

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПЛАСТИКИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ДЕФЕКТА СТЕНКИ ТРАХЕИ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ И СТЕНТА

А.В. Денисова, С.С. Дыдыкин, Е.И. Сафронова, Н.Н. Пискунова, А.А. Пантелеев,
О.А. Романова, Е.Д. Григорьевский, С.И. Кольченко

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

В статье представлены результаты эксперимента на животной модели.

В эксперименте разработан новый способ пластики эпителиального дефекта стенки трахеи с помощью скаффолда, фиксированного в просвете трахеи с помощью сосудистого стента.

Материал и методы. Объектом исследования стали кролики породы Шиншилла. В основу опыта положено создание дефекта эпителия стенки трахеи с последующим его закрытием клеточно-инженерной конструкцией. Рассмотрены два варианта фиксации матрикса: 1 – подшивание скаффолда к стенке трахеи, 2 – интратрахеальная установка стента одномоментно между вдохом и выдохом кролика под контролем зрения.

Результаты. В эксперименте подтверждены преимущества фиксации матрикса стентом по сравнению с использованием шовного материала. Интратрахеальный стент позволяет открывать дополнительно просвет трахеи и не затрачивать время на подшивание матрикса. В эксперименте достигнута жизнеспособность тканеинженерной слизистой реципиента на полимерной основе.

Заключение. Предложенный метод может быть применим в клинических условиях. Способ можно использовать как методологическую основу для дальнейших работ в области биоинженерии нижних дыхательных путей и любых других трубчатых органов.

Ключевые слова: реконструктивно-восстановительная хирургия, клеточно-инженерные конструкции, скаффолд, стент, животная модель.

Конфликт интересов: авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Денисова А.В., Дыдыкин С.С., Сафронова Е.И., Пискунова Н.Н., Пантелеев А.А., Романова О.А., Григорьевский Е.Д., Кольченко С.И. Моделирование пластики эпителиального дефекта стенки трахеи с помощью клеточно-инженерной конструкции и стента. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2019;22(2):48–52. doi 10.17223/1814147/69/06

MODELING OF PLASTICS OF EPITHELIAL DEFECT OF TRACHEA WALLS USING CELL-ENGINEERING DESIGNS AND STENT

A.V. Denisova, S.S. Dydykin, Ye.I. Safronova, N.N. Piskunova, A.A. Panteleev, O.A. Romanova,
E.D. Grigoryevsky, S.I. Kolchenko

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
2-8, Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

The paper presents the results of experiment on the animal model.

Purpose. In the experiment, a new method of plasticizing the epithelial defect of the tracheal wall with a scaffold fixed in the tracheal lumen by means of a vascular stent was developed.

Material and methods. The object of the study were chinchilla rabbits. The basis experience put the creation of the defect of the epithelium of the wall of the trachea with subsequent to the closing of the cell-engineering design. Two variants of matrix fixation are considered: 1-suturing the scaffold to the tracheal wall, 2-intra-tracheal stent installation simultaneously between inhalation and exhalation of the rabbit under vision control.

Results. In the experiment, the advantage of fixation of the matrix by a stent in comparison with the use of suture material becomes obvious. Intra-tracheal stent allows you to open an additional lumen of the trachea and not to spend time on suturing the matrix. In the experiment, the absolute viability of the whole tissue-engineered mucosa of the recipient on a polymer basis was achieved.

Conclusions. The proposed method can be applied in clinical conditions. The method can be used as a methodological basis for further work in the field of bioengineering of the lower respiratory tract and any other tubular organs.

Keywords: *reconstructive surgery, cell-engineering structures, scaffold, stent, animal model.*

Conflict of interest: the authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Denisova A.V., Dydykin S.S., Safronova E.I., Piskunova N.N., Panteleev A.A., Romanova O.A., Grigoryevsky Ye.D., Kolchenko S.I. Modeling of plastics of epithelial defect of trachea walls using cell-engineering designs and stent. *Issues of Reconstructive and Plastic Surgery*. 2019;22(2):48–52. doi 10.17223/1814147/69/06

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день проблема критических стенозов нижних дыхательных путей не теряет своей актуальности. Консервативные и малоинвазивные методы лечения, базирующиеся на возможностях современной эндоскопии, на практике имеют весьма ограниченное применение. Причина в том, что нозологии, требующие подобного лечения, все чаще диагностируются на поздних стадиях заболевания, когда необходим исключительно решительный подход. Циркулярная резекция, долго и успешно применяемая при стенозах трахеи и бронхов, имеет ограниченные показания и не может быть панацеей при протяженных эпителиальных дефектах трахеобронхиального дерева. Особенно остро вопрос стоит при наличии онкологического заболевания, когда радикальность лечения и качество жизни пациента после операции становятся соизмеримыми понятиями. Применение синтетических протезов [1–4] и аутотрансплантатов [5–7] не оправдало себя в клинических условиях и стало лишь достоянием истории. Оперативные вмешательства, базирующиеся на достижениях современной трансплантологии, помимо проблем, вызванных иммунными особенностями и дефицитом кадаверного материала, имеют и морально-этический аспект [8–9]. Большое значение начинают приобретать достижения регенеративной медицины. Клеточно-инженерные конструкции, выращенные в лабораториях, оправдывают себя в экспериментальных условиях [10–13]. 3D-напечатанные органы обретают все большую популярность [14–15].

