

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИРКУТСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ
И ТРАВМАТОЛОГИИ»

На правах рукописи

Курганский Илья Сергеевич

**ЛОКАЛЬНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ АНГИОГЕНЕЗА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИЙ НА ТРАХЕЕ
(клинико-экспериментальное исследование)**

3.1.9. Хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Григорьев Евгений Георгиевич

Научный консультант:

доктор биологических наук
Лепехова Светлана Александровна

Иркутск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ ТРАХЕИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ХИРУРГИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА	10
1.1 Механизмы формирования рубцовых стенозов трахеи	10
1.2 Способы моделирования патологической регенерации трахеальной стенки	12
1.3 Профилактика и лечение рубцового стеноза трахеи	14
1.4 Роль фактора роста эндотелия сосудов в регенерации стенки трахеи	16
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Характеристика клинических наблюдений	21
2.2 Характеристика экспериментальных исследований	23
2.3 Метод изготовления биокomпозиционного материала	35
ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РУБЦОВЫМ СТЕНОЗОМ ТРАХЕИ	39
ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКИ РУБЦОВЫХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ	48
4.1 Результаты исследования топографической анатомии трахеи крыс линии «Wistar»	48
4.2 Стеноз трахеи и дисфункция малого круга кровообращения	53
4.3 Результаты разработки биокomпозиционного материала, содержащего фактор роста эндотелия сосудов	61
4.4 Роль фактора роста эндотелия сосудов в эволюции раневого процесса и профилактике рубцового стеноза трахеи	63

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	91

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Нарушение механизмов регенерации при повреждении стенки трахеи вследствие длительной оротрахеальной интубации или трахеостомии приводит к формированию рубцовых стенозов (РСТ) [51, 57, 59].

Большинство пациентов (75 %) с РСТ трудоспособны, как правило в возрасте до 50 лет [22, 38, 41, 53, 57].

Основная причина РСТ – длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ) вследствие тяжелой сочетанной черепно-мозговой травмы, нарушения мозгового кровообращения, обширных оперативных вмешательств, тяжелой соматической патологии. Частота осложнений инвазивной ИВЛ достигает 80 % [24, 37, 41, 48]. Из них 25 % приходится на долю рубцового стеноза трахеи: 14–45 % – постинтубационный, 51–73 % – посттрахеостомический [24, 37, 41, 48].

Травмы шеи находятся на третьем месте среди причин возникновения рубцового стеноза трахеи, составляя 4,8–12 % от общего числа заболеваний [57, 59].

Во многом возникновение РСТ связано с особенностями регионарного кровотока. Мембранозная часть трахеи кровоснабжается значительно лучше, чем передняя стенка [36, 50]. При длительной ИВЛ и выраженном трахеите в воспалительный процесс вовлекаются хрящевые полукольца с развитием деструктивного хондрита и замещением нормального гиалинового хряща соединительной тканью – формируется РСТ [19].

Большое значение в развитии постинтубационных осложнений придают микробной контаминации. У 36–40 % больных на 2–6-е сутки ИВЛ выявляется трахеобронхит, нозокомиальная пневмония. Известно, что воспаление слизистой оболочки и хрящей вызывает локальный аутоиммунный ответ и приводит к развитию хронического воспаления и рубцово-фиброзной деформации [24].

Среди многочисленных методов лечения РСТ радикальным является циркулярная резекция трахеи. Продолжается поиск патогенетически обоснованных методов профилактики несостоятельности трахеального

анастомоза после резекции, прежде всего направленных на стимуляцию регенерации ее стенки с методами физического воздействия, биологически активных веществ, клеточных технологий [68, 76, 80, 119, 120, 122, 123, 124, 129].

Нарушение регенерации стенки трахеи связано с развитием аутоиммунного воспаления, сегментарным характером кровоснабжения, с его дефицитом в хрящевой части трахеи, присоединением госпитальной ассоциативной микрофлоры, развитием системной гипоксии.

Фактором, прежде всего обеспечивающим регенерацию, является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor). VEGF – сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимуляции васкулогенеза и ангиогенеза. Основная функция VEGF – формирование сосудов в период эмбриогенеза, в том числе коллатерального кровообращения. Белки VEGF служат частью системы, отвечающей за обеспечение кислородом тканей в условиях дефицита периферической циркуляции [98, 115]. В эксперименте на белых крысах при моделировании повреждения миокарда показано, что при внутривенном введении VEGF-164 в перинекротической зоне наблюдалось более плотное расположение капилляров и увеличение их обменной поверхности по сравнению с контрольными животными [4].

Механизмы регенерации при использовании VEGF недостаточно изучены, несмотря на данные о его положительном влиянии на регенерацию нервной ткани, печени, сердца, толстой кишки, кожного покрова [77, 97, 116, 121]. Необходимо уточнить возможность стимуляции регенерации воздействием VEGF после восстановительных операций на трахее. Известно, что использование VEGF увеличивает плотность сосудов, улучшает эпителизацию слизистой оболочки трахеи и сдерживает образование фиброзной ткани. Но есть другая точка зрения – применение VEGF для указанной цели не эффективно [83, 85, 114, 130].

Поэтому роль фактора роста сосудов и эндотелия в регенерации стенки трахеи в условиях хирургической реконструкции нуждается в дополнительном изучении.

Исследование изменчивости механизмов регенерации трахеальной стенки под влиянием биоконпозиционного материала, содержащего сосудистый

эндотелиальный фактор роста, возможно, позволит определить значимость локального воздействия на ключевые механизмы саногенеза при хирургическом восстановлении трахеи.

Цель исследования

Изучить механизмы регенерации стенки трахеи после восстановительной операции с использованием фактора роста эндотелия сосудов.

Задачи:

1. Изучить основные причины развития рубцового стеноза трахеи и его осложнений. Проанализировать результаты консервативного и парахирургического лечения.
2. Изучить причины и особенности развития осложнений после циркулярной резекции трахеи и формирования трахеотрахеального анастомоза.
3. Разработать биоконпозиционный материал, содержащий VEGF, и методику его размещения в зоне оперативного вмешательства в эксперименте.
4. Оценить в сравнительном аспекте влияние VEGF на регенерацию стенки трахеи, а также показатели неспецифических факторов защиты в послеоперационном периоде в эксперименте;

Научная новизна

Подтверждено, что основная причина развития постинтубационного, посттрахеостомического РСТ – ишемия передней стенки трахеи с прогрессированием трахеита в результате контаминации дыхательных путей ассоциированной госпитальной инфекцией.

В клинических наблюдениях показано, что при сужении трахеи 3–4-й степени в течение пяти месяцев в 21,4 % наблюдений развивается дыхательная недостаточность средней и тяжелой степени с последующим развитием легочной гипертензии.

В эксперименте разработана модель сужения трахеи более 50 %, позволяющая изучить нарушения дыхания и сердечной деятельности в раннем послеоперационном периоде.

Установлено, что предложенный в эксперименте метод стимуляции локальной регенерации при помощи пленки пролонгированного действия [14] позволяет использовать биоконпозиционный материал с фиксацией его в зоне оперативного вмешательства до 21 суток. В течение этого времени происходит элиминация VEGF с максимальным повышением концентрации в плазме крови на третьи сутки.

В эксперименте установлена высокая эффективность профилактики развития РСТ и несостоятельности швов трахеи после восстановительной операции при применении VEGF. Она проявляется увеличением количества и площади сосудов, ограничением воспаления, стимуляцией неспецифического звена иммунитета, ранней эпителизацией слизистой оболочки, уменьшением толщины послеоперационного рубца и улучшением его прочности.

Предложена концепция механизмов регенерации стенки трахеи после восстановительной операции при локальном воздействии VEGF в эксперименте.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена объемом клинического и экспериментального материалов с применением лабораторных и инструментальных методов исследования, статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации представлены на: V научно-практической конференция молодых ученых Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (Иркутск, 23 июня 2016 г.), VI Съезде хирургов Сибири и Дальнего востока «Актуальные проблемы хирургии» (Иркутск, 23–25 ноября 2017 г.), VI научно-практической конференция молодых ученых Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (Иркутск, 24–25 мая 2018 г.), международной научной конференции «Перспективы развития биомедицинских

технологий в Байкальском регионе» (Иркутск, 5–7 февраля 2019 г.), VII научно-практической конференции молодых ученых Сибирского и Дальневосточного федеральных округов (Иркутск, 21–22 мая 2020 г.), региональной научной конференции «Трансляционные исследования биомедицинских технологий» (Иркутск, 18 июня 2021 г.)

По теме диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работ, в том числе 12 статей в рецензируемых научных журналах, включенных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ в список изданий, рекомендуемых для публикации основных научных результатов диссертационных работ, из них 4 – в базе данных Scopus. Получено два патента на изобретение Российской Федерации.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в ретроспективном анализе историй болезни пациентов с рубцовым стенозом трахеи, разработке концепции и выполнении эксперимента, апробации результатов исследования, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по выполненной работе и оформлении текста диссертации.

Практическая значимость

Изготовлена оригинальная лекарственная пленка пролонгированного действия, содержащая VEGF.

Дано экспериментальное обоснование и доказана эффективность ее локального применения. Возможна трансляция разработанного метода в клинику торакальной хирургии.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 108 страницах, содержит 19 таблиц и 31 рисунок, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований и списка литературы, включающего 60 источников на русском языке и 92 публикации зарубежных авторов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на основании клинического и экспериментального исследований. Первое представлено ретроспективным анализом результатов хирургического лечения пациентов, страдающих стенозом трахеи. Экспериментальный этап включает две серии опытов. Этапы работы соответствуют поставленным задачам.

