

**И.В.Кумова, И.Г. Жук, С.С. Ануфрик,
Н.И. Прокопчик, А.К. Гриб, Я.Р. Мацюк, Р.И. Кравчук**

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТОЛСТОКИШЕЧНОГО АНАСТОМОЗА

УО «Гродненский государственный медицинский университет»
УО «Гродненский государственный университет имени Я. Купалы»
ЦНИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

В эксперименте на взрослых беспородных крысах были изучены морфологические и ультраструктурные изменения, происходящие в зоне толстокишечного анастомоза под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Животным производили наложение межкишечного анастомоза «бок в бок». В опытной группе (30 крыс) на область сформированного соустья воздействовали НИЛИ по схеме: однократно интраоперационно и 7 сеансов по 5 минут с кратностью 1 ежедневно в послеоперационном периоде контактным способом через переднюю брюшную стенку в области предполагаемой проекции зоны анастомоза. Материал (участки из зоны анастомоза и стенки кишки) подвергали макроскопическому, гистологическому и электронно-микроскопическому исследованию. Было доказано, что НИЛИ стимулирует репаративные процессы в зоне соустья посредством активации метаболизма клеток, усиления пролиферации и созревания фибробластов с образованием коллагеновых волокон.

Ключевые слова: несостоятельность толстокишечного анастомоза, заживление межкишечного анастомоза, низкоинтенсивное лазерное излучение.

Morphological and ultrastructural changes occurring in the colonic anastomosis zone under the influence of low-level laser radiation were experimentally studied on adult mongrel rats. "Side-to-side" inter-intestinal anastomosis application was performed in the animals. In the experimental group (30 rats), low-level laser radiation was applied on the region of the formed anastomosis according to the given plan: once during the operation and 7 times during 5 minutes each day in the post operative period by means of the contact technique through the anterior abdominal wall in the proposed projection region of the anastomosis zone. The material (parts from the anastomosis zone and intestinal wall) was macroscopically, histologically, electronic-microscopically investigated. Low-level laser radiation was proved to stimulate the healing processes in the anastomosis zone by means of cell metabolism activation, proliferation intensification and fibroblasts maturation with collagen fibers formation.

Keywords: colonic anastomosis incompetence, inter-intestinal anastomosis healing, low-level laser radiation.

До настоящего времени частота несостоятельности швов толстокишечных соустьев остается довольно высокой и составляет в среднем в плановой хирургии 12%, а в неотложной - до 20% [2]. По данным разных авторов, указанное осложнение наблюдается у 1,1-28,5% больных, оперированных на толстой кишке с наложением анастомоза ручным способом, у 2,7-8,6% пациентов, анастомоз которым был сформирован с помощью сшивающих аппаратов различных модификаций. Несостоятельность межкишечных соустьев

в колоректальной хирургии приводит к каловому перитониту, который до сих пор обуславливает высокие цифры летальности (30,5 - 78,5%) [10].

Неудачи в хирургии толстой кишки при прочих равных условиях большинством авторов связываются с анатомо-физиологическими особенностями органа: наличием агрессивной, преимущественно неклостридиальной микрофлоры и активных ферментов в просвете, изначально малой прочностью стенок, неадекватной микроциркуляцией в стенке кишки, склонностью к гипоксии и ишемии [2, 4].

Пересечение кишки и наложение швов создают для микроциркуляции в области анастомоза новые механические условия, значительно отличающиеся от существующих в интактной кишке. При завязывании лигатуры фиксация нити происходит за коллагеновые волокна подслизистого слоя как основной прочностной структуры кишечной стенки (70% прочности кишечного шва зависит от данного слоя) [4]. Сжимаемая ткань, лигатура приводит к выраженным нарушениям крово- и плазматока как под самой нитью, так и в соседних областях за счет передаточной компрессии [4, 6]. При толстокишечных соустьях зона некроза может доходить даже до серозного слоя, так как шов приводит к ишемии тканей, а фитильность и капиллярность лигатур способствует тому, что стенка толстой кишки, прилегающая к анастомозу, вовлекается в воспалительный процесс, теряет свою барьерную функцию для микроорганизмов вегетирующих в ее просвете, и инфекция из просвета кишки быстро распространяется между слоями тканей [2]. Эти процессы ведут к возможному прорезыванию лигатуры, развитию воспалительного процесса как в самом анастомозе, так и в свободной брюшной полости. В условиях перитонита процесс регенерации в зоне соустья задерживается под влиянием протеолитических ферментов, продуцируемых микрофлорой брюшной полости, которые разрушают фибрин как один из важных компонентов биологической герметизации [8].

К настоящему времени многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями доказано, что все межкишечные анастомозы в большей или меньшей степени заживают вторичным натяжением, проходя все стадии репарации гнойной раны [2, 10]. В результате это может приводить к рубцовому стенозу и функциональной несостоятельности соустья в позднем послеоперационном периоде.

Таким образом, даже внедрение новых и усовершенствование существующих методик кишечного шва не снимают проблему заживления толстокишечного анастомоза и стимулируют поиски методов ее решения.

Многолетний опыт использования низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в различных областях медицины показал его высокую эффективность вследствие широкого спектра положительных эффектов, основанных на уникальных биологически активных свойствах, обеспечивающих биостимулирующий, противовоспалительный, антиоксидантный, десенсибилизирующий, противоотечный, обезболивающий и прочие эффекты [5].

Лазерная терапия имеет следующие особенности [3]:

1) мощность НИЛИ, необходимая для индикации его организмом, попадает в область нетеплового воздействия (диапазон длин волн 0,3-1,55 мкм);

2) нормализующий физиологический эффект сохраняется и после прекращения этого воздействия; продолжительность сохранения эффекта возрастает от процедуры к процедуре, перекрывая в определенный момент время между процедурами;

3) лечебный эффект наблюдается в очаге патологии, хотя воздействие может производиться в отдаленной от очага зоне.

В настоящее время доказана высокая эффективность и безопасность низкоинтенсивного (не повреждающего биологические ткани) лазерного излучения в хирургии при лечении

послеоперационных осложнений, анастомозитов, парезов кишечника, чистых и гнойных ран, ожогов, трофических язв, облитерирующих заболеваний сосудов конечностей, холецистопанкреатитов и др. [3, 5, 9].

Лазерный свет ускоряет процессы регенерации, способствует уменьшению микрофлоры, рассасыванию инфильтратов, нормализации показателей крови и приводит в конечном итоге к заживлению ран [3]. Под действием НИЛИ ускоряется очищение ран от некротических масс, более чем на 2 суток сокращается экссудативная фаза воспаления, наблюдается 2-3 дневное опережение процессов созревания грануляционной ткани, активизация пролиферации фибробластов. В результате эпителизация раны также завершается на трое суток раньше [3, 11, 12, 13].

Учитывая эффективность применения НИЛИ для стимуляции заживления гнойных ран, можно предположить возможность его использования с целью ускорения регенерации толстокишечного анастомоза.

Цель исследования: изучить в эксперименте влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процесс заживления толстокишечного анастомоза.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 60 белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 граммов. Всем животным производили операцию наложения толстокишечного анастомоза. Оперативные вмешательства проводились с соблюдением правил асептики и антисептики под внутримышечным калипсоловым наркозом из расчета 0,1 мл калипсола на 100 граммов массы тела животного.

Техника оперативного вмешательства: Брюшная полость вскрывалась послойно путем нижней срединной лапаротомии. В операционную рану выводили слепую и восходящую ободочную кишки. Производили наложение обходного анастомоза по Брауну по типу «бок в бок» на восходящую ободочную кишку, отступя 2 см дистальнее илеоцекального угла. Стенку кишки пересекали на протяжении 1,5 диаметра просвета для предупреждения последующего стеноза. При создании соустья использовали двухрядный шов Альберта: внутренние – непрерывный сквозной обвивной на заднюю губу анастомоза и вворачивающий шов Шмидена на переднюю (Сургикрил 7/0), снаружи – серозно-мышечные швы Ламбера (Полипропилен 5/0). Непрерывность передней брюшной стенки восстанавливалась послойно. В опытной группе (30 животных) на область сформированного толстокишечного анастомоза воздействовали НИЛИ по схеме: однократно интраоперационно и 7 сеансов по 5 минут с кратностью 1 ежедневно в послеоперационном периоде контактным способом через переднюю брюшную стенку в области предполагаемой проекции зоны анастомоза. Для облучения использовали аппарат лазерный терапевтический «Родник–1» (полупроводниковый непрерывный лазер красной области спектра, $\lambda = 0,67 \pm 0,02$ мкм, мощность излучения 20 мВт).

Животных выводили из эксперимента в сроки 3, 7, 14, 30, 45, 60 суток. Материал (участки из зоны анастомоза и стенки кишки) подвергали гистологическому исследованию с окраской препаратов гематоксилином и эозином с последующей морфометрией. Для более детального анализа процесса заживления проводили электронно-микроскопическое исследование материала по общепринятой методике (Millonig G.A., Watson M.L., Reynolds E.S.). Препараты изучали в электронном микроскопе YEM-100 CX при увеличениях 4,8–36000. Полученные результаты обрабатывали статистически с подсчетом средней арифметической (M), среднего квадратического отклонения (δ), ошибки средней арифметической (m) и критерия достоверности Стьюдента (t) для

малых выборок ($n < 30$). Различия в результатах считались достоверными при $p < 0,05$ и высоко достоверными при $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании на 3-и сутки в препаратах контрольной группы отмечалась интенсивная гнойная инфильтрация с некрозом тканей и отторжением омертвевших участков слизистой оболочки. В подслизистой основе, мышечном и серозном слоях стенки кишки по ходу лигатур наблюдались очаги гнойно-некротического воспаления, представленные центрально расположенными участками некроза с перифокальным валом из нейтрофильных лейкоцитов и единичных макрофагов. Определялись признаки расстройства кровообращения: выраженный отек, полнокровие сосудов, массивные кровоизлияния в подслизистой основе слизистой оболочки.

К 7-м суткам после операции незначительно изменялся клеточный состав воспалительного инфильтрата (таблица 1). На фоне преобладания нейтрофильно-эозинофильной инфильтрации (нейтрофилов - $121 \pm 4,708$, эозинофилов - $154 \pm 7,789$) нарастало количество макрофагов и плазматических клеток. Наблюдалось формирование перилигатурных гранул по типу реакции рассасывания «инородных тел» с появлением в окружности лигатур молодой грануляционной ткани, которая была представлена новообразованными сосудами капиллярного типа, лимфогистиоцитами ($98 \pm 3,916$), небольшим количеством фибробластов ($42 \pm 2,121$), рыхлых коллагеновых волокон, единичными фиброцитами ($6 \pm 0,913$). Сохранялся отек, полнокровие сосудов, определялись остатки кровоизлияний в ткани кишки.

Таблица 1

Количество клеток в 1 мм^2 ткани из области толстокишечного анастомоза

Срок	Нейтрофилы	Эозинофилы	Лимфо-гистиоциты	Фибробласты	Фиброциты
7суток контроль	$121 \pm 4,708$	$154 \pm 7,789$	$98 \pm 3,916$	$42 \pm 2,121$	$6 \pm 0,913$
7суток опыт	$39 \pm 2,310$	$57 \pm 2,082$	$87,3 \pm 1,453$	$42 \pm 1,528$	$10,3 \pm 0,667$
	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,05$	-	$p < 0,05$
14суток контроль	$3,5 \pm 0,563$	$14,7 \pm 1,085$	$31,3 \pm 0,803$	$44,7 \pm 1,383$	$24,7 \pm 0,803$
14суток опыт	$1,3 \pm 0,334$	$4 \pm 0,578$	$23,7 \pm 2,186$	$29,7 \pm 1,202$	$46,3 \pm 1,202$
	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

С 14-ых суток отмечалось стихание воспалительной реакции (нейтрофилов – $3,5 \pm 0,563$, эозинофилов – $14,7 \pm 1,085$), регенерация слизистой и дальнейшее созревание грануляционной ткани в подслизистой основе. Насчитывалось небольшое количество клеточных элементов в очагах формирования грануляционной ткани: преобладали лимфогистиоциты ($31,3 \pm 0,803$), фибробласты ($44,7 \pm 1,383$), увеличилось количество зрелых фиброцитов ($24,7 \pm 0,803$). Коллагеновых волокон определялось немного, они располагались рыхло, без четкой направленности.

На 30-е сутки в препаратах определялась восстановленная слизистая оболочка с обилием бокаловидных клеток, местами расширенных и переполненных слизистым секретом. В

подслизистой основе выявлялась молодая соединительная ткань. В мышечной оболочке сохранялись очаги хронического гнойного воспаления вокруг нерассосавшихся лигатур.

На 45-е сутки в препаратах слизистая оболочка выявлялась на всем протяжении, была резко утолщена, гипертрофирована, местами эпителиальный пласт был глубоко погружен в подслизистую основу, встречались железистые кисты. В подслизистой основе и мышечной оболочке определялась зрелая соединительная ткань с явлением склероза как следствие сохранения очагов хронического гнойного воспаления в стенке кишки, поддерживавшего избыточную коллагенизацию.

На 60-е сутки гистологическая картина мало отличалась от таковой на 45-е сутки. В подслизистой основе, мышечной и серозной оболочках сохранялась скудная лимфогистиоцитарная инфильтрация. В области анастомоза сформировался плотный соединительнотканый рубец.

В препаратах опытной группы по сравнению с контролем на 3-и сутки выраженность явлений альтерации (некроза стенки кишки) и экссудации (отека и гнойной инфильтрации) была меньше. Уже к 5-7-ым суткам нейтрофильно-эозинофильная инфильтрация значительно уменьшилась (нейтрофилов – $39 \pm 2,310$, эозинофилов – $57 \pm 2,082$). Отмечалось смещение клеточного состава грануляционной ткани в сторону более зрелых клеток по сравнению с контролем (лимфогистиоцитов – $87,3 \pm 1,453$, фибробластов – $42 \pm 1,528$, фиброцитов – $10,3 \pm 0,667$). К 14-м суткам воспалительная инфильтрация практически не определялась (нейтрофилов – $1,3 \pm 0,334$, эозинофилов – $4 \pm 0,578$). По сравнению с контрольными препаратами грануляционная ткань была представлена более зрелыми клетками (лимфогистиоцитов – $3,7 \pm 2,186$, фибробластов – $29,7 \pm 1,202$, фиброцитов – $46,3 \pm 1,202$) с явным преобладанием коллагеновых волокон над клеточными элементами. На 30-е сутки признаков гнойного воспаления в стенке кишки не обнаруживалось, сохранялась лишь скудная лимфогистиоцитарная инфильтрация. На 45 – 60-е сутки гистологическая картина отличалась от контроля менее выраженными явлениями склероза и формированием более тонкого соединительнотканного рубца в области анастомоза.

При электронно-микроскопическом исследовании препаратов из зоны толстокишечного анастомоза (срок 7 суток) животных, подвергавшихся воздействию НИЛИ, определялось большое количество молодых колоноцитов со светлой цитоплазмой, множеством включений, формировавшимися органеллами. Бокаловидные клетки находились на различных стадиях секреторного цикла, встречались как истощенные, так и переполненные слизистым секретом, расширенные клетки. В местах повреждения слизистой отмечалось проникновение микроорганизмов из просвета кишки внутрь бокаловидных клеток и в глубже лежащие слои по расширенным межклеточным пространствам. Там, где слизистая была интактна, микробы если и проникали в колоноциты, то в виде фагоцитарных вакуолей. Выявлялось много лимфоцитов, фибробластов, единичные фиброциты. Многие фибробласты находились в стадии активной секреции коллагеновых волокон межклеточного матрикса. Из внутриклеточных органелл наиболее явные изменения наблюдались в митохондриях, комплексе Гольджи и гранулярной эндоплазматической сети. Отмечалось увеличение количества и размеров митохондрий, их набухание и расширение межклеточных пространств, увеличение числа и размеров цистерн пластинчатого комплекса, накопление секреторных гранул в цитоплазме, усиленное развитие компонентов гранулярной эндоплазматической сети. Эти изменения свидетельствовали об активных энергетических процессах, депонировании секрета и питательных веществ для нужд клетки и синтезе белка для построения новых молодых клеток регенерирующей ткани кишки [1].

Наблюдаемые морфологические и ультраструктурные изменения в препаратах опытных групп можно объяснить основными эффектами НИЛИ. Менее выраженная гнойная

инфильтрация ткани кишки, более быстрая смена экссудативной фазы воспаления на пролиферативную обусловлены противовоспалительным и противомикробным действием НИЛИ [3, 5, 9]. Основные молекулярно-клеточные механизмы данного воздействия выглядят следующим образом [7]. Мишенями лазерной энергии являются лейкоциты (фагоциты) и липопротеины крови, содержащие эндогенные порфирины, выступающие в роли хромофоров лазерного излучения. При многих патологических состояниях (воспаление, ишемия) количество порфиринов возрастает. Поглощая энергию НИЛИ, они инициируют свободнорадикальные реакции, приводящие к запуску перекисного окисления липидов (ПОЛ). Накопление в мембранах лейкоцитов продуктов ПОЛ приводит к увеличению ионной проницаемости для Ca^{2+} , а накопление Ca^{2+} в цитоплазме лейкоцитов индуцирует прайминг клеток. В результате повышается активность лейкоцитов (фагоцитов), что выражается в синтезе биологически активных веществ (БАВ) – NO, активных форм кислорода (АФК) и др. NO – предшественник эндотелий релаксирующего фактора, улучшает микроциркуляцию, АФК запускают синтез белков в фагоцитах (цитокинов, супероксиддисмутазы, каталазы), повышая их бактерицидность.

В очаге воспаления лазерное излучение восстанавливает микроциркуляцию и улучшает отток жидкости из межклеточного пространства в кровеносные сосуды. Биологический эффект НИЛИ на систему микроциркуляции объясняется увеличением деформируемости эритроцитов и скорости кровотока, снижением спастических реакций микрососудов, особенно артериолярного звена, ликвидацией отека, улучшением реологических свойств крови. Это обусловлено как фотореакциями гладкомышечных сфинктеров артериол, так и биологически активными веществами, стимулированными НИЛИ [3]. С уменьшением отека агенты клеточного иммунитета (лимфоциты, макрофаги) устремляются по восстановленным магистралям внутрь очага воспаления, запуская дальнейшие стадии его купирования.

Вероятность несостоятельности анастомоза наиболее высока в первые 3 – 4 суток. В этот период низкие показатели прочности связаны с уменьшением количества коллагена, вследствие распада его под действием воспалительных агентов, а новый коллаген начинает синтезироваться преимущественно с 4-ых суток после операции [2]. НИЛИ оказывает как прямое стимулирующее влияние на фибробласты путем активации транскрипционного фактора фибробластов, так и опосредованное через продуцируемые лейкоцитами цитокины (IL – 1, IL - 6), которые индуцируют синтез коллагена и пролиферацию фибробластов [7, 11, 12, 13]. Это объясняет опережение процесса созревания грануляционной ткани в зоне межкишечного анастомоза у животных опытных групп по сравнению с контрольными.

Выводы

НИЛИ стимулирует клеточные и внутриклеточные регенераторно-репаративные процессы, оказывает выраженное противовоспалительное действие, улучшает микроциркуляцию и способствует заживлению толстокишечного анастомоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын, А. П. Гипертрофия и регенерация клеток / А. П. Авцын // Ультраструктурные основы патологии клетки / А. П. Авцын, В. А. Шахламов. – Москва: Медицина, 1979. – Гл. VIII. – С.191 – 202.
2. Морфогенез толстокишечных конце-концевых анастомозов / Ф. Ш. Алиев [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2005. – Т. XII, № 2. – С. 19.
3. Буйлин, Б. А. Низкоинтенсивные лазеры в хирургии: реальность и перспективы / Б. А. Буйлин, Е. И. Брехов, В. И. Брыков // Анналы хирургии. – 2003. – № 2. – С. 8.

4. О значении подслизистого слоя при сшивании органов желудочно-кишечного тракта / В. М. Буянов [и др.] // *Анналы хирургии.* – 1999. – № 4. – С. 28 – 33.
5. Использование низкоинтенсивного лазерного излучения при ряде хирургических заболеваний у детей: методическое пособие для врачей / Е. Л. Вишневский [и др.]. – Москва: ЗАО “МИЛТА-ПКП ГИТ”, 2001. – С. 12.
6. Механические напряжения под нитью кишечного шва как причина нарушений микроциркуляции в области соустья / В. И. Егоров [и др.] // *Анналы хирургии.* – 2002. – № 3. – С. 66.
7. Влияние эндогенных фотосенсибилизаторов на лазер-индуцированный прайминг лейкоцитов крови / Г. И. Клебанов [и др.] // *Биол. мембраны* – 1998. – Т. 15, № 3. – С. 273 – 285.
8. Профилактика несостоятельности межкишечных анастомозов при перитоните / Ф. Г. Кулачек [и др.] // *Клиническая хирургия.* – 1984. – № 6. – С. 71 – 72.
9. Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения / А. С. Крюк [и др.]; под ред. А. С. Крюка. – Минск: Наука и техника, 1986. – 231 с.
10. Тихонов, И. А. Способы формирования межкишечных анастомозов в колоректальной хирургии / И. А. Тихонов, Д. В. Басуров // *Хирургия.* – 2002. – № 12. – С. 64.
11. Функциональные изменения фибробластов грануляционной ткани в условиях применения лазера / Г. В. Хомулло [и др.] // *Морфология.* – 2006. – Т. 129, № 4. – С.131.
12. Reddi, G. K. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons / G. K. Reddi, L. Stehno-Bittel, C. S. Enwemeka // *Laser Surg. Med.* – 1998. – Vol. 22, N 5. – P. 281 – 287.
13. Webb, C. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypotrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts / C. Webb, M. Dyson, W. H. Lewis // *Laser Surg. Med.* – 1998. – Vol. 22, N 5. – P. 294 – 301.