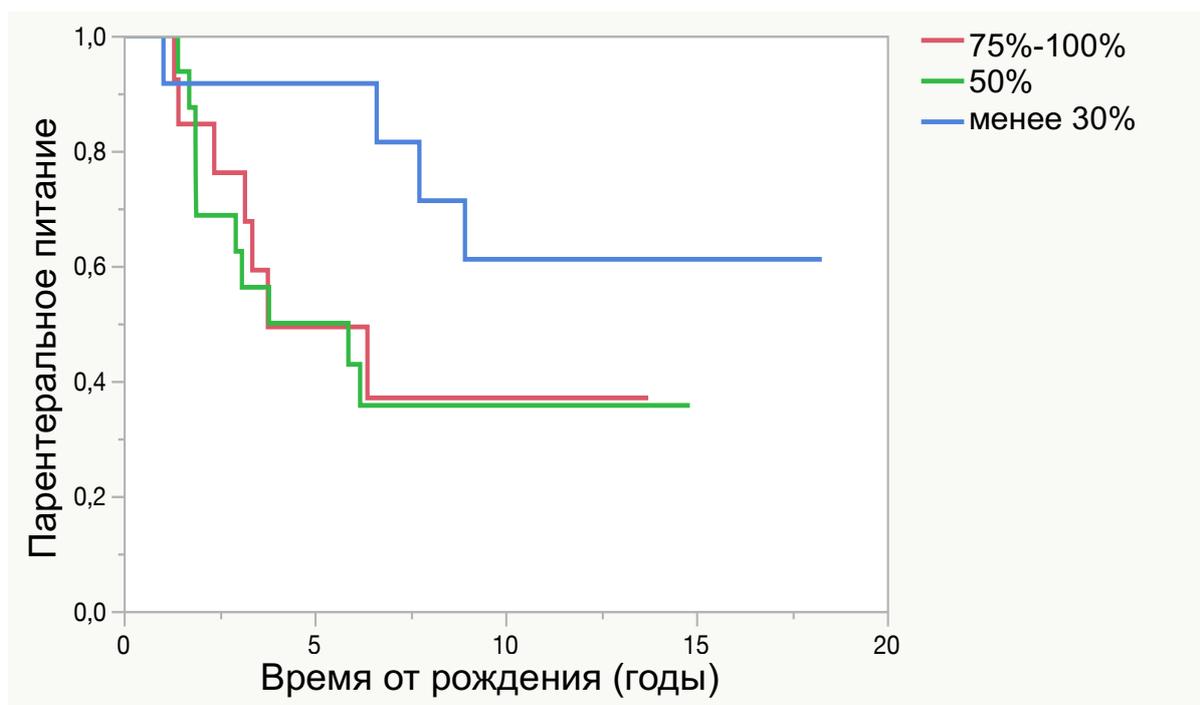


Рисунок 8 – Отказ от парентерального питания в зависимости от наличия толстой кишки у пациентов с СКК у которых проводились удлиняющие кишечник операции. Анализ по Каплан-Майеру.

Редилатация тонкой кишки при СКК возникала в два раза чаще после операции STEP, чем после операции LILT у пациентов, у которых первичным диагнозом был гастрошизис. При редилатации тонкой кишки переход на энтеральное питание происходил на 6-7 лет позже при сравнении с пациентами без данного осложнения.

Нами проанализировано влияние длины тонкой кишки после проведения, удлиняющей кишечник операций на статус нутритивной поддержки пациентов.

Как было выше показано на восстановление энтерального питания у пациента с СКК оказывают влияние многие факторы. Для того, чтобы данные факторы не влияли на результаты исследования из 42 пациентов, обследованных в отдалённом периоде мы выбрали 21, которым были проведены удлиняющие кишечник операции в возрасте до 3-х лет, у которых имелось 50% и более толстой кишки и не развивалась редилатация тонкой кишки.

Было выявлено, что через 18 месяцев после удлинения тонкой кишки до $75,9 \pm 26,87$ см выполненной пациентам в возрасте до 3-х лет вероятность восстановить полное энтеральное питание статистически достоверно выше ($p=0,0049$), по сравнению с пациентами, кому удалось увеличить длину тонкой кишки лишь до

47,4±17,53 см при условии наличия у пациентов более половины толстой кишки и отсутствия редилатации тонкой кишки..