Положения, выносимые на защиту

1. Осложнения хирургического лечения пациентов с рубцовым стенозом трахеи, в частности несостоятельность анастомоза после циркулярной резекции, обусловлены дефицитом тканевого кровоснабжения передней стенки трахеи и контаминацией дыхательных путей нозокомиальной ассоциативной микрофлорой, что подтверждено исследованием анатомии трахеи крыс линии «Wistar» и в эксперименте.

2. Использование лекарственной пленки пролонгированного действия, содержащей VEGF, в эксперименте – эффективный метод профилактики формирования рубцового стеноза трахеи после перенесенной реконструктивной операции за счет уменьшения показателей воспаления, стимуляции неспецифических факторов защиты, улучшения васкуляризации стенки трахеи, уменьшения толщины рубца и сокращения сроков заживления трахеотомной раны с эпителизацией.

3. В эксперименте ведущим механизмом регенерации стенки трахеи при использовании разработанной биоконструкции, содержащей VEGF, следует считать улучшение микроциркуляции в зоне повреждения за счет стимуляции ангиогенеза.

ГЛАВА 1 РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ ТРАХЕИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ХИРУРГИЧЕСКОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА

1.1 Механизмы формирования рубцовых стенозов трахеи

Рубцовый стеноз трахеи – одно из наиболее тяжелых осложнений продленной оротрахеальной интубации, трахеостомии, травмы шеи [38, 51, 57, 59]. Ежегодный прирост пациентов с данной патологией составляет около 5 % [2]. Многие аспекты патогенеза, диагностики, профилактики и оперативного лечения РСТ достаточно изучены. Между тем, до 28 % хирургических вмешательств на трахее сопровождаются различными осложнениями, в результате которых 10 % пациентов погибают [41].

Страдающие РСТ наблюдаются в течение длительного времени, неоднократно госпитализируются в лечебные учреждения, где выполняются многоэтапные реконструктивные операции, после которых до 25 % из них становятся инвалидами [38, 57, 59].

Четвертая часть пациентов находятся на инвазивной вентиляции легких более одной недели. Частота осложнений длительной ИВЛ достигает 80 % [8, 24, 37, 41, 48]. Из них на долю РСТ приходится до 25 % наблюдений.

Ключевая причина возникновения РСТ – контакт интубационной трубки со слизистой оболочкой трахеи. Главным травмирующим фактором считается высокое давление в ее манжете и компрессия стенки с нарушением капиллярного кровотока [51, 60].

Осложняет ситуацию присоединение инфекции. Чаше обнаруживается госпитальная ассоциированная микрофлора [1, 22, 47, 51], основными представителями которой являются золотистый стафилококк, синегнойная палочка, протей, клебсиелла, грибы и другие [22, 32, 51].

В истории хирургии РСТ известны разные классификации этой патологии [36, 40, 52, 99, 102], но наиболее обоснованной, позволяющей формировать

диагностический алгоритм и лечебную тактику, считается предложенная В. Д. Паршиным [33, 35], которая включает все варианты формирования рубцовых стенозов трахеи. По этиологии выделяют врожденный, постинтубационный, посттрахеостомический, посттравматический, послеоперационный, идиопатический стенозы; по локализации – гортань (с поражением подскладочного отдела, голосовых складок), шейный отдел трахеи, верхнегрудной, среднегрудной, надбифуркационный, мультифокальные поражения; по степени сужения – 1 (просвет сужен $< 1/3$ диаметра), 2 (от $1/3$ до $1/2$ диаметра), 3 (от $1/2$ до $2/3$ диаметра), 4 ($> 2/3$ диаметра); по протяженности: 1 ($< 15\%$ длины трахеи), 2 ($16\text{--}30\%$ длины трахеи), 3 ($31\text{--}60\%$ длины трахеи), 4 ($> 60\%$ длины трахеи); по анатомической форме поражения – переднебоковые стенки, циркулярное сужение, атрезия. Отдельно учитывают наличие или отсутствие трахеостомы, трахеомалации [10, 34].

Изменения в стенке трахеи возникают с момента воздействия на нее манжеты трахеостомической канюли или интубационной трубки – макроскопические, видимые при проведении эндоскопического исследования или осмотр органа при аутопсии, и микроскопические (гистологическое изучение материала). При повреждении в стенке трахеи реализуются процессы регенерации и деструкции на фоне аутоиммунного и (или) бактериального воспаления. Все стадии протекают одновременно и самостоятельно не купируются [18].

Изменения возникают в сроки от 1 до 20 суток ИВЛ и при проведении фибробронхоскопии (ФБС) проявляются острым трахеитом, эрозиями слизистой оболочки [22, 37, 38, 51]. Грануляционная ткань образуется в сроки от 1 до 7 недель после интубации. Формируется рубец в течение 3 месяцев. Ряд авторов [51, 106] в формирование РСТ включает понятие воспалительной псевдоопухоли как разновидности грануляционного стеноза трахеи.

При микроскопическом исследовании слизистой оболочки изменения обнаруживаются в первые часы после интубации. Позднее процесс распространяется на все слои стенки трахеи. На третьи сутки образуются острые

эрозии слизистой оболочки, наблюдается метаплазия эпителия. С седьмых суток ИВЛ в слизистой оболочке трахеи начинается формирование грануляционной и фиброзной ткани. Больше всего страдает подслизистый слой [18, 19]. С первых суток ИВЛ появляются дистрофические изменения в хрящах трахеи с потерей хондроцитов. На вторые сутки дистрофические изменения усиливаются, отмечается пикноз ядер, к третьим наступает отслойка перихондрия, в хряще отсутствуют хондроциты, формируются очаги некроза. Через 7 суток активизируются процессы заживления, что проявляется в очаговой пролиферации хондроцитов, секвестрации некротизированного хряща, утолщении и фиброзе перихондрия [18, 22, 38, 106].

1.2 Способы моделирования патологической регенерации трахеальной стенки

Известна модель РСТ аппликацией 70%-го раствора уксусной кислоты через тубус ригидного бронхоскопа тампоном на штуцере в средней трети трахеи по передней и боковым стенкам на протяжении 1,5–2,0 см, с экспозицией 10 с. В этом месте возникал коагуляционный некроз, в течение двух месяцев приводящий к формированию РСТ в зоне ожога [44].

Для этого же используется скарификация слизистой оболочки трахеи на протяжении 1–1,5 см с последующей моноактивной диатермокоагуляцией. У животных на месте травмы слизистой оболочки образовывались грануляции. К концу 8–10-й недели они преобразовывались в фиброзную ткань, суживающую просвет трахеи или главных бронхов [45].

Известные способы моделирования сужения трахеи вызывали необратимые изменения в стенке органа, сопровождающиеся разрастанием соединительной ткани. Выполнение этих экспериментальных исследований возможно только на крупных лабораторных животных. Кроме того, по механизму формирования РСТ они отличаются от повреждения стенки трахеи в результате длительной оротрахеальной интубации и трахеостомии.

Реконструктивные операции по поводу РСТ в эксперименте

Известен способ формирования трахеального анастомоза, который предполагает наложение швов на боковые стенки сшиваемых концов трахеи. Узлы формируют со стороны адвентиции. Короткий конец лигатуры берут на держалку, а длинный используют для непрерывного шва по всей длине анастомоза. Вначале ушивают боковую стенку со стороны первой лигатуры, затем прошивают мембранозную часть и противоположную боковую и переднюю стенки. Вкол иглы для каждого стежка проводят со стороны слизистой оболочки, а выкол – со стороны адвентиции. По окончании формирования анастомоза узел завязывают, используя для этого оставшийся длинный и короткий концы лигатуры от первого шва, держалки удаляют [46].

Для восстановления трахеи после ее резекции используют аллотрансплантаты, коллагеновые губки, конструкции из никелида титана, полипропиленовой сетки, тонкую кишку, большой сальник, лоскуты легочной ткани [69, 94, 95, 103, 127, 132, 135]. Для улучшения регенерации использовались биологически активные вещества: b-FGF, гиалуроновая кислота, SIS, выделенные эпителиальные клетки [64, 104, 110, 128, 131, 134].

Известна операция, когда проводилась резекция передней стенки трахеи кроликов в пределах $1/3$ ее окружности и длиной шесть колец. Аутоотрансплантат замачивали в физиологическом растворе, содержащем VEGF (5 мкг/мл), в течение 15 мин. Затем восстанавливали трахею. В результате выявлено ограниченное разрастание соединительной ткани по сравнению с группой контроля (аутоотрансплантация без VEGF). Плотность сосудов была выше на всех сроках исследования (2 недели, 4 недели, 87 недель) [85].

Использование различных лабораторных животных: крыс, кроликов, собак, свиней, овец, – возможно из-за сходного анатомического строения трахеи у всех млекопитающих. Выбор способа выполнения повреждения стенки трахеи необходимо проводить в зависимости от предполагаемого объема повреждения тканей, технических возможностей выполнения и экономической целесообразности эксперимента.

1.3 Профилактика и лечение рубцового стеноза трахеи

Общепринятые методы профилактики постинтубационных и посттрахеостомических стенозов трахеи – контроль давления в манжете интубационной трубки, ее ежедневная замена, санация трахеобронхиального дерева растворами антисептиков и гормонов, использование физиолечения, в частности, магнитотерапии и диадинамотерапии, адекватная антибиотикотерапия [22, 38]. Для этой же цели используются аппликации коллагеназы, применяют озонотерапию, орошение оксидом азота [11, 39, 54].

