

© ТРОФИМОВИЧ Ю. Г., ЧЕРДАНЦЕВ Д. В., БОЛЬШАКОВ И. Н., ШЕСТАКОВА Л. А., КОТИКОВ А. Р., КОЗЛОВ В. В.
УДК 617.55-089.81.843:615.462:547.995.12

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

Ю. Г. Трофимович, Д. В. Черданцев, И. Н. Большаков, Л. А. Шестакова, А. Р. Котиков, В. В. Козлов
ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения РФ, ректор — д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра и клиника хирургических
болезней им. проф. А. М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО, зав. — д. м. н., проф. Д. В. Черданцев.

Резюме. В работе представлены результаты исследования реакции тканей передней брюшной стенки на имплантацию природного и синтетического полимерного материала. Достоверно установлено, что при имплантации полипропиленового сетчатого эндопротеза, в сочетании с полимерным раневым покрытием на основе коллаген-хитозанового комплекса, отмечается более благоприятное течение раневого процесса.

Ключевые слова: лапаростомия, полипропиленовый сетчатый эндопротез, коллаген-хитозановый комплекс.

Современный этап развития хирургии характеризуется расширением показаний для выполнения хирургических вмешательств, увеличением сложности операций, использованием многоэтапных хирургических вмешательств [1, 2, 8, 9]. Многократные хирургические вмешательства на органах брюшной полости используются, в частности, для лечения распространенного гнойного перитонита [3, 4, 10]. Повреждение тканей передней брюшной стенки в процессе выполнения многократных доступов в брюшную полость приводит к формированию послеоперационных вентральных грыж, снижает качество жизни пациентов. Одно из перспективных направлений восстановительной хирургии — изучение возможности применения новых синтетических материалов в реконструкции передней брюшной стенки [5, 6, 7]. Представляет интерес исследование возможности совместного использования синтетических и природных полимеров.

Целью настоящего исследования явилось изучение реакции тканей передней брюшной стенки на имплантацию природного полимера на основе коллаген-хитозана (КХК) и полипропиленового сетчатого эндопротеза (ПСЭ).

Материалы и методы

Исследование выполнено на 90 белых крысах линии Vistar, массой 200-250 граммов, одного возраста и пола (самцы), с соблюдением всех международных норм и правил обращения с подопытными животными. Все животные разделены на 3 группы. В 1-ю группу вошли 30 крыс, которым в ткани передней брюшной стенки в предбрюшинную позицию была имплантирована полипропиленовая сетка: производитель ООО «Линтекс», торговое название ЭСФИЛ стандартный, г. Санкт-Петербург (диаметр мононити 0,12 мм, толщина 0,4-0,6 мм, поверхностная плотность 65-80 г/м, объёмная пористость 80-85%); во 2-ю группу — 30 крыс, которым в аналогичную позицию установлена коллаген-хитозановая пластина: производитель ООО «КОЛЛАХИТ», торговое название «КОЛЛАХИТ-БОЛ», Россия г. Железногорск (раневое покрытие содержит: коллаген — не более 78,02%; хитозан — не менее 8,82%; аскорбиновая кислота — не более 10,58%; хондроитин сульфат — не более 0,09%; гиалуронат натрия — не более 0,44%; гепарин натрия — не более 0,11%; сывороточный фактор роста — не более 0,007%; глутаровый альдегид — не более 1,5%; твин-80 — не более

0,0007%; вода очищенная); животным 3-й группы выполнена одновременная имплантация полипропиленового и коллаген-хитозанового комплекса. Размеры имплантируемого фрагмента полимера составляли 1x1 см. При одновременной имплантации ПСЭ и КХК, к брюшине располагалась коллаген-хитозановая пластина, а к мышцам — полипропиленовая. Из каждой группы подопытные животные (в количестве шести) выводились из эксперимента поочередно в определённые временные периоды: на 3-и, 7-е, 10-е, 28-е и 90-е сутки. Проводилось макроскопическое описание тканей передней брюшной стенки в месте имплантации, выявление осложнений хирургического вмешательства.