Проведенный нами анализ отдаленных результатов лечения выявил, что после удлиняющих кишечник операций у 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.

Культивирование межмышечного нервного сплетения в трёхмерном матриксе как ключевого элемента для тканевой инженерии тонкой кишки (экспериментальный раздел)

Тканевая инженерия кишечника может стать новым методом лечения пациентов с СКК. Оптимально подобранная матрица и органоспецифические клетки самого пациента обеспечат в будущем персонализированный подход в хирургии (Кокорина А.А., 2018; Косулин А.В., 2018; Wales P.W., 2013; Martin L.Y., 2018). В связи с этим, второй экспериментальной частью данной работы явилась разработка метода культивирования клеток нервной системы кишечника (нервного сплетения кишечника) и иннервированного мышечного слоя тонкой кишки в трёхмерном матриксе *in vitro*, способного к сокращениям, тем самым обосновывая теоретические и практические предпосылки для разработки новых методик тканевой инженерии тонкой кишки.

Разработка метода выращивания клеток нервной системы кишечника, образующих нервные сплетения в трехмерной среде проводилась в рамках разработки методики тканевой инженерии тонкой кишки, как принципиально нового подхода к лечению пациентов с СКК и хронической кишечной недостаточностью. Для решения поставленной задачи в трёхмерном матриксе на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA) нами выращивались клетки межмышечных нервных сплетений, выделенные из крыс рода Sprague–Dawley по

методике, разработанной Schäfer К.Н. с соавторами (Schäfer et al., 1997). Внутри 100 мкл HyStem®-C матрикса помещали 100 000 клеток. Культуру клеток выращивали в течение 10-21 суток при температуре 37°C и 5% концентрации CO₂ в специально разработанной культуральной среде с добавлением факторов роста и антибиотиков в 100 мл Neurobasal medium добавляли 1 мл альбумина, 100 мкл раствора метронидазола (5мг/1мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глутамина и 100 мкл меркаптоэтанола, 2 мл B27 Supplement, 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.

При микрокопировании культур клеток нервной системы кишечника, окрашенных антителом β Tubulin III (для визуализации нейронов) и DRAQ5 (для определения ядер), были обнаружены как маленькие, так и большие скопления нейронов, все нейроны были объединены между собой отростками. Была проведена трёхмерная реконструкция большого скопления нейронов, связанных между собой и формировавших нервное сплетение размером 200 μ m на 250 μ m на 50 μ m (Рисунок 9).

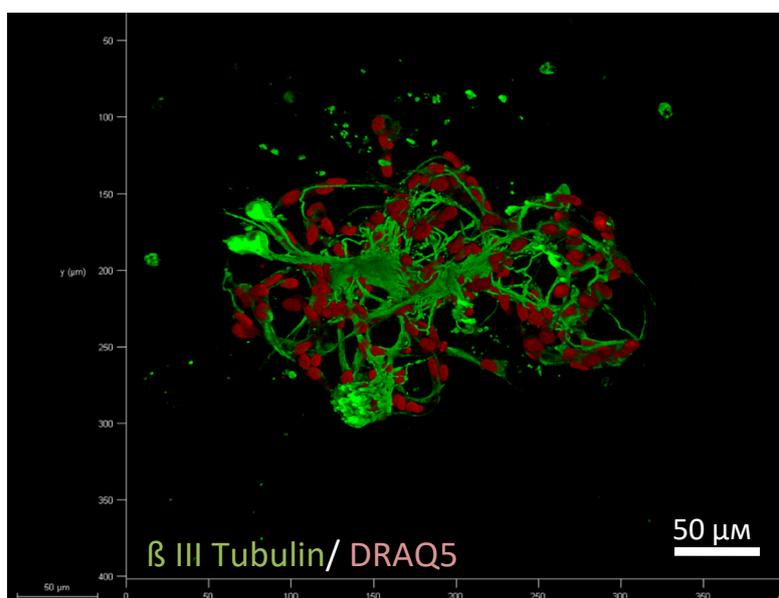


Рисунок 9 - Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-C матриксе. Трёхмерная реконструкция большого скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) - ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

Таким образом, разработанный нами метод, позволяет вырастить клетки нервной системы кишечника, связанные друг с другом в трёхмерной среде и формирующие нервные сплетения, что является важнейшим элементом для создания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки путем тканевой инженерии.