Для профилактики повреждения слизистой оболочки трахеи используется эндоскопическое облучение гелий-неоновым лазером. В результате отмечалось повышение концентрации антибиотиков в бронхах, улучшение экспекторации мокроты и активация местной иммунной защиты дыхательных путей [54].

Продолжается поиск патогенетически обоснованных методов профилактики развития РСТ с использованием биологически активных веществ и антиоксидантов [122, 123].

Описан метод лечения грануляционного стеноза трахеи: использование изониазида в сочетании с криотерапией [68]. Изониазид ингибирует липоксигеназу за счет прямой конкуренции с пиридоксаль-фосфатом, угнетая образование коллагена и уменьшая его прочность [137]. Кроме того, изониазид ингибирует рост фибробластов, препятствует образованию грануляционной ткани и предотвращает формирование стеноза трахеи.

Известны результаты местного использования гепарина – улучшалась эпителизация слизистой оболочки трахеи и снижался индекс фиброза трахеи. По мнению авторов, гепарин ингибирует пролиферацию фибробластов, уменьшает их количество в месте травмы, препятствует неоангиогенезу и уменьшает отек [76, 129].

Пациентам при впервые выявленном РСТ, как правило, назначают бужирование трахеи. Рестеноз возникает в 77,6 % [38, 57].

Широкое применение получили эндоскопическая криодеструкция, лазерная реканализация, радиоволновое рассечение зоны стеноза. Эти методы повышают эффективность лечения, но в 50 % случаев стеноз рецидивирует [6, 57].

При использовании эндотрахеальных стентов у пациентов улучшается функция внешнего дыхания, однако в отдаленном периоде процедура осложняется миграцией стентов, ростом грануляционной ткани, рестенозом после его удаления [6, 11, 38, 57, 58].

Радикальный метод лечения РСТ – циркулярная резекция трахеи (ЦРТ). Неудовлетворительные результаты после проведенного лечения отмечаются в 14,9 % наблюдений, частота послеоперационных осложнений может достигать 28 %, летальность составляет от доли до 10 % [23, 38, 41, 57].

При невозможности выполнения ЦРТ вследствие хондромалиции, большой протяженности стеноза или осложнений предыдущих оперативных вмешательств выполняют Т-образное стентирование, после которого частота рестенозов достигает 29,5 % [38, 42, 57, 59].

Ряд исследователей используют искусственный протез трахеи в виде полиэфирной сетки, покрытой фиброколлагеном. В результате проведенного эксперимента отмечались эпителизация протеза и неоангиогенез без избыточного разрастания соединительной ткани. Изучены результаты в первые 10 суток после оперативного вмешательства; из осложнений отмечалось развитие респираторного дистресс-синдрома у крыс [79].

В другом исследовании на кроликах выполнена аутотрансплантация невазкуляризированного сегмента трахеи. В 86 % случаев сохранены его жизнеспособность, дыхательная функция и отмечен неоангиогенез. Результаты оценивались также только в раннем послеоперационном периоде [91].

Активно ведутся исследования в области аллотрансплантации тиреотрахеального комплекса, отработаны техника забора, модель трансплантации на собаках, изучены реперфузионные изменения в донорских органах. Выполнены успешные трансплантации в клинике [31, 49, 50].

Перспективным методом лечения РСТ считается использование трансплантация стволовых клеток на искусственных или донорских носителях. Отмечается хорошая приживаемость, отсутствие аутоиммунных реакций, реэпителизация и неоангиогенез без продукции избыточной соединительной ткани [9, 66, 84, 88, 92, 133].

Таким образом, основные методы профилактики РСТ и стимуляции регенерации тканей стенки трахеи направлены на ограничение воспаления, роста грануляций. Не менее важно создать условия для улучшения кровоснабжения в зоне оперативного вмешательства с развитием новых сосудов за счет фактора роста эндотелия.

1.4 Роль фактора роста эндотелия сосудов в регенерации стенки трахеи

Разработка методов стимуляции регенерации стенки трахеи после ее хирургической реконструкции, в частности применение факторов роста сосудов и эндотелия, – актуальное направление.

С этой точки зрения перспективно локальное или системное применение VEGF.

Основные функции VEGF – образование сосудов в период эмбриогенеза и формирование коллатерального кровообращения. VEGF представляет собой гепарин-связанный гомодимерный гликопротеин с молекулярной массой 45 кДа. Ангиогенные эффекты представителей семейства VEGF опосредованы взаимодействием лиганда VEGF и рецептора VEGFR [86].

В большинстве своем VEGF экспрессируется в эндотелиальных клетках в результате недостаточной концентрации кислорода, что стимулирует его высвобождение. Это основной путь экспрессии VEGF большинством типов клеток. Фактор определяется в плазме и сыворотке крови. Затем циркулирующий белок VEGF связывается с VEGF-рецептором на клетках эндотелия и посредством активации действия тирозинкиназы запускает ангиогенез [141]. Роль VEGF проявляется в эмбриогенезе и раннем постнатальном периоде [118].

Известно несколько типов VEGF, каждый из которых имеет аминокислотные изоформы. Основное различие между ними заключается в степени аффинности к гепарину. Роль различных форм VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PlGF) и их рецепторов обусловлена типом эндотелиальных клеток и спецификой органов [74]. В процессах регенерации тканей стенки трахеи наибольшую роль играет VEGF-A, который активируется при гипоксии. Действие VEGF 165 (VEGF-A) является дозозависимым. Он ингибирует миграцию эндотелиальных клеток, опосредованную пролиферацию и расширение артерий [7, 61, 62, 72, 81, 89, 96, 101, 105, 109, 117, 138, 139, 140, 141, 144, 146].

Семейство рецепторов VEGF включает в себя три варианта тирозинкиназы (VEGF VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR или Flk-1), VEGFR3 (Fit-4)) и два нетирозинкиназных варианта: нейропилины-1 (NRP-1, корецептор VEGFR2) и нейропилины-2 (NRP-2, корецептор VEGFR3). Рецепторы тирозинкиназы имеют общие свойства: состоят из семи подобных иммуноглобулину структур во внеклеточной, трансмембранной и тирозинкиназной областях. Нетирозинкиназные рецепторы не обладают собственной киназной активностью, но усиливают передачу сигналов к рецепторам VEGF [63, 67, 75, 86, 90, 93, 100, 112, 142, 148, 149, 150, 151].

Образование VEGF в организме регулируется рядом различных факторов: HIF-1, TNF- α , TGF- β , EGF, PDGF-BB, IGF-1, Stat3, PGE2, эстрогены, прогестины [65, 70, 71, 78, 87, 108, 111, 125, 136, 143, 145, 152]. Один из основных стимулов для выработки VEGF – гипоксия, поскольку индуцируется выработка эритропоэтина (EPO, erythropoietin) гликопротеин, отвечающего за продукцию эритроцитов костным мозгом. Образование EPO в клетках печени и почек напрямую зависит от концентрации кислорода в крови [147].

Влияние VEGF на ангиогенез обусловлено стимуляцией пролиферации эндотелиальных клеток, регуляции продукции матричных металлопротеиназ и увеличением продукции оксида азота (NO). В результате стимуляции NO-синтазы происходит расширение сосудов и повышение их проницаемости. Кроме

того, VEGF вызывает миграцию эндотелиальных клеток и ингибирует их апоптоз [73]. VEGF способствует образованию лимфатических сосудов, воздействует на уровень иммунитета, стимулируя хемотаксис моноцитов и подавляя формирование дендритных клеток. Также он оказывает влияние на накопление стволовых гемопоэтических клеток в зонах ангиогенеза и их выживаемость. Гемопоэтические стволовые клетки имеют сродство к эндотелиальным, и VEGF опосредованно контролирует их выживание и репопуляцию. Влияние на липидный обмен осуществляется через стимуляцию эпидермального фактора роста, основного фактора фибробластов, тромбоцитарного ростового фактора и интерлейкина-1 [82].

Продукция VEGF повышается в ишемизированных тканях, улучшая их кровоснабжение за счет формирования коллатеральных сосудов. Так, уровень VEGF выше у больных ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровыми. Повышение количества фактора отмечается в подострой фазе инфаркта миокарда [25]. При состоявшемся инфаркте миокарда отмечалось новообразование сосудов на границе некротизированной зоны, начиная с третьих суток исследования [121].

Выяснено, что VEGF-A – один из факторов заживления ран за счет воздействия его на нейтрофилы и моноциты [98]. При введении в рану препарата в эксперименте увеличивались количество лейкоцитов и их адгезия к тканям в связи с молекулярными изменениями на поверхности эндотелиальных клеток. Лейкоциты провоцировали выработку цитокинов, включая IL-1 β и TNF- α , которые вместе с трансформирующим фактором роста β (TGF- β , transforming growth factor β), полученным от тромбоцитов и сыворотки, содержат факторы, вызывающие экспрессию гена *VEGF-A* в кератиноцитах, локализованных в краях раны. Его выделение в этих клетках также отрегулировано HIF-1 [115].

Проведено исследование роли VEGF-A в патогенезе РСТ. Проанализировано наличие матричной РНК (мРНК) VEGF-A, VEGFR-1 и VEGFR-2 у пациентов после длительной интубации трахеи. Сильная экспрессия мРНК VEGF-A выявлена в гиперпластическом плоском эпителии, лежащем

над грануляционной тканью. Это же касается VEGFR-1 и VEGFR-2. мРНК VEGF-A или ее рецепторы не были выявлены в зрелой рубцовой ткани или интактной трахее. Полученные данные свидетельствуют о важной роли VEGF-A в патогенезе рубцовой трансформации тканей трахеи [113].