Все это создает предпосылки к поиску новых эффективных способов лечения протяженных стриктур воздухоносного тракта и дальнейшему развитию реконструктивно-восстановительной хирургии.

Цель исследования: моделирование нового, простого в исполнении и менее инвазивного способа пластики эпителиального дефекта стенки трахеи с помощью тканеинженерной конструкции, фиксированной в просвете трахеи с помощью сосудистого стента.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Сеченовского университета (г. Москва). Объектом эксперимента стали взрослые кролики породы Шиншилла массой тела около 4 кг.

В ходе исследования мы строго руководствовались нормами, требованиями, правилами и принципами биоэтики в работе с лабораторными животными.

Все этапы оперативного вмешательства осуществлялись при анестезиологическом пособии. Для премедикации выбраны атропин и димедрол, операционный период обеспечивался залетиллом/ксилазином. Первую дозу залетилла/ксилазина вводили внутримышечно, последующие дозы – внутривенно. При работе в просвете трахеи прибегали к интубации с помощью неонатального ларингоскопа и мешка Амбу.

Животных разделили по типу оперативного вмешательства на две экспериментальные группы.

У животных 1-й группы ($n = 5$) осуществляли закрытие дефекта путем подшивания матрикса на полимерной основе.

Кролика фиксировали на операционном столе. Затем производили обработку выбритого от шерстяного покрова операционного поля (передняя поверхность шеи и верхней части грудной клетки) растворами антисептиков. Выполняли разрез кожи по средней линии шеи длиной около 10 см, препарировали превисцеральную клетчатку, осуществляя доступ к шейному отделу трахеи. Трахею выделяли из окружающих тканей и производили электрокоагуляционный гемостаз.

Далее создавали дефект эпителия трахеи. «Окно» размером 15×7 мм формировали с помощью офтальмологического скальпеля на переднебоковой стенке трахеи с вовлечением слизистой и подслизистой основы. Гемостаз обеспечивали без использования электрокоагулятора с помощью коллагеновой гемостатической губки.

На дефект укладывали синтетический био-разлагаемый матрикс. Мы использовали матрикс тканеинженерной слизистой реципиента, который представлял собой скаффолд на основе хитозана и коллагена. Матрикс подшивали к краям слизистой оболочки и подлежащим хрящам узловыми швами, чтобы предотвратить его миграцию в просвет дыхательной трубки с дальнейшим развитием у животного асфиксии. Использовали шовный материал Prolene 8/0, нерассасывающийся монофиламент синего цвета, что позволяло найти границы фиксации матрикса в случае его полной резорбции или смещения. Экстубацию осуществляли с большой осторожностью, чтобы механически не повредить матрикс интубационной трубкой.

У животных 2-й группы ($n = 2$) выполняли фиксацию матрикса в просвете трахеи при помощи сосудистого стента.

На данном этапе была применена абсолютно новая методика фиксации клеточно-инженерной конструкции в просвете трахеи (Патент РФ № 2017110581).

Для фиксации матрикса в просвете дыхательной трубки был подобран сосудистый стент, соответствующий трахее по размеру. Стент должен быть гипоаллергенным, биоразлагаемым либо потенциально удаляемым.

Одномоментно между вдохом и выдохом экспериментального животного под контролем зрения *per os* интубационно устанавливали стент, прочно фиксирующий изнутри матрикс к стенке трахеи в месте дефекта, затем стенку трахеи и рану ушивали.

Интубационную трубку во время установки стента смещали так, чтобы она не мешала его установке. Затем под контролем зрения, направ-

ляя конец трубки вручную, возвращали ее в исходное положение, чтобы продолжить искусственную вентиляцию легких во время ушивания раны трахеи. Гемостаз. Швы на кожу. Асептическая повязка. Экстубацию осуществляли бережно, но матрикс был фиксирован достаточно надежно, и интубационной трубкой конструкцию повредить было невозможно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первая группа была сформирована для оценки фиксации скаффолда шовным материалом. Два кролика погибли в 1-е сут после операции. При аутопсии у этих животных диагностирован отек легких. Летальный исход в первом случае обусловлен чрезмерным повреждением дыхательных путей, во втором – обтурацией трахеи инородным телом – матриксом.