Культивирование иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям для применения в тканевой инженерии кишечника (экспериментальный раздел)

Задачей данного раздела работы являлась разработка метода выращивания иннервированного мышечного слоя тонкой кишки, способного к сокращениям, и выявление взаимосвязей между нервной системой и гладкомышечными клетками.

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

Нами были изучены различные типы взаимного расположения мышечных клеток и клеток энтеральной нервной системы в матриксе. В результате нам удалось выявить оптимальный тип расположения клеток, когда нервные клетки располагались компактно в среднем слое матрикса, а мышечные клетки – в верхнем и нижнем слоях. При таком расположении клеток мышечные и нервные клетки быстро дифференцировались и образовывали связи друг с другом.

Полученная нами культура мышечных клеток и нейронов, обладала очень важным свойством - сократительной активностью всего мышечного волокна. С двенадцатого дня выращивания культур мы наблюдали сократительную активность мышечных пучков, которая возникала спонтанно и длилась весь период микроскопирования, который занимал по длительности до 5 минут (Рисунок 10). Таким обра-

зом, нами впервые была создана мышечная ткань кишечника – мышечные волокна, способные к сокращениям. Сократительная способность мышечной ткани играет важнейшую роль и является одним из ключевых фактором в создании искусственной тонкой кишки.

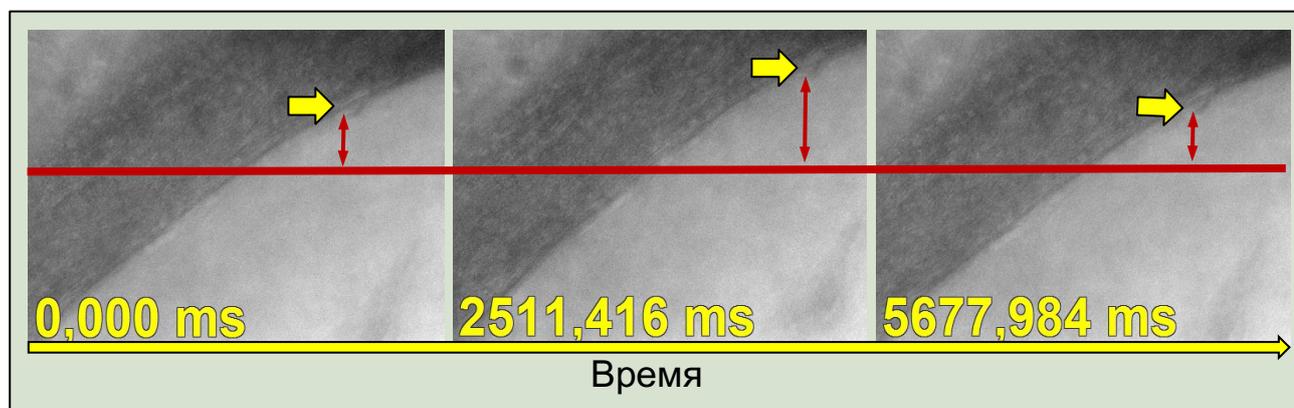


Рисунок 10 - Сокращение искусственно выращенных мышечных пучков тонкой кишки, показанное на временной ленте (в режиме реального времени). Жёлтая стрелка показывает участок на мышечном пучке, который из-за сокращения меняет свое положение. ms – микросекунды (1 секунда=1000 микросекунд). Световая микроскопия.

Просвечивающая электронная микроскопия показала, что выращенные в данном эксперименте мышечные волокна, имели сходное гистологическое 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 (Рисунок 11).