Исследование материала забранного при некропии проводилось гистологическим и иммуногистохимическим (ИГХ) методами. Макропрепараты и парафиновые срезы окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, орсеином на выявление эластических волокон. Микроскопическое исследование проводилось: с применением светового микроскопа Axiostar plus Karl Zeiss (Германия); с микроморфометрическим анализом клеточных популяций вокруг сосудов микроциркуляторного русла (МЦР). Для оценки характера репаративного процесса тканей брюшной стенки использовались морфометрические критерии, которые позволяют судить о характере изменчивости основных компонентов соединительной ткани: численная плотность фибробластов ($N_{\text{вф}}$); численная плотность сосудов микроциркуляторного русла ($N_{\text{вс}}$); объёмная плотность эластических волокон ($V_{\text{вэб}}$). Для проведения ИГХ анализа использовали первичные моно- и поликлональные антитела: Ki 67 (Clone SP6), CD34 (Antibody Endothelial Cell Marker (Clone QBEnd/10)), F8 (Anti-Human von Willebrand factor (Clone 36B11)), Anti-Collagen III (Clone HWD1.1), Anti-Collagen IV (Clone CIV22) («SPRING BIOSCIENCE» США) по соответствующему протоколу. Каждое ИГХ исследование проводилось с постановкой положительного и отрицательного контроля для исключения ложнонегативных и ложнопозитивных результатов.

Статистическая обработка полученных данных выполнялась методами вариационной статистики с использованием пакета статистических программ «Excel 2007» приложения «Microsoft office for Windows» и при помо-

щи программы «SPSS, версии 19.0». Описательная статистика для качественных признаков представлена в виде процентных долей и их стандартных ошибок, для количественных – в виде средних арифметических (M) и стандартных отклонений средних (σ), медиан (Me) и перцентилей (P_{25} , P_{75}). Нормальность распределения признаков в группах проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилкса. Статистическая значимость различий при исследовании качественных показателей использовался классический критерий χ^2 по Пирсону, для количественных показателей – непараметрический критерий Краскела-Уоллеса. При наличии статистически подтвержденных различий между исследуемыми группами, проводили тестирование групп попарно по критерию Манна-Уитни. Различия во всех случаях оценивали, как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении некропсии было выявлено, что у животных 2-й группы имплантат полностью деградировал на 10-е сутки эксперимента. За весь период исследования не было зафиксировано осложнений, связанных с хирургическим пособием ($p < 0,001$ относительно 1-й группы).

В 1-й группе прорезывание швов и отторжения имплантата произошло у 17 животных из 30 (56,7±9,0%), что является статистически достоверным по сравнению со 2-й и 3-й исследуемой группой ($p < 0,001$). У 13 крыс (43,3±9,0%) отторжения имплантата зафиксировано не было, 12 из них были выведены из эксперимента на 3-е и 7-е сутки. Воспаление в области послеоперационного шва и расхождение краёв послеоперационной раны выявлено в 23 случаях (76,7±7,7%), воспаление прилегающих тканей в области имплантата в 29 случаях (96,7±3,3%) из 30. Различия статистически значимые в сравнении со 2-й и 3-й группой ($p < 0,001$).

В 3-й группе (КХК + ПСЭ) случаев отторжения имплантата и возникновения других осложнений не зафиксировано ($p < 0,001$ относительно 1-й группы). При некропсии наблюдалось прорастание имплантата соединительной тканью.

Таблица 1

Результаты морфометрического исследования у животных 1-3-й групп

Сутки эксперимента	Показатель	n	№ группы, M±σ		
			1	2	3
3	$N_{\text{вф}}$	6	6,8±1,2	7,7±1,03	19,3±1,4
	$N_{\text{вс}}$	6	17,5±1,4	19,0±2,4	25,2±1,6
	$V_{\text{взв}}$	6	1,8±0,8	3,2±1,2	5,7±1,4
7	$N_{\text{вф}}$	6	5,8±1,2*	6,5±1,1*	11,2±1,7
	$N_{\text{вс}}$	6	8,2±2,0	21,8±1,7	28,7±1,8
	$V_{\text{взв}}$	6	7,2±1,2	7,7±1,03	11,3±1,03
10	$N_{\text{вф}}$	6	6,7±1,0*	5,8±1,2	9,5±2,1
	$N_{\text{вс}}$	6	20,0±1,4	18,7±1,97*	21,2±1,2
	$V_{\text{взв}}$	6	8,7±1,0	10,2±1,2	19,3±1,5
28	$N_{\text{вф}}$	6	12,5±1,4	10,7±1,03	9,3±1,5
	$N_{\text{вс}}$	6	8,7±1,0	6,7±1,03	10,8±1,2
	$V_{\text{взв}}$	6	15,8±1,2	14,0±1,4	27,3±1,5
90	$N_{\text{вф}}$	6	9,2±1,2	3,7±1,03	7,0±1,4
	$N_{\text{вс}}$	6	4,2±1,2	3,0±1,7	4,3±1,03
	$V_{\text{взв}}$	6	18,8±1,6	15,8±1,3	36,8±1,7

Примечание: показатели статистически значимы по Манна-Уитни в сравнении с 3-и сутками внутри исследуемой группы $p < 0,005$; * – статистически незначимые отличия.

Анализ результатов морфометрического исследования показал, что миграцию тех или иных клеток во многом определяют особенности структуры антигена (имплантата).

Отмечено, что у животных 2-й группы на 3-и сутки в области имплантации КХК происходила миграция нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов/макрофагов ($N_{\text{вф}} = 7,7 \pm 1,03$), что явилось важной предпосылкой для развития грануляций. Пик миграции нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов совпадает с началом деградации КХК на 3-е сутки после операции, что соответствует периоду формирования зоны демаркации, появлению признаков краевой эпителизации: пролиферация фибробластов, появление коллагеновых волокон 3-го и 4-го типа. На 7-е сутки происходило образование грануляционной ткани, а также появление коллагеновых волокон 1-го типа и эластических волокон ($V_{\text{взв}} = 7,7 \pm 1,03$), фиксировалось статистически значимое их увеличение на более поздних сутках эксперимента ($p = 0,02$). Клеточный компонент был представлен в виде малочисленных макрофагов, пролиферирующих фибробластов, единичных лимфоцитов. На 10-е сутки эксперимента обнаруживалась полная деградация полимера и появление молодой соединительной ткани на всей площади в месте установки имплантата. Соединительная ткань характеризовалась увеличением удельной доли волокнистого (эластические и коллагеновые волокна) и сосудистого компонента. Клеточный компонент был представлен в основном фибробластами, малочисленными макрофагами и лимфоцитами (табл. 1), (рис. 1).

В 1-й группе ПСЭ индуцировал мобилизацию лимфоцитов (преимущественно Т-клеток) и в меньшей степени макрофагов. Основная их роль – участие в местном иммунном ответе на введение антигена (очаг воспаления, имплантат и др.). Пик миграции Т-клеток совпадал со сроками отторжением эндопротеза. В материале, забранном на 3-е сутки, происходит выраженная капилляризация ($N_{\text{вс}} = 17,5 \pm 1,4$) в сравнении с 7-и, 10-и, 28-и и 90-и сутками эксперимента ($p < 0,05$). Миграция фибробластов ($N_{\text{вф}} = 6,8 \pm 1,2$) с образованием коллагеновых волокон 3-го типа происходит медленно. На 90-е сутки эксперимента было установлено, что заживление раны произошло с формированием грубоволокнистой соединительной ткани, содержащей большое количество коллагеновых волокон и сосудов микроциркуляторного русла ($N_{\text{вс}} = 4,2 \pm 1,2$), а также значительное число фибробластов ($N_{\text{вф}} = 9,2 \pm 1,2$) с выраженной синтетической активностью ($p < 0,01$ в сравнении с 3-ми сутками эксперимента) (рис. 2), (табл. 1).

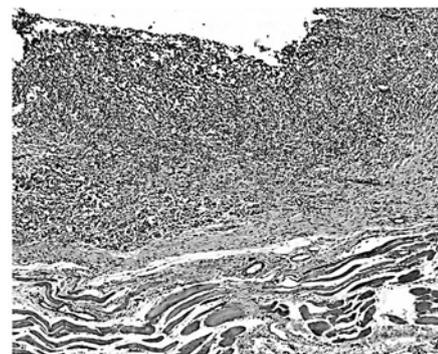


Рис. 1. Раневая поверхность с КХК, 10-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, х100.

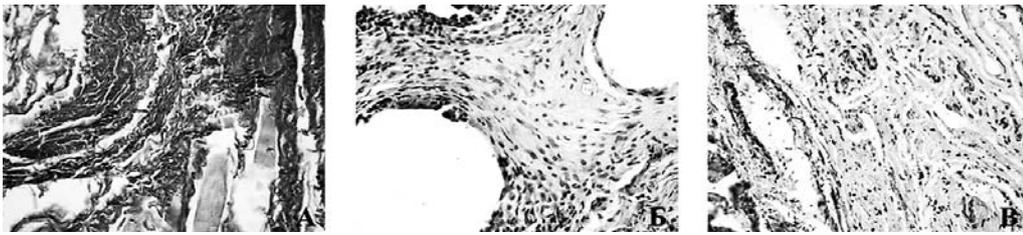


Рис. 2. Раневая поверхность с ПСЭ, 90-е сутки эксперимента: А – окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, Б – окраска гематоксилином и эозином, В – окраска орсеином на выявление эластических волокон.

В 3-й группе на 3-е сутки эксперимента происходит индуцированная коллаген-хитозаном миграция ПЯЛ и макрофагов в ПСЭ и КХК. Активные макрофаги (гематогенные моноциты) прикрепляются к внеклеточному матриксу, трансформируются в воспалительные и репаративные клетки, стимулируют заживление и создают условия для неоваскуляризации. Параллельно с активацией макрофагов, синтезирующих коллаген 1-го типа, активировались фибробласты ($N_{\text{вф}} = 19,3 \pm 1,4$), синтезирующие коллаген 3-го типа, эластические волокна ($V_{\text{вэв}} = 5,7 \pm 1,4$), протеогликаны. Появлялась широкая зона молодой соединительной ткани с большим количеством сосудов микроциркуляции ($N_{\text{вс}} = 25,1 \pm 1,6$), формировался временный матрикс (табл. 1).

На 7-е сутки у животных 3-й группы происходила частичная деградация КХК, уменьшение числа коллагеновых волокон 3-го типа с созреванием их в зрелые коллагеновые волокна. С 7-х суток и до окончания эксперимента, зафиксировано статистически значимое снижение $N_{\text{вф}}$ в сравнении с 3-и сутками наблюдения ($p = 0,002$) (табл. 1). Удовлетворительная фагоцитарная активность фибробластов, сопровождаемая адекватной репарацией, на 10-е сутки наблюдения способствовала образованию зрелой соединительной ткани, содержащей зрелые коллагеновые и эластические волокна ($V_{\text{вэв}} = 19,33 \pm 1,5$). Клеточный компонент был представлен в основном фибробластами ($N_{\text{вф}} = 9,5 \pm 2,07$), малочисленными макрофагами и лимфоцитами (табл. 1). В основе этого процесса лежит сбалансированная деградация коллагена, которая предотвращает образование грубой соединительной ткани. На 90-е сутки эксперимента происходила полная эпителизация раны за счёт коллагеновых волокон 1-го типа и эластических волокон ($V_{\text{вэв}} = 36,8 \pm 1,7$, $p = 0,002$) (рис. 3).

При сравнении морфометрических параметров у животных 1-й и 2-й группы, было выявлено, что на 7-е сутки происходило статистически значимое увеличение $N_{\text{вс}}$ у животных 2-й группы в сравнении с 1-й группой ($p = 0,002$), а на 28-е сутки у животных 1-й группы в сравнении со 2-й ($p = 0,015$). Во 2-й группе с 1-х суток наблюдения начинается активный синтез незрелой соединительной ткани с большим количеством

эластических волокон и сосудов микроциркуляции, но по мере деградации имплантата он замедляется. С 28-х по 90-е сутки наблюдения зафиксировано, что $N_{\text{вф}}$ и $V_{\text{вэв}}$ у животных 1-й группы существенно выше показателей 2-й группы, $p_{90} = 0,002$ и $p_{90} = 0,009$ соответственно (табл. 1).

Сравнивая морфометрические параметры 3-й группы животных с показателями 1-й и 2-й групп, выявлены статистически значимые их отличия на протяжении всего эксперимента ($p < 0,05$), за исключением: показателя $N_{\text{вф}}$ на 28-х сутках – нет статистически значимого отличия в сравнении с показателем 2-й группы ($p = 0,132$), и показателя $N_{\text{вс}}$ на 10-х и 90-х сутках в сравнении с показателем 1-й группы ($p > 0,05$). Таким образом, у животных 3-й группы высокая фагоцитарная активность фибробластов сопровождается адекватной репарацией с наиболее быстрым образованием зрелой соединительной ткани. Причём качественный состав её отличается от показателей в 1-й и 2-й группах, за счет наличия высокой $V_{\text{вэв}}$, а также сбалансированной деградации коллагена, которая предотвращает образование выраженного фиброза и разрастание грубого соединительнотканного рубца.

Таким образом, имплантация полипропиленового сетчатого эндопротеза в предбрюшинную позицию сопровождается выраженной воспалительной реакцией тканей передней брюшной стенки, обусловленной миграцией в зону воспаления Т-лимфоцитов. Активная местная воспалительная реакция становится причиной отторжения имплантата более чем в 50% случаев. На этапе регенерации происходит формирование грубоволокнистой соединительной ткани, состоящей, в основном, из коллагеновых волокон 1-го типа. Реакция тканей на коллаген-хитозановую пластину в фазу воспаления характеризуется миграцией в область установки пластины нейтрофильных гранулоцитов, фибробластов и макрофагов, стимуляцией неангиогенеза. На 10-е сутки происходит полная деградация полимера с образованием зрелой соединительной ткани, состоящей преимущественно из коллагена 3-го типа и эластических волокон. Такой вариант течения раневого процесса обусловлен, вероятно, сбалансированной деградацией коллагена, входящего в состав пластины, что предотвращает формирование незрелой соединительной ткани. Совместная имплантация сетчатого полипропиленового эндопротеза и коллаген-хитозановой пластины позволяет сочетать положительные качества обоих материалов. Полипропиленовый эндопротез обеспечивает механическую прочность

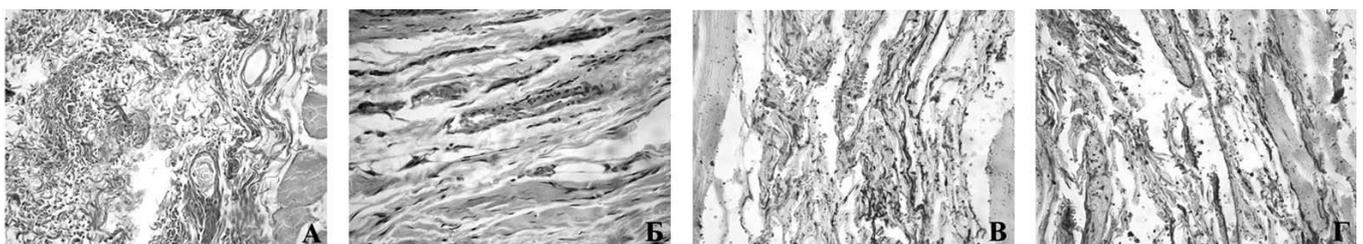


Рис. 3. Раневая поверхность с ПСЭ+КХК, 90-е сутки эксперимента, х40: А – окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, Б – окраска гематоксилином и эозином, В-Г – окраска орсеином на выявление эластических волокон.

конструкции, а коллаген-хитозановая пластина модулирует местную воспалительную реакцию. В первую фазу раневого процесса отмечается сбалансированная фагоцитарная активность иммунокомпетентных клеток. В фазу регенерации происходит стимуляция неоангиогенеза и формирование в более раннем периоде, в сравнении с имплантацией полипропиленового эндопротеза, зрелой соединительной ткани. Применение комбинированной конструкции перспективно в восстановительной хирургии передней брюшной стенки в связи с уменьшением риска отторжения имплантата и формированием рубца, состоящего из зрелой соединительной ткани.

EXPERIMENTAL PROOF OF USING COMBINED POLYMER MATERIALS FOR THE RECONSTRUCTION OF ANTERIOR ABDOMINAL WALL

Yu. G. Trofimovich, D. V. Cherdancev, I. N. Bolshakov,
L. A. Shestakova, A. R. Kotikov, V. V. Kozlov
Krasnoyarsk State Medical University named
after prof. V. F. Voyno-Yasensky

Abstract. The paper presents the results of a study of the reaction of anterior abdominal wall tissues to the implantation of natural and synthetic polymeric material. It is well established that the implantation of polypropylene mesh prosthesis with the polymer coating of the wound on the base of collagen-chitosan complex it is noted more favorable for wound process.

Key words: laparostomy, polypropylene mesh endoprosthesis, collagen-chitosan complex.

Литература

1. Белобородов В. А., Борисов Р. Н. Современные принципы и перспективы хирургии тяжёлых форм перитонита // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – Т. 59, № 5. – С. 81-84.
2. Райбужис Е. Н., Сметкин А. А., Гайдуков К. М. и др. Внутривнутрибрюшная гипертензия и абдоминальный компартмент-синдром: современные представления о диагностике и лечении // Вестн. анестезиологии и реаниматологии. – 2010. – Т. 7, № 4. – С. 14-21.

3. Савельев В. С., Кириенко А. И. Клиническая хирургия: национальное руководство: в 3 т. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 2. – 832 с.

4. Сажин В. П., Авдовенко А. Л., Юрищев В. А. Современные тенденции хирургического лечения перитонита // Хирургия. – 2007. – № 11. – С. 36-39.

5. Хрипун А. И., Ануров М. В., Титкова С. М. и др. Результаты применения различных вариантов политетрафторэтилена для закрытия лапаротомной раны в условиях экспериментального перитонита // Бюл. ВСЦН СО РАМН. – 2010. – Т. 73, № 3. – С. 281-284.

6. Хрипун А. И., Махуова Г. Б., Перевезенцев И. Ю. Способ временной декомпрессии брюшной полости при гнойном перитоните // Бюл. ВСЦН СО РАМН. – 2011. – Т. 80, № 4. – С. 113.

7. Becker H. P., Willms A., Schwab R. Small bowel fistulas and the open abdomen // Scand. J. Surg. – 2007. – Vol. 96. – P. 263-271.

8. Gauzit R., Pèan Y., Barth X. et al. Epidemiology, management, and prognosis of secondary non-postoperative peritonitis: a French prospective observational multicenter study // Surg. Infect. – 2009. – Vol. 10, № 2. – P. 119-127.

9. Hasper D., Schefold J. C., Baumgart D. C. Management of severe abdominal infections // Recent Pat. Anti-infect. Drug Discov. – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. 57-65.

10. Leppäniemi A. K. Laparostomy: why and when? // Crit. Care. – 2010. – Vol. 14, № 2. – P. 212-216.

Сведения об авторах

Трофимович Юрий Геннадьевич – аспирант кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А. М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО КрасГМУ; e-mail: tyurg@yandex.ru.

Черданцев Дмитрий Владимирович – г. м. н., проф., зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А. М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО КрасГМУ; e-mail: gs@mail.ru.

Большаков Игорь Николаевич – г. м. н., проф. каф. оперативной хирургии и топографической анатомии КрасГМУ; e-mail: bol.bol@mail.ru.

Шестакова Людмила Анатольевна – к. м. н., зав. каф. патологической анатомии им. проф. П. Г. Подзолкова КрасГМУ; e-mail: patholog-LAn@yandex.ru.

Котиков Алихан Русланович – к. м. н., доцент каф. патологической анатомии им. проф. П. Г. Подзолкова КрасГМУ; e-mail: alipathologist@gmail.com.

Козлов Василий Владимирович – к. м. н., доцент каф. общественного здоровья и здравоохранения с курсом ПО КрасГМУ; e-mail: kvv.doc@gmail.com.

© СОЛОВЬЕВА И. А., МАРТЫНОВА Г. П., САВЧЕНКО А. А.

УДК 616.155.32:616.36-002-022.6-036-053.7

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КАК МАРКЕРОВ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ОБОСТРЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В У ПОДРОСТКОВ

И. А. Соловьева, Г. П. Мартынова, А. А. Савченко

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения РФ, ректор – д. м. н., проф. И. П. Артюхов; кафедра детских инфекционных
болезней с курсом ПО, зав. – д. м. н., проф. Г. П. Мартынова; кафедра физиологии имени А. Т. Пшоники,
зав. – д. м. н., проф. А. А. Савченко.

Резюме. В работе представлены результаты исследования по изучению состояния метаболических процессов лимфоцитов крови у подростков с хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ). Выявлено, что в лимфоцитах крови снижаются уровни активности дегидрогеназ, определяющих интенсивность анаэробной и аэробной энергетики, липидного анаболизма. У больных с развитием реактивации патологического процесса при динамическом наблюдении, характерным является изменение активности глутатионредуктазы (в группе 10-15 лет активность фермента снижается на 83,6%, а у лиц старше 15 лет, наоборот, повышается в 19,8 раза). С целью прогноза развития обострения у больных ХГВ 10-15 лет возможно использование определения соотношения показателей активности ГбФДГ/НАДН-ЛДГ.

Ключевые слова: хронический гепатит В, лимфоциты, ферменты.