Остальных животных этой группы вывели из эксперимента на 20-е сут. На секции было выявлено незначительное сужение трахеи, а в ее просвете имеется слизь. Обтурации не наблюдалось, однако между матриксом и хрящами трахеи пространство заполнено геморрагическим экссудатом. Следовательно, можно предположить, что матрикс неполноценно прилегал к стенке трахеи, к тому же, при движении воздушного потока через дыхательную трубку создавались дополнительные колебания клеточно-инженерной конструкции, и она не могла в полном объеме выполнять свою функцию. Об этом свидетельствовало и исследование микропрепаратов. Между матриксом и трахеей визуализировался экссудат, содержащий воспалительные клетки и эритроциты. На границах матрикса и дефекта обнаружен регенерирующий эпителий, однако его рост сдерживался инфильтрированным матриксом.

Результаты гистологического исследования позволили говорить о целесообразности применения клеточно-инженерной конструкции в закрытии протяженных дефектов слизистой оболочки и подслизистого слоя нижних дыхательных путей. Но, вместе с тем, это побудило нас к поискам нового более щадящего и результативного способа фиксации скаффолда на раневой поверхности.

Методика, примененная на животных 2-й группы, положительно сказалась на клиническом течении послеоперационного периода, что было обеспечено гораздо меньшим временем пребывания кролика в наркозе, так как не требовался расширенный доступ в трахею, и время, потраченное на фиксацию матрикса к стенке трахеи, существенно сократилось. Послеоперационной летальности не было отмечено. Животные были

выведены из эксперимента по окончании исследования.

При аутопсии трахея без каких либо сложностей была отделена от стента, но матрикс при этом частично фрагментировался. Стеноз органа не отмечался. По сравнению с группой животных, где матрикс подшивался узловыми швами, в данном случае в зоне дефекта не наблюдалось выраженных отека и гематомы. Микроскопически отмечена регенерация эпителия.

ВЫВОДЫ

1. Техническим результатом, достигнутым в эксперименте, стали жизнеспособность тканеинженерной слизистой реципиента на полимерной основе и надежная фиксация скаффолда. Внутритрахеальный стент прочно фиксирует матрикс изнутри к стенке трахеи, позволяя не открывать дополнительно просвет трахеи и не

затрачивать время на подшивание или приклеивание матрикса.

2. Предложенный метод может быть использован как оперативный прием в лечении эпителиального дефекта стенки трахеи и являться доступной моделью для последующего применения в клинических условиях.

3. Предложенный способ позволяет тестировать значительное число различных по составу и свойствам матриксов на их биосовместимость и способность поддерживать рост и дифференцировку эпителиальных клеток *in vivo*.

4. Проведенная нами установка стента в просвет трахеи в перспективе выполняема эндоскопическим путем.

5. Предложенная модель реконструкции трахеи при дальнейшей апробации может иметь место при закрытии дефектов не только нижних дыхательных путей, чему посвящена данная работа, но любых других трубчатых органов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Амиров Ф.Ф. Пластические операции на трахее и бронхах (экспериментальное исследование). Ташкент: Госмедиздат Уз ССР, 1962:141 с. [Amirov F.F. Plasticheskiye operacii na trahee i bronhah (eksperimentalnoe issledovanie) [Plastic surgery on the trachea and bronchi (experimental study)]. Tashkent, State medical publishing house UzSSR. 1962:141 p. (In Russ.)].
2. Ratnovsky A., Regev N., Wald S., Kramer M., Naftali S. Mechanical properties of different airway stents. *Med Eng Phys.* 2015 Apr; 37(4):408-15. doi: 10.1016/j.medengphys.2015.02.008. Epub 2015 Mar 5.
3. Vearick S.B., Demétrio K.B., Xavier R.G., Moreschi A.H., Muller A.F., Sanches P.R.S. Dos Santos LAL1. Fiber-reinforced silicone for tracheobronchial stents: An experimental study. *J MechBehav Biomed Mater.* 2018 Jan; 77:494-500. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.10.013. Epub 2017 Oct 9.
4. Yamamoto S., Endo S., Endo T., Mitsuda S. Successful silicon stent for life-threatening tracheal wall laceration. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;19(1):49-51. Epub 2012 Jun 15.
5. Топольницкий Е.Б., Дамбаев Г.Ц., Гюнтер В.Э. Реконструкция трахеи армированным реваскуляризируемым кишечным аутоотрансплантатом (экспериментальное исследование). *Сибирский медицинский журнал (Томск).* 2012;27(2):137-141 [Topolnitsky E.B., Dambaev G.Ts., Gunther V.E. Rekonstruktsiya trahei armirovannym revaskulyariziruemyym kischechnym autotransplantatom (eksperimentalnoe issledovanie) [Tracheal reconstruction with reinforced revascularized intestinal autograft (experimental study)]. *Sibirskiy medicinskiy zhurnal (Tomsk) – Siberian Medical Journal (Tomsk).* 2012;27(2):137-141. (In Russ.)].
6. Wurtz A., Hysi I., Kipnis E., Zawadzki C., Hubert T., Jashari R., Copin M.C., Jude B. Tracheal reconstruction with a composite graft: fascial flap-wrapped allogenic aorta with external cartilage-ring support. *Interact CardiovascThorac Surg.* 2013 Jan;16(1):37-43. doi:10.1093/icvts/ivs422. Epub 2012 Oct9.
7. Chinen T., Hirayasu T., Kuniyoshi Y., Uehara K., Kinjo T. Experimental Reconstruction of the Trachea with Urinary Bladder Wall. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2016 Jun; 20;22(3):153-60. doi: 10.5761/atcs.0a.15-00375. Epub 2016 Mar 23.
8. Propst E.J., Prager J.D., Meinen-Derr J., Clark S.L., Cotton R.T., Rutter M.J. Pediatric tracheal reconstruction using cadaveric homograft. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011 Jun; 137(6):583-90. doi: 10.1001/archoto.2011.85.
9. Дыдыкин С.С., Павлов А.В. Способ пересадки трахеи. Патент РФ №2110224 [Dydykin S.S., Pavlov A.V. Spособ peresadki trahei. Patent RF № 2110224 [The method of transplantation of the trachea. Patent of Russian Federation No. 2110224]. (In Russ.)].
10. Kojima K., Vacanti C.A. Tissue engineering in the trachea. *Anat Rec (Hoboken).* 2014 Jan; 297(1):44-50. doi: 10.1002/ar.22799. Epub 2013 Dec 2.
11. Liu Y., Lu T 2, Zhang Y., Qiao Y., Xi J., Wang Q. Collagen-conjugated tracheal prosthesis tested in dogs without omental wrapping and silicone stenting. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2016 Nov; 23(5):710-715. Epub 2016 Jul 17.

12. Hung S.H., Su C.H., Lin S.E., Tseng H. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization. *Laryngoscope*. 2016 Nov; 126(11):2520-2527. doi: 10.1002/lary.25932. Epub 2016 Mar 1.
13. Shin Y.S., Choi J.W., Park J.K., Kim Y.S., Yang S.S., Min B.H., Kim C.H. Tissue-engineered tracheal reconstruction using mesenchymal stem cells seeded on a porcine cartilage powder scaffold. *Ann Biomed Eng*. 2015 Apr; 43(4):1003-13. doi: 10.1007/s10439-014-1126-1. Epub 2014 Sep 25.
14. Jung S.Y., Lee S.J., Kim H.Y., Park H.S., Wang Z., Kim H.J., Yoo J.J., Chung S.M., Kim H.S. Biofabrication. *3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: a pilot animal study*. 2016;8(4): 045015.
15. Zopf D.A., Hollister S.J., Nelson M.E., Ohye R.G., Green G.E. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. *N Engl J Med*. 2013 May; 23;368(21):2043-5. doi: 10.1056/NEJMc1206319.
16. Jose Hardill, Christoph Vanclooster, Pierre R. Delaere. An Investigation of Airway Wound Healing Using a Novel in vivo Model. *Laryngoscope* 111. July 2001:1174-1182.

Поступила в редакцию 10.01.2019, утверждена к печати 20.04.2019

Received 10.01.2019, accepted for publication 20.04..2019

Сведения об авторах:

Денисова Анна Валентиновна*, аспирант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва).

E-mail: denisova-doc@mail.ru

Дыдыкин Сергей Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва).

Сафронова Елизавета Игоревна, студентка ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва)

Пискунова Наталья Николаевна, студентка ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва).

Пантелеев Андрей Александрович, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва)

Романова Ольга Александровна, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва)

Григорьевский Евгений Дмитриевич, студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва).

Кольченко Степан Иванович, студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (г. Москва).

Information about authors:

Anna V. Denisova, postgraduate student, Department of operative surgery and topographic anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

E-mail: denisova-doc@mail.ru

Sergey S. Dydykin, Dr. Med. Sci., Professor, Head of Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Elizaveta I. Safronova, student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Natal'ya N. Piskunova, student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Andrey A. Panteleev, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Olga A. Romanova, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Yevgeniy D. Grigoryevsky, student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

Stepan I. Kolchenko, student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.