Для того, чтобы изучить взаимодействие мышечных клеток и энтеральных нейронов в клеточных культурах, было проведено флюоресцентное иммуногистохимическое исследование фиксированной культуры клеток, выращенной в трёхмерном матриксе. При этом 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.

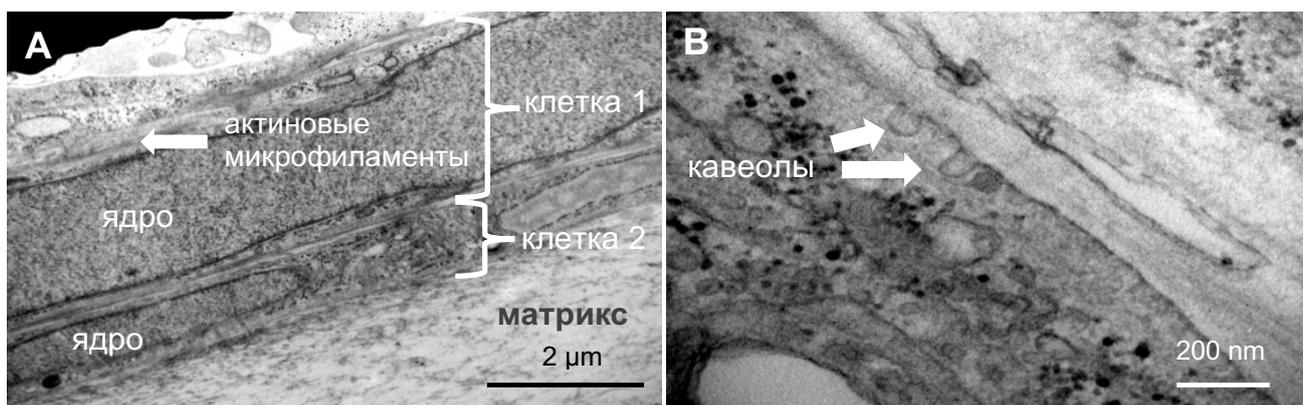


Рисунок 11 - Мышечные волокна, полученные при выращивании гладкомышечных клеток совместно с клетками нервной системы кишечника в трёхмерном матриксе. А – две мышечные клетки, находящиеся в тесном контакте в толще трёхмерного матрикса. Клетки имеют свойственные мышечным клеткам большие ядра, вытянутую форму и актиновые микрофиламенты. В – плазматическая мембрана мышечной клетки, стрелками обозначены кавеолы. Просвечивающая электронная микроскопия.

Основной задачей следующего этапа исследования явилось установление основных механизмов, с помощью которых энтеральные нейроны влияют на пролиферацию мышечных клеток при их совместном выращивании. Нами было показано, что мышечные клетки, культивируемые без нейронов в трехмерной среде, сохраняли свою круглую форму и не росли. В случае паракринного взаимодействия между мышечными клетками и клетками нервной системы кишечника, мы наблюдали умеренную пролиферацию мышечных клеток и формирование мышечных пучков. Интересно, что в мышечных пучках нами были обнаружены нейроны, которые, как мы считаем, пролиферировали из стволовых клеток в культуре мышечных клеток под влиянием паракринных факторов нервной системы кишечника. Культивирование клеток гладких мышц в непосредственном контакте с нейронами привело к формированию большого количества мышечных пучков. Помимо мышечных клеток, мышечные пучки состояли из множества нейронов, которые были расположены в виде групп клеток, а также отдельных клеток, связанных длинными отростками. Наблюдалось тесное взаимодействие нейронов с мышечными клетками (Рисунок 12).

Трёхмерная реконструкция мышечных пучков, микроскопированных при помощи конфокальной микроскопии, показала, что нейроны, расположенные в мы-

шечных пучках, не только тесно контактируют с мышечными клетками, но также образуют трёхмерную нейронную сеть внутри мышечных слоев. Наши наблюдения позволяют утверждать, что нейроны формируют остов для мышечных клеток, стимулируют их рост и дифференцировку, а также обеспечивают согласованный ответ в виде сокращения, что имеет решающее значение для создания мышечных слоев способных к созданию перистальтических сокращений (Рисунок 13).