В грануляционной ткани отмечалась повышенная экспрессия TGF- β_1 и VEGF. Высший уровень этого показателя отмечен в подслизистом слое трахеи. По сравнению с контрольной группой в грануляциях наблюдалось значительно большее количество сосудов малого диаметра. *In vitro* TGF- β стимулировал продуцирование VEGF культивированными фибробластами. Его обработка siRNA привела к значительному уменьшению продукции VEGF, индуцированной TGF- β_2 , SIS3 [126].

При аутотрансплантации кроликам трахеи, обработанной VEGF, отмечалось сохранение структуры, увеличение плотности сосудов, снижение подслизистого фиброза и уменьшение воспаления в зоне операции [85]. Уменьшается количество грануляционной ткани и улучшаются процессы заживления. Также отмечено, что активируется выработка собственного VEGF в подслизистых железах и плазматических клетках [130].

J. W. Schroeder Jr и соавт. выполняли моделирование раны гортани с аппликацией коллагеновой губки, пропитанной VEGF. Установлено, что местное применение VEGF не оказывало существенного влияния на эпителизацию слизистой оболочки трахеи, местную воспалительную реакцию или регенерацию тканей трахеи [114].

D. L. Walner и соавт. при оценке влияния TGF- β , тромбоцитов, фибронектина, тенасцина, TGF- α и VEGF на заживление раны после реконструкции субглоточного стеноза показали, что при нормальном заживлении раны отмечалась положительная корреляция с сосудистым фибронектином, сосудистым тенасцином и стромальным фибронектином. У пациентов с длительным заживлением раны обнаружена положительная корреляция со стромальным сосудистым эндотелиальным фактором роста [107].

Комбинирование фибриновой матрицы и VEGF при аллотрансплантации продемонстрировало повышенную скорость реэпителизации и повышенную плотность ($37 \pm 2,9 \%$) морфологически нормального ресничного псевдостратифицированного эпителия по сравнению с иммуносупрессированной контрольной группой ($29,3 \pm 9,1 \%$) через 35 дней после трансплантации [133].

Итак, РСТ достаточно часто встречается у пациентов на фоне или после длительной инвазивной вентиляции легких. Разнообразные методы парахирургических и резекционных вмешательств нередко сопровождаются серьезными осложнениями в послеоперационном периоде, особенно это касается трахеальных анастомозов. Несостоятельность швов, как правило, развивается по передне-боковым стенкам соустья. Это связано с дефицитом кровоснабжения тканей этой части трахеи и выраженными воспалительными процессами в результате контаминации верхних дыхательных путей ассоциативной нозокомиальной микрофлорой.

Анализ литературы показал, что местное или системное применение VEGF может оказывать влияние на регенерацию стенки трахеи. По данным ряда авторов, он увеличивает скорость эпителизации, уменьшает выраженность воспалительной реакции организма и способствует образованию новых сосудов. В ряде других исследований отмечался избыточный рост грануляционной и соединительной ткани, что вело к формированию стеноза трахеи. В связи с неоднозначными результатами применения VEGF исследование механизмов его воздействия на стенку трахеи представляет собой перспективное направление современной регенеративной медицины и нуждается в дальнейшем изучении.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертация представляет итог клинико-экспериментальных исследований, выполненных автором в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (ИНЦХТ) (НИР 063 «Биомедицинские технологии профилактики и лечения органной недостаточности в реконструктивной и восстановительной хирургии», № госрегистрации 01201280993, сроки выполнения 2013–2021 гг.).

2.1 Характеристика клинических наблюдений

Проведен ретроспективный анализ результатов лечения пациентов (118 историй болезни), находившихся в отделении торакальной хирургии ОГБУЗ «Иркутская ордена «Знак почета» областная клиническая больница» (ОГБУЗ ИОКБ) (главный врач – к. м. н. П. Е. Дудин, заведующий отделением – к.м.н. В. Н. Махутов) по поводу рубцового стеноза трахеи.

Отбор проводился по кодам Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) J95.5. Критерии включения в исследование: пациенты с РСТ и ларинготрахеальным стенозом. Критерий исключения: онкологические заболевания трахеи и гортани.

В исследование включен 51 пациент (25 мужчин и 26 женщин) 17–80 лет. Медиана возраста составила 40 (32–60) лет (Рисунок 1). Большинство из них трудоспособного возраста: от 20 до 60 лет – 70,6 % ($n = 36$); от 30 до 40 лет – 31,4 % ($n = 16$).

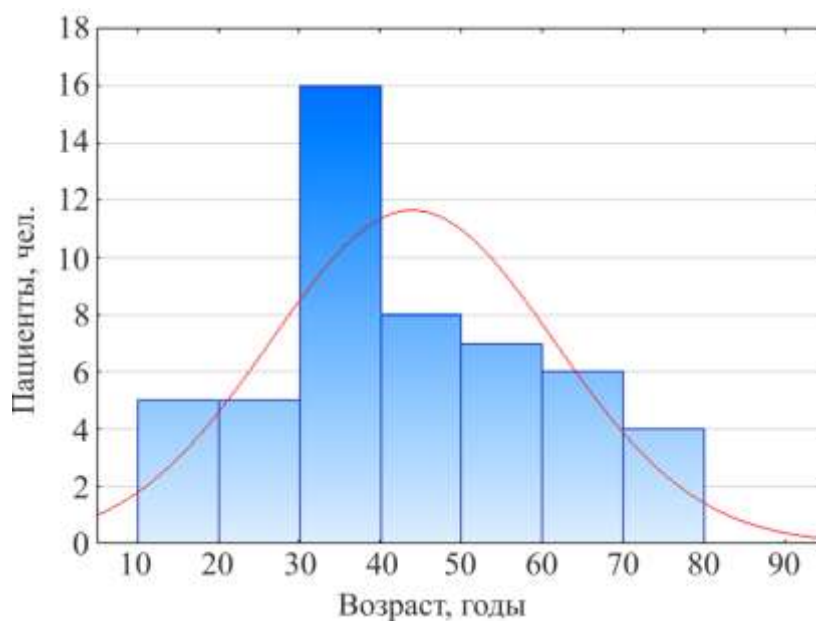


Рисунок 1 – Распределение пациентов со стенозом трахеи по возрасту

При анализе учитывались: возраст, пол, заключительный диагноз, причины развития РСТ, длительность заболевания, данные обследования, методы лечения, наличие осложнений, сопутствующая соматическая патология, исход госпитализации.

Методы исследования в клинике. Всем пациентам проведено стандартное клинико-лабораторное обследование. Кроме того, выполнялись эхокардиография (ЭХО-КГ), ФБС, мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), спирография.

Инструментальные методы исследования. ФБС выполнялась эндоскопом FB-19 TV (Pentax, Япония), а ригидная бронхоскопия – прибором 10339 A (Karl Storz, Германия) в отделениях эндоскопии (заведующий – Е. В. Храмцов) и торакальной хирургии ОГБУЗ ИОКБ.

Для изучения стенки трахеи, локализации стеноза и вовлечения в процесс окружающих тканей выполняли МСКТ с внутривенным усилением на аппарате Somatom Definition AS (Siemens, Германия) в отделении рентгеновской и магнитно-резонансной томографии ОГБУЗ ИОКБ (заведующий – д. м. н. В. А. Шантуров).

Функция внешнего дыхания оценивалась на аппарате Spirovit SP-1 (Schiller, Швейцария) в отделении функциональной диагностики ОГБУЗ ИОКБ (заведующий – О. А. Земченко).

Функциональное состояние миокарда и клапанных структур изучалось на аппарате iE33 (Philips, Нидерланды) в отделении ультразвуковой диагностики ОГБУЗ ИОКБ (заведующая – Е. М. Кузубова).

Для оценки микробной контаминации проводился забор материала из ротоглотки, который осуществлялся утром до приема пищи и гигиенических процедур в стерильную емкость. Мазки выполнялись в аэробных условиях, анаэробные микроорганизмы не определялись. Вид, биохимический профиль выделенных микроорганизмов, определение резистентности к различным антибактериальным препаратам осуществляли на автоматизированном бактериологическом анализаторе ATB Expression (Biomérieux, Франция) в бактериологической лаборатории ОГБУЗ ИОКБ (заведующая – А. В. Ветохина).

2.2 Характеристика экспериментальных исследований

Экспериментальный раздел исследования выполнен на базе научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ИНЦХТ (директор – д. м. н., профессор В. А. Сорокинов) на белых крысах-самцах линии «Wistar» 10–12-месячного возраста с массой тела 300–350 г (160 животных).

Животных содержали в виварии на рационе питания, соответствующем нормативам ГОСТ «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ», со свободным доступом к воде и пище с соблюдением стандартных операционных процедур [15]. Все документы, регламентирующие работу вивариев, имелись на протяжении всего времени исследования (виварий I категории, ветеринарное удостоверение 238 № 000360 от 30.04.2013, выдано Службой ветеринарии Иркутской области). В эксперимент включали крыс-самцов в возрасте 10–12 месяцев весом 300–350 г. Эксперимент выполнялся в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием

экспериментальных животных», утвержденными Приказами МЗ СССР № 742 от 13.11.1984 «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.1985 «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных», а также основывались на положениях Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г. с дополнениями от 1975, 1983 и 1989 гг.

Оперативные вмешательства выполнялись в асептических условиях, под общим обезболиванием.

Исследование было одобрено комитетом по этике ИНЦХТ (протокол заседания № 8 от 26.06.2017).

Дизайн экспериментальных исследований представлен на Рисунке 2.



Рисунок 2 – Дизайн экспериментальных исследований

Изучение анатомии трахеи крыс линии «Wistar». В доступной литературе отсутствует информация по детальному описанию топографической анатомии трахеи крыс линии «Wistar», необходимая для оперативных вмешательств [21, 55, 56]. В связи с этим проведена серия исследований по изучению особенностей топографо-анатомического строения органов шеи, включая кровоснабжение, иннервацию, синтопию трахеи. Исследование (острый опыт) выполнено на крысах-самцах линии «Wistar» ($n = 10$). Возраст животных – 10–12 месяцев, вес – 300–350 г.

Визуализацию сосудов проводили следующим образом: пальпаторно определяли верхушечный толчок и в этом месте трансторакально выполняли инъекцию раствора метиленового синего в левый желудочек сердца.

Фотодокументирование выполнялось в стандартном режиме макросъемки фотоаппаратом FinePix S2700HD (Fujifilm, Япония).

После выведения животных из эксперимента забирался органокомплекс для гистологического исследования – трахея, легкие, сердце. Для изучения микропрепаратов использовали метод световой микроскопии.

Анатомические структуры обозначались, согласно терминам Ветеринарной анатомической номенклатуры (N.A.V., Nomina Anatomica Veterinaria) 5-го издания [16].

Влияние сужения трахеи на функцию внешнего дыхания. Для оценки влияния одномоментного сужения трахеи на функцию внешнего дыхания выполнена первая серия экспериментов ($n = 36$). В группе 1.1 ($n = 24$) моделировалось сужение трахеи по оригинальной методике [43]; в контрольную (группу 1.2) включены здоровые животные, содержащиеся в условиях, одинаковых с экспериментальными ($n = 12$). Распределение животных на группы в зависимости от характера воздействия представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных групп в 1-й серии исследований

Группа	Характер воздействия	Кол-во животных	Методы исследования
1.1	Моделирование сужения просвета трахеи	24	Общий анализ крови, иммунологические тесты первого порядка Гистологические исследования тканей в зоне оперативного вмешательства и сердечно-легочного комплекса Бактериологическое исследование Раздельное взвешивание миокарда Измерение толщины миокарда Измерение давления в правом желудочке сердца
1.2	Здоровые животные (норма)	12	
Всего		36	

Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е и 14-е сутки ($n = 6$). Дополнительно по 6 животных – для контроля давления на 14-е сутки и в норме. Забор крови выполняли в утренние часы на голодный желудок. Оценивались общее число лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество эритроцитов и иммунологические тесты 1-го порядка. После эвтаназии проводили аутопсию с забором тканей в области оперативного вмешательства единым блоком – сердечно-легочный комплекс с трахеей и пищеводом. Для гистологического исследования забирался фрагмент трахеи в зоне оперативного вмешательства протяженностью 5 мм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для бактериологического исследования забирали часть трахеи протяженностью 5 мм. Давление в правом желудочке сердца измеряли на 14-е сутки эксперимента. После эвтаназии проводили взвешивание миокарда с измерением его толщины. Исследование выполнено на 6 дополнительных животных на 14-е сутки эксперимента и на 6 животных контроля.

Характеристика оперативных вмешательств в первой серии исследований. За час до операции выполняли премедикацию. В асептических условиях под общей анестезией в условиях операционной животное фиксировали

на столике И. М. Сеченова в положении на спине. На вентральной поверхности шеи ножницами выстригали шерсть, кожу обрабатывали антисептиком трехкратно. Крысу накрывали стерильными пленками, отграничивая операционное поле. Выполняли трахеотомию с размещением и последующей фиксацией силиконовой трубки длиной 10 мм в просвете трахеи. Фиксацию трубки выполняли П-образным швом с одномоментным ушиванием трахеотомной раны. Послеоперационную рану ушивали послойно.

Оперативное вмешательство разделено на несколько этапов: доступ, трахеотомия, размещение силиконовой трубки в просвете трахеи с ее фиксацией, ушивание раны.

Доступ к шейному отделу трахеи выполняли угловым разрезом кожи с формированием косынообразного лоскута, угол которого обращен к левой боковой поверхности шеи. Лоскут отпрепаровывали и отводили на зажиме вправо. Далее мобилизовали слюнные железы в бессосудистой зоне. Грудино-подъязычные мышцы разделяли по срединной линии и отводили на держалках в противоположные стороны. Визуализировали гортань, трахею и щитовидную железу (Рисунок 3).

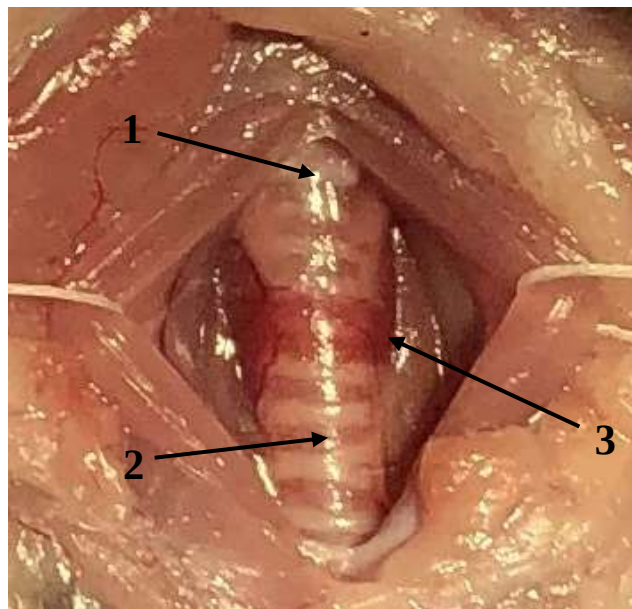


Рисунок 3 – Доступ к трахее:

1 – гортань; 2 – трахея; 3 – щитовидная железа

Трахеотомию выполняли между 7-м и 8-м полукольцами трахеи, на 3 хрящевых полукольца ниже перешейка щитовидной железы по срединной линии через межкольцевую связку полую острую иглой ($r = 0,7$ мм). Полученное отверстие расширяли в поперечном направлении по межкольцевой связке до 1/3 просвета трахеи (Рисунок 4).

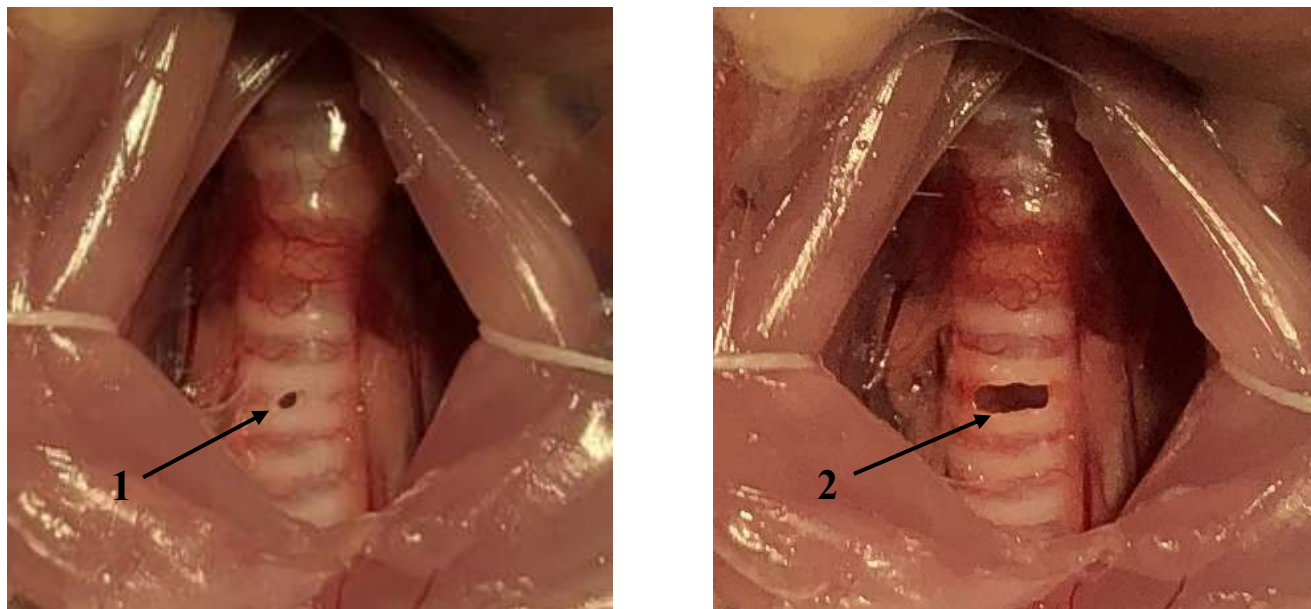


Рисунок 4 – Этапы выполнения трахеотомии:

1 – трахеотомная рана, выполненная иглой; 2 – расширенная трахеотомная рана

Силиконовую трубку с тупыми закругленными концами вводили в просвет трахеи по проводнику. Длина ее составляла 1 см, наружный диаметр – 2 мм, внутренний – 1 мм. Верхний край сопоставляли с нижним краем трахеотомической раны, проводник удаляли (Рисунок 5). Трахеотомическую рану ушивали П-образным швом через выше- и нижестоящие полукольца трахеи с одномоментной фиксацией трубки к внутренней поверхности ее стенки. Для этого нить проводили снаружи внутрь через мембранозную часть между 6-м и 7-м хрящами трахеи с выходом иглы в ее просвет, далее проводили иглу по верхнему краю силиконовой трубки. Следующий выкол осуществляли изнутри к наружной стороне через мембранозную часть передней стенки трахеи между 8-м и 9-м хрящами, выкол проводили на переднюю стенку трахеи. Подобную манипуляцию осуществляли

и с другой стороны, только в обратном порядке. Узел фиксировали на межхрящевом промежутке между 6-м и 7-м хрящами трахеи (Рисунок 5).

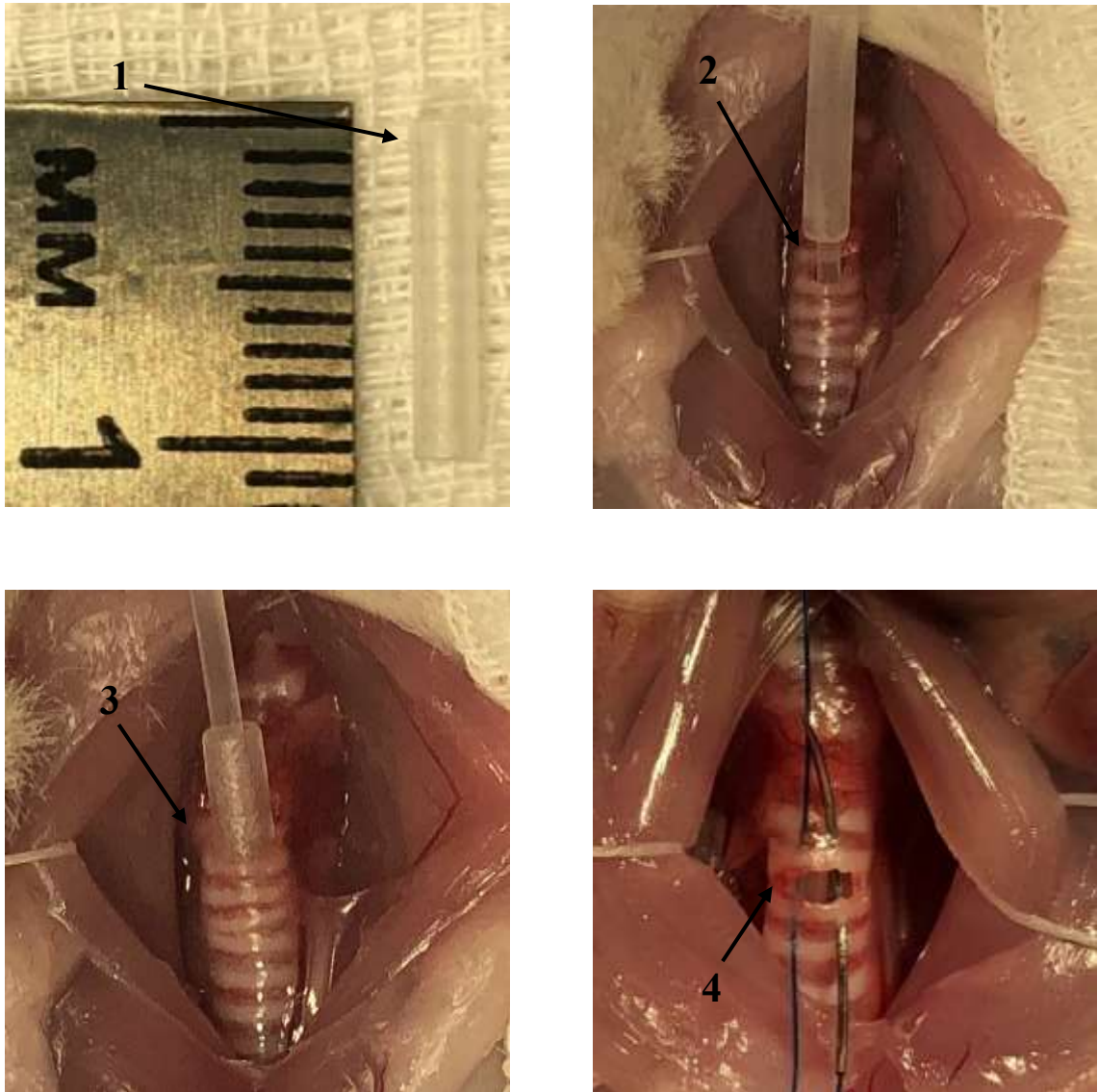


Рисунок 5 – Сужение просвета трахеи: 1 – силиконовая трубка;
2 – введение силиконовой трубки в просвет трахеи по проводнику;
3 – силиконовая трубка введена в просвет трахеи; 4 – фиксация в просвете трахеи П-образным швом с одномоментным ушиванием трахеотомной раны

Далее выполняли послойное ушивание раны: грудино-подъязычные мышцы сопоставляли узловым швом, кожу – непрерывным. В результате операции силиконовая трубка размещалась в просвете трахеи, ее верхний конец зафиксирован (Рисунок 6).

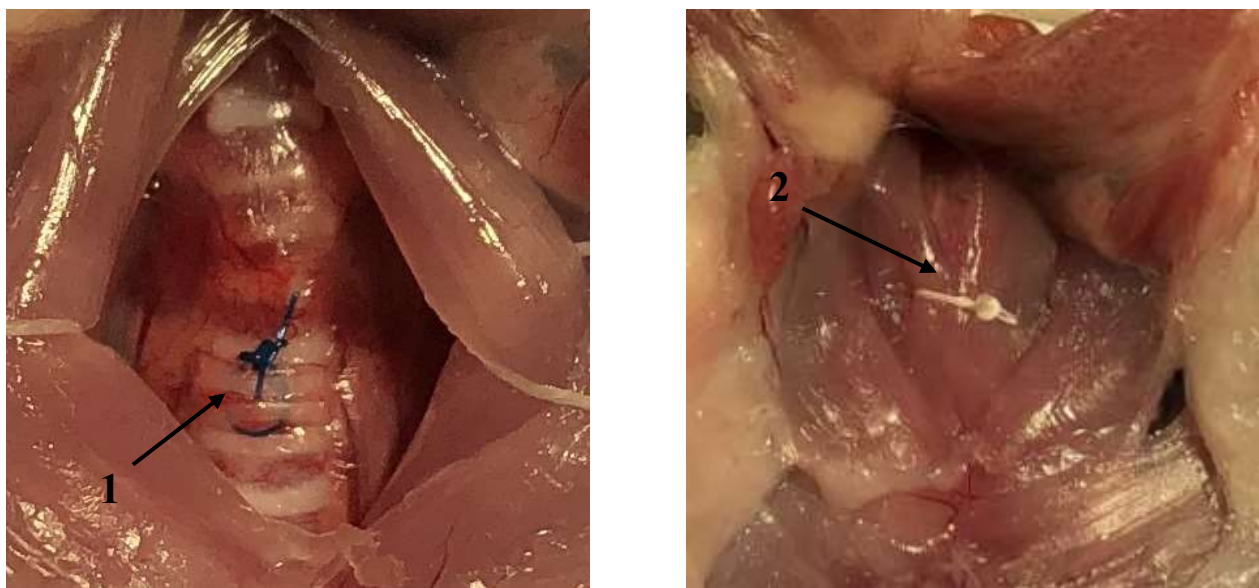


Рисунок 6 – Послойное ушивание раны: 1 – ушивание трахеотомной раны П-образным швом; 2 – ушивание щито-шейных мышц однорядным узловым швом

В послеоперационном периоде осуществлялось введение обезболивающих препаратов в течение первых 3 дней утром и вечером и проводилась обработка послеоперационной раны раствором бриллиантового зеленого.

Оценка возможности стимуляции регенерации стенки трахеи и профилактики сужения ее просвета. Всем животным выполняли линейный разрез на 1 хрящевое кольцо ниже перешейка щитовидной железы протяженностью 2 хрящевых кольца по передней поверхности трахеи. Ушивали рану нитью пролен 7-0 одним Z-образным швом через хрящевое кольцо. Ключевой частью эксперимента было введение крысам биокomпозиционного материала, определяющего в дальнейшем их групповую принадлежность: контрольная группа 2.1 ($n = 36$) – без воздействия, контрольная группа 2.2 ($n = 36$) – в зону оперативного вмешательства размещали пленку из биокomпозиционного материала; основная группа 2.3 ($n = 36$) – в зону оперативного вмешательства размещали пленку из биокomпозиционного материала, содержащую VEGF; контрольная группа 2.4 ($n = 6$) – здоровые животные. Распределение животных на группы в зависимости от характера воздействия представлено в Таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика экспериментальных групп во второй серии исследований

Группа	Характер воздействия	Кол-во животных	Методы исследования
2.1	Моделирование реконструктивной операции на трахее	36	Общий анализ крови, иммунологические тесты Гистологические исследование тканей в зоне операции. Определение концентрации VEGF в плазме крови Ранотензиометрия Бактериологическое исследование
2.2	Моделирование реконструктивной операции с размещением на шов трахеи лекарственной пленки пролонгированного действия размером 5 × 5 мм	36	
2.3	Моделирование реконструктивной операции с размещением на шов трахеи лекарственной пленки пролонгированного действия, содержащей VEGF (200 нг), размером 5 × 5 мм	36	
2.4	Здоровые животные (норма)	6	
Всего		114	

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки ($n = 6$). Забор крови выполняли в утренние часы на голодный желудок. Оценивались общее число лейкоцитов, лейкоцитарная формула, количество эритроцитов, иммунологические тесты 1-го порядка и показатель VEGF в плазме крови. После эвтаназии проводили аутопсию с забором сердечно-легочного комплекса с трахеей и пищеводом единым блоком. Для гистологического исследования забирался фрагмент трахеи в зоне оперативного вмешательства протяженностью 5 мм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для бактериологического исследования забирали часть трахеи ниже зоны оперативного вмешательства протяженностью 5 мм. Ранотензиометрию проводили на фрагменте трахеи в зоне оперативного вмешательства протяженностью 1 см.

Характеристика оперативных вмешательств во второй серии. За час до операции выполняли премедикацию. В асептических условиях под общей

анестезией в условиях операционной животное фиксировали на столике И. М. Сеченова в положении на спине. На вентральной поверхности шеи ножницами выстригали шерсть, кожу обрабатывали антисептиком троекратно. Крысу накрывали стерильными пеленками, отграничивая операционное поле. Выполняли линейный разрез трахеи на 1 хрящевое кольцо ниже перешейка щитовидной железы протяженностью 2 хрящевых кольца по передней поверхности трахеи, ушивание раны нитью пролен 7-0 одним Z-образным швом через хрящевое кольцо с аппликацией на переднюю поверхность трахеи лекарственной пленки пролонгированного действия. Послеоперационную рану ушивали послойно. Оперативные вмешательства протоколировали в операционном журнале.

Цервикотомию выполняли угловым разрезом кожи с формированием косыночкообразного лоскута, угол которого обращен к левой боковой поверхности шеи. Кожный лоскут отпрепаровывали и отводили на зажиме вправо. Слюнные железы мобилизовали в бессосудистой зоне. Грудино-подъязычные мышцы разделяли по срединной линии и отводили на держалках в противоположные стороны. Визуализировали гортань, трахею и щитовидную железу (Рисунок 7).

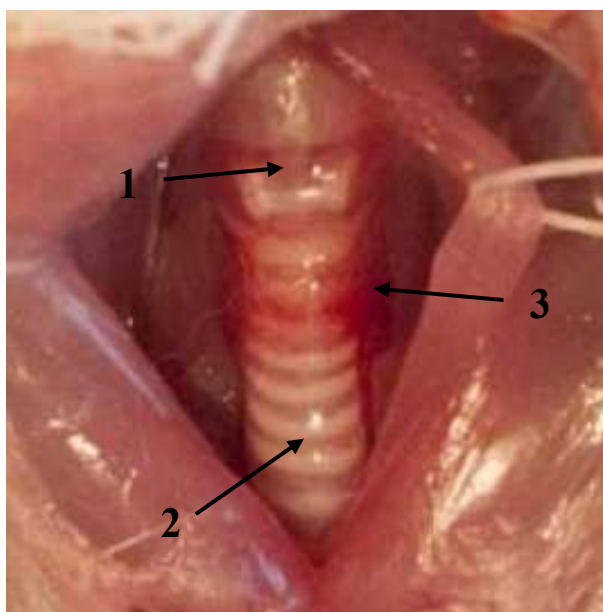


Рисунок 7 – Доступ к трахее:

1 – гортань; 2 – трахея; 3 – щитовидная железа

Выполняли линейный разрез на 1 хрящевое кольцо ниже перешейка щитовидной железы протяженностью 2 хрящевых кольца по передней поверхности трахеи, ушивание раны нитью пролен 7-0 одним Z-образным швом через хрящевое кольцо. Проверили аэро- и гемостаз (Рисунок 8).

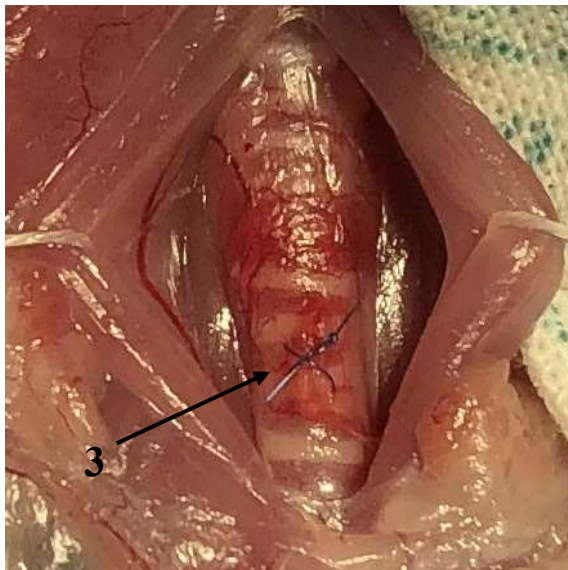
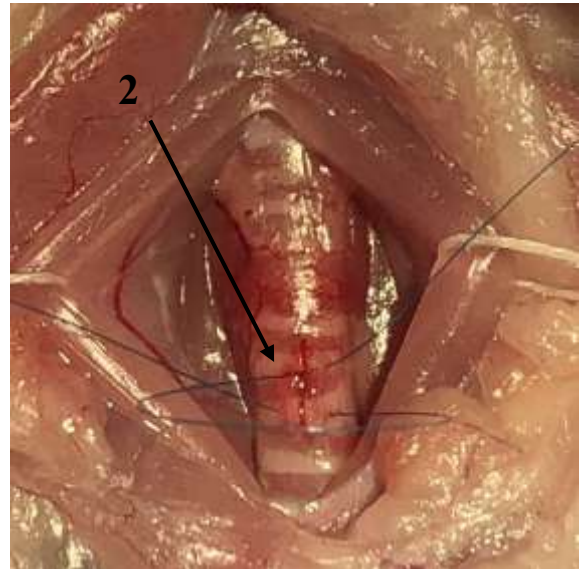
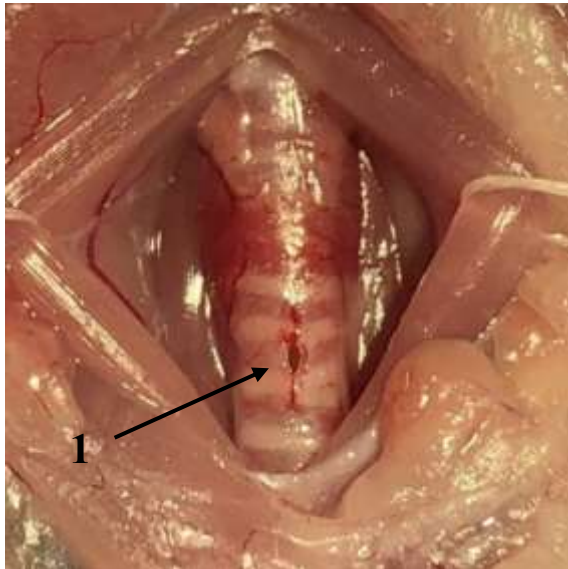


Рисунок 8 – Этапы выполнения реконструктивной операции на трахее:
1 – линейный разрез трахеи; 2 – ушивание раны нитью пролен 7-0 одним Z-образным швом через хрящевое кольцо; 3 – шов на трахее

Размещали биокомпозиционный материал (БКМ) на передней поверхности трахеи на линии шва (Рисунок 9).

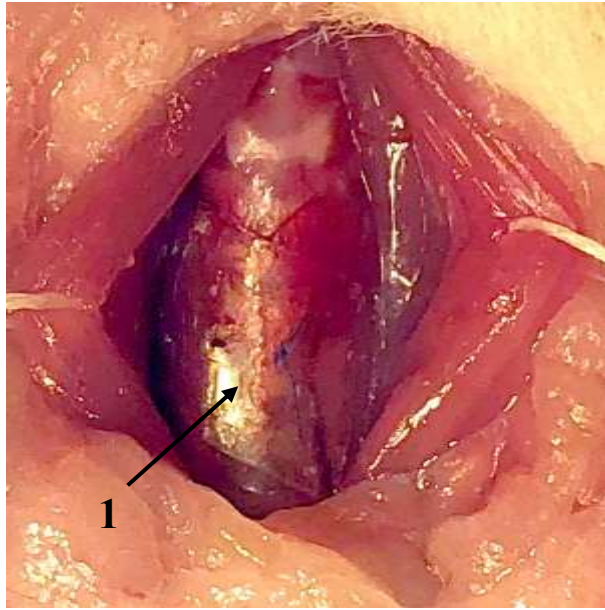


Рисунок 9 – Размещение биокомпозиционного материала:

1 – биокомпозиционный материал на передней поверхности трахеи

Выполняли послойное ушивание раны (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Ушивание послеоперационной раны: 1 – шов кожи

В послеоперационном периоде проводились введение обезболивающих препаратов в течение первых 3 дней утром и вечером и обработка послеоперационной раны раствором бриллиантового зеленого.

2.3 Метод изготовления биокomпозиционного материала

Желатиновые пленки изготавливали в стерильном боксе. Для этого 1,5 массовые части (МЧ) 30%-го водного раствора желатина с 10 МЧ физиологического раствора нагревали до температуры 70 °С, постоянно перемешивая до образования гомогенной жидкой массы. Прекращали процесс ее нагревания, не переставая перемешивать. При остывании до температуры в 50 °С добавляли 1/10 МЧ поливинилпирролидона, при 37 °С – 1 МЧ альбумина, 0,125 МЧ фибриногена, 1 МЧ тромбина, 0,02 МЧ VEGF. Полученную субстанцию разливали в полистироловые формы, предварительно обезжиренные спиртом, равномерно раскладывали 3 МЧ волокон лиофилизированного коллагена. Форму помещали в холодильник при температуре +4–6 °С. Через 48 часов пленки отделяли от основы и затем металлическим лезвием рассекли на фрагменты 5 × 5 мм. Далее пленки подвергали низкотемпературной стерилизации этиленоксидом в течение 5 часов. Каждую из них упаковывали в полиэтиленовую оболочку и герметично закрывали, хранили в холодильнике при температуре +4–6 °С до 14 суток.

Методы исследования в эксперименте

Лабораторные исследования. Кровь забирали из бедренной вены крыс при помощи катетера HELMFLON 24 G 0,7 × 19 мм. Для определения референтных показателей использовали сыворотку крови шести здоровых крыс, содержащихся в одинаковых условиях с экспериментальными.

Общее число лейкоцитов и лейкоцитарную формулу определяли в лабораторном отделе Центральной научно-исследовательской лаборатории Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (ректор – д. м. н., профессор В. В. Шпрах) совместно с к. м. н. Л. В. Зарицкой.

Иммунологические исследования также проводили совместно с Л. В. Зарицкой. Состояние фагоцитарной активности нейтрофилов оценивали по фагоцитарному числу – среднему числу частиц, поглощенных одним активным

нейтрофилом. В качестве фагоцитируемых частиц использовали суспензию дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, инаktivированных при температуре 80–90 °С. Для оценки кислородзависимой биоцидности нейтрофилов применяли спонтанный нитросиний тетразолий (НСТ) тест (НСТ_{сп.}). Методика основана на реакции восстановления нитросинего тетразолия до нерастворимой формы (диформозана) и отложения его гранул внутри и на поверхности фагоцитов. Результат выражали в количестве диформозан-положительных нейтрофилов (в % от общего количества подсчитанных клеток). Для определения функционального резерва нейтрофилов использовали индуцированный НСТ-тест (НСТ_{инд.}), который проводили с добавлением в среду инкубации активатора фагоцитарной реакции.

Уровень VEGF плазмы определяли также совместно с Л. В. Зарицкой. Исследование выполняли с использованием иммуноферментного анализа, единица измерения – pg/ml (тест-система eBioscience Rat VEGF-C Platinum ELISA BMS626/2 BMS626/2TEN, Австрия).

Бактериологические исследования выполнены в лаборатории геномики и межвидового взаимодействия микроорганизмов ИНЦХТ (заведующая – д. б. н. Т. В. Фадеева) совместно с Е. В. Коваль.

Образцы тканей трахеи (1 г) помещались в пробирки с виноградно-сахарным бульоном. Пересев на твердые среды (среда Эндо, 5%-й кровяной агар, желточно-солевой агар, сабуро) осуществляли методом секторных посевов (Gould в модификации Рябинского – Родомана) не позднее 3 ч с момента забора. Чашки инкубировались при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего подсчитывали число колоний, выросших в разных секторах.

Определение давления в правом желудочке сердца. Использовали метод прямого измерения, который выполняли под общей анестезией. Животных фиксировали на столике И. М. Сеченова, после боковой торакотомии в полость правого желудочка вводили многоразовую инъекционную иглу (0,6 × 32) заполненную физиологическим раствором с гепарином, систолическое давление (мм рт. ст.) фиксировали с использованием хирургического аппарата полиграф «Салют».

Раздельное взвешивание миокарда. Проведено раздельное взвешивание на электронных весах Adventurer AR3130 (OHAUS, США) (свидетельство о поверке № 58767-110–708 от 17.12.2015) и измерение его толщины по Мюллеру – Ильину. Иссечение правого желудочка, измерение толщины миокарда проводили штангенциркулем (сертификат о калибровке № 14923). Сердце освобождали от жировой ткани и разделяли на четыре части: оба предсердия с их перегородкой по предсердно-желудочковой борозде, затем стенки желудочков от их перегородки. После этого определяли массу каждой части сердца. Учитывая, что межжелудочковая перегородка содержит мышцы и правого, и левого желудочков, ее равномерно разделяли между ними, предварительно определив массу всей перегородки.

Определение прочности трахеи в зоне оперативного вмешательства. Ранотензиометрию выполняли с помощью силонагружающего устройства в виде винтового сердечника, которое через измерительный прибор и съемное крепление соединяли с исследуемым фрагментом трахеи. Другой конец фрагмента трахеи закреплялся неподвижно [17].

Резецированный фрагмент трахеи длиной 1 см фиксировали зажимами так, чтобы послеоперационный рубец располагался строго посередине фрагмента перпендикулярно зажимам, после чего на весы укладывались грузы. Фиксировали вес груза (г) и показатели тензиометра (условные единицы) при разрыве фрагмента трахеи в зоне оперативного вмешательства.

Методы морфологического исследования. Обзорная световая микроскопия и морфометрия выполнены в лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины ИНЦХТ (заведующая – д. м. н. И. А. Шурыгина) совместно с ведущим научным сотрудником к. м. н. О. А. Гольдбергом. Для обзорной световой микроскопии материал фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина. На светооптическом уровне анализировали депарафинированные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Препараты исследовали на фотомикроскопе BX41 (Olympus, Япония). Морфометрию проводили с помощью пакета программ Image J [20].

Методы статистической обработки. Статистическая обработка результатов произведена с помощью пакета программ Statistica 10 for Windows.

Данные представляли в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля).

Определение статистической значимости различий полученных данных (p) в сравниваемых выборках проведено по критериям Манна – Уитни (U), Вилкоксона (W), коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ [26].

ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РУБЦОВЫМ СТЕНОЗОМ ТРАХЕИ

Для выявления основных закономерностей развития осложнений при стенозе трахеи и факторов, обуславливающих тяжесть течения заболевания, выполнен ретроспективный анализ результатов лечения пациентов в отделение торакальной хирургии ИОКБ.

Медиана пребывания в стационаре составила 21 (17–29) день. Количество госпитализаций с 2011 по 2014 г. варьировало от 1 до 7 раз, медиана – 2 (1–3). Медиана длительности заболевания – 90 (30–365) суток, минимальная длительность – 14 суток, максимальная – 15 лет. Впервые госпитализированы с РСТ 26 человек (51,0 %), дважды – 8 человек, три госпитализации было у 6 человек, четыре госпитализации – у 6 человек, пять госпитализаций – у 4 человек, шесть госпитализаций – у 2 человек, семь госпитализаций – у 1 человека. Выявлена средняя корреляция между выраженностью сужения трахеи и тяжестью состояния при поступлении ($R = 0,573$).

Локализацию стеноза оценивали на основании ФБС и МСКТ (Таблица 3).

Таблица 3 – Локализация стеноза трахеи

Локализация	Количество случаев, %
Комбинированный	38,0
Стеноз шейного отдела	32,0
Стеноз грудного отдела	18,0
Ларинготрахеальный	14,0

По классификации В. Д. Паршина [33, 35] пациенты распределились следующим образом: стеноз внутригрудного отдела выявлен у 18,0 % пациентов, стеноз шейного отдела – у 32,0 %, ларинготрахеальный стеноз – у 14,0 %, мультифокальный стеноз – у 38,0 %. По степени сужения трахеи: 1-я степень – у 8,0 % пациентов ($n = 4$); 2-я степень – у 12,0 % ($n = 6$); 3-я степень – у 16,0 %

($n = 8$); 4-я степень – у 64,0 % ($n = 32$). По 1 пациенту нет данных о выраженности сужения трахеи, так как он поступил с установленным Т-стентом. Таким образом, 80,0 % ($n = 40$) госпитализированных нуждались в экстренном оперативном лечении.

Основные причины развития РСТ представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Причины развития рубцового стеноза трахеи

Причины	<i>n</i>	%
Длительная вентиляция легких через трахеостому	37	72,5
Длительная оротрахеальная вентиляция легких	11	21,5
Травма трахеи	3	6,0

Основные причины длительной ИВЛ: черепно-мозговая травма – в 27,4 %; тяжелая сочетанная травма – в 21,6 %; тяжелая терапевтическая патология – в 19,6 %; плановые оперативные вмешательства – в 13,7 %; экстренные – в 11,8 %; повреждение трахеи при ранениях шеи – в 5,9 % наблюдений.

За период с 2011 по 2014 г. проведено 116 вмешательств на трахее (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество и виды методов лечения у пациентов со стенозом трахеи

Вмешательства на трахее	Количество операций	
	<i>n</i>	%
Бужирование трахеи	43	37,0
Циркулярная резекция трахеи	20	17,1
Протезирование Т-стентом	19	16,5
Пластическое закрытие трахеостомы	15	12,9
Эндоскопическое удаления гранулем	8	7
Бужирование трахеи в послеоперационном периоде	4	3,5
Трахеостомия	3	2,6
Замена Т-стента	2	1,7
Стентирование линейным протезом	2	1,7

Итак, основными методами лечения РСТ были бужирование и циркулярная резекция трахеи.

Осложнения возникали в 22,4 % наблюдений. Среди них в группе с циркулярной резекцией ($n = 20$) в послеоперационном периоде – 8 (40 %) пациентов (Таблица 6)

Таблица 6 – Осложнения циркулярной резекции трахеи

Осложнения циркулярной резекции трахеи	Количество, ед.	% от общего числа операций
Несостоятельность анастомоза и трахеопищеводный свищ	3	15,0
Рубцовый стеноз анастомоза	2	10,0
Несостоятельность анастомоза	2