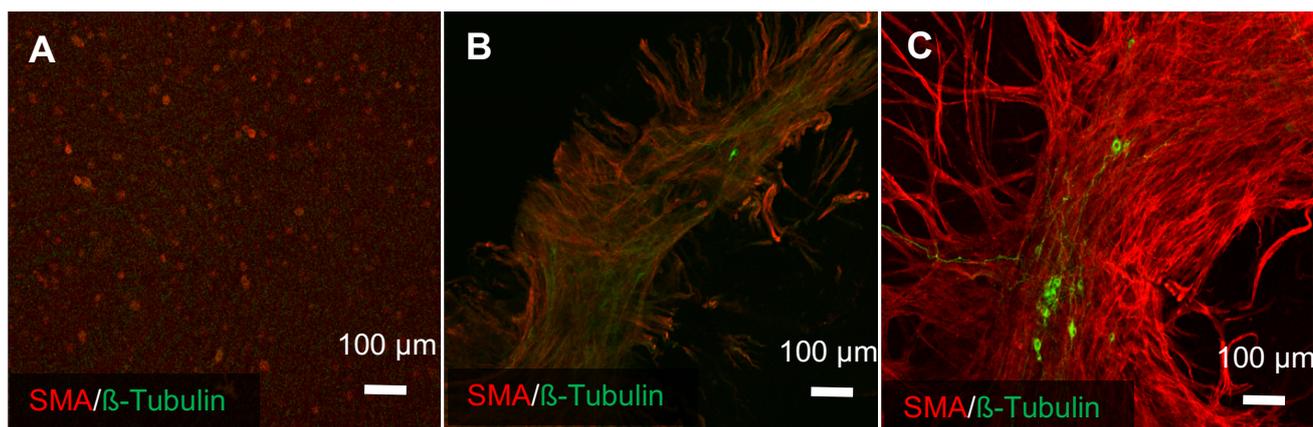


Рисунок 12 - Культура мышечных и нервных клеток, выращенных в трёхмерном матриксе, возраст три недели. А – только гладкомышечные клетки без клеток ENS, В-паракринное взаимодействие между гладкомышечными клетками и клетками ENS, С – непосредственный контакт между гладкомышечными клетками и клетками ENS. Зеленые (β -тубулин III) – нейроны, красные (smooth muscle actin (SMA)) – мышечные клетки. Конфокальная микроскопия.

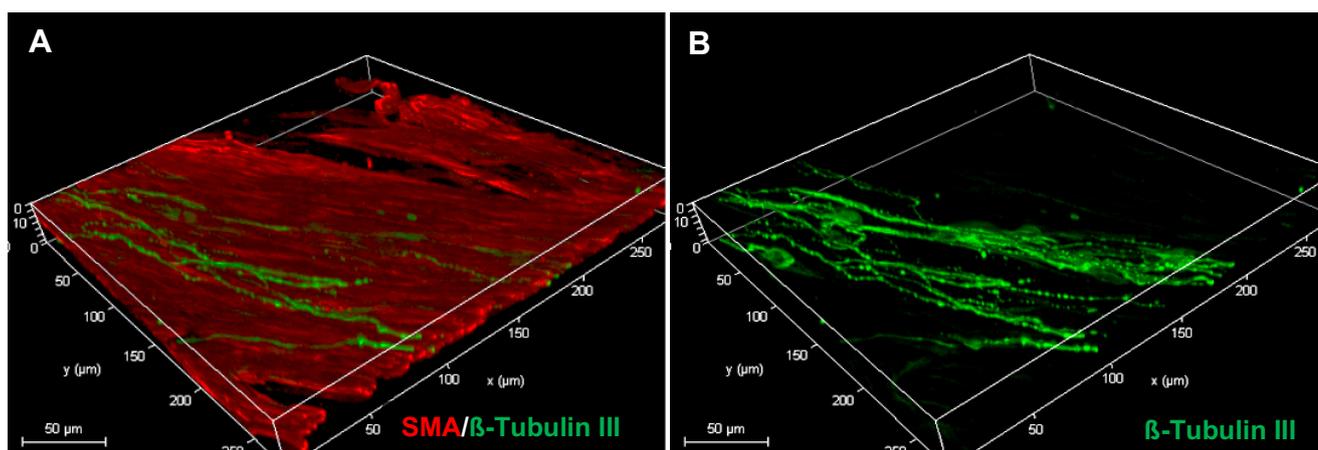


Рисунок 13 – Выращенные при помощи тканевой инженерии иннервированные мышечные пучки (мышечная ткань) тонкой кишки. А- трёхмерная реконструкция мышечных пучков и нейронной сети при помощи конфокальной микроскопии. В - трёхмерная реконструкция нейронной сети, без визуализации мышечных клеток при помощи 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 матриксе делает возможным создание искусственного иннервированного мышечного слоя, способного к сокращениям. 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, что имеет решающее значение для функционального взаимодействия между гладкими мышцами и нервными клетками кишечника, и для создания 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. Разработкой методов культивирования межмышечного нервного сплетения и создания иннервируемого мышечного слоя тонкой кишки мы вносим вклад в разработку биоинженерной тонкой кишки. Мы решаем одну из ключевых задач – получение иннервированной, способной к перистальтике гладкомышечной ткани, которая будет основой биоинженерной тонкой кишки – нового метода лечения СКК для той группы пациентов, у которой 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. 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.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хасанов, Р.Р. Синдром короткой кишки у детей: этиология, эпидемиология, терапия / Р.Р. Хасанов, К. Хагль, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 3. – С. 4-8.
2. Хасанов, Р.Р. Обзор хирургических методов лечения синдрома короткой кишки / Р.Р. Хасанов, К. Хагль, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 3. – С. 9-12.
3. Федеральные клинические рекомендации «Лечение детей с синдромом короткой кишки» / Ю.В. Аверьянова, Л. Вессель, Ю.В. Ерпулёва, В.В. Николаев, А.Э. Степанов, А.И. Чубарова, В.В. Щукин, Р.Р. Хасанов // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 4. – С. 92-108.
4. Enteric nervous stem cells in the short bowel syndrome / R.R. Khasanov, S. Heumüller-Klug, E. Wink [et al.] // Langenbeck's Archives of Surgery. - 2014. – Bd. 399: 18th Annual Meeting on Surgical Research. – S. 897–966.
5. Клинический опыт ведения ребенка с синдромом короткой кишки / А.К. Коновалов, Л.М. Вессель, Ю.В. Ерпулёва, Р.Р. Хасанов, А.К. Федоров // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2014. – Т. 4, № 4. – С. 86-91.
6. Методики аутогенной хирургической реконструкции тонкой кишки при синдроме короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, К.И. Хагль, Л.М. Вессель // Пермский медицинский журнал. – 2015. – Т. XXXII, № 4. - С. 104-115.
7. Хасанов, Р.Р. Когда стоит проводить удлиняющие операции при синдроме короткой кишки? / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 5, Спец. выпуск : Материалы съезда детских хирургов России. – С. 155.
8. Хасанов, Р.Р. Современные технологии хирургического лечения детей с синдромом короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2015. – Т. 5, Спец. выпуск : Материалы съезда детских хирургов России. – С. 155-156.
9. Современный взгляд на синдром короткой кишки у детей / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, К.И. Хагль, Л.М. Вессель // Детская хирургия. – 2016. - № 1. - С. 40-45.
10. Синдром короткой кишки у детей. Клинические рекомендации / Ю.В. Аверьянова, Л. Вессель, Ю.В. Ерпулёва, В.В. Николаев, И.В. Поддубный, А.Э. Степанов, А.И. Чубарова, В.В. Щукин, Р.Р. Хасанов. – М., 2016.
11. The Surgical Treatment of Toxic Megacolon in Hirschsprung Disease / R. Khasanov, T. Schaible, L.M. Wessel, C.I. Hagl // *Pediatr. Emerg. Care.* - 2016. – Vol. 32, № 11. – P. 785-788.
12. Wessel, L.M. Longitudinal Intestinal Lengthening / L.M. Wessel, R. Khasanov // *Current Concepts of Intestinal Failure* / R. Rintala, M. Pakarinen, T. Wester (eds). - Springer, Cham 2016. – P. 113-122.
13. 3D cultivation of enteric nervous system and smooth muscle cells as a first step towards an innervated artificial gut wall / R.R. Khasanov, S. Heumüller-Klug, E. Wink [et al.] // *Neurogastroenterology Motility.* – 2016. – Vol. 28, Special Issue: FNM 2016 2nd Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting. – P. 52-52.
14. Co-Cultivation of Enteric Nervous System Together with Smooth Muscle Cells in Three-Dimensional Scaffold / R. Khasanov, S. Heumüller-Klug, E. Wink [et al.] // *Eur. Surg. Res.* –

2016. – Issue: 20th Surgical Research Days, Section of Surgical Research of the German Society of Surgery, September 8-10, 2016, Magdeburg, Germany. – P. 263-335.

15. Хасанов, Р.Р. Роль длины тонкой кишки в развитии синдрома короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Хирургия. – 2017. - № 1. - С. 63-67.

16. Хасанов, Р.Р. Причины развития синдрома короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 8.

17. Хасанов, Р.Р. Особенности развития синдрома короткой кишки у детей / Р.Р. Хасанов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12, № 4. - С. 87-90.

18. Хасанов, Р.Р. Удлиняющие кишечник операции при синдроме короткой кишки у детей / Р.Р. Хасанов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12, № 4. - С. 137-140.

19. Khasanov, R. Role of environmental factors in constructing of functional enteric nervous system for tissue engineering / R. Khasanov, L.M. Wessel, K.H. Schaefer // Materials of 5th International Symposium on Development of the Enteric Nervous System: Cells, Signals, Genes and Therapy, 8-11 April 2018, Boston, USA. - Boston, 2018. - P. 92.

20. Хасанов, Р.Р. Синдром короткой кишки и хроническая кишечная недостаточность у детей / Р.Р. Хасанов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2018. – Т. 13, № 2. - С. 86-90.

21. Khasanov, R.R. Role of enteric nervous system in tissue engineering of functional muscle layer of the gut in treatment of short bowel syndrome / R.R. Khasanov, L.M. Wessel, K.H. Schäfer // Neurogastroenterology Motility. - 2018. – Vol. 30, Special Issue: FNM 2018 3rd Meeting of the Federation of Neurogastroenterology and Motility. – P. 169-169.

22. Хасанов, Р.Р. Конференция «Развитие энтеральной нервной системы: клетки, сигналы, гены, терапия» Бостон (США), 8-11 апреля 2018 года / Р.Р. Хасанов // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2018. – Т. 8, № 2. – С. 101-103.

23. Потенциал методов лучевой диагностики при синдроме короткой кишки у детей / Р.Р. Хасанов, М. Вайс, Р.А. Гумеров [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 17-36.

24. Хасанов, Р.Р. Хирургическое лечение детей с синдромом короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 9, Спец. выпуск: Материалы V форума детских хирургов России. – С. 188.

25. Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника пригодной для тканевой инженерии кишечника / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, К.Х. Шефер, Л.М. Вессель // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63, № 2. – С. 132-141.

26. Морфологические изменения мышечных слоёв тонкой кишки при синдроме короткой кишки в эксперименте / Р.Р. Хасанов, Д. Свобода, М. Коль [и др.] // Детская хирургия. – 2019. – Т. 23, № 4. - С. 176-180.

27. Хасанов, Р.Р. Социально-экономические аспекты лечения детей с синдромом короткой кишки / Р.Р. Хасанов, А.А. Гумеров, Л.М. Вессель // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 9, № 4. – С. 27-34.

28. Intercommunication between smooth muscle cells and enteric nervous system cells in tissue engineering of functional muscle layers/ R. Khasanov, L. M. Wessel, K. H. Schäfer // Neurogastroenterology Motility. - 2020. – Vol. 32, Special Issue: FNM 2020 - 4th Meeting of the Federation of Neurogastroenterology and Motility. – P. 126.

Хасанов Расуль Ринатович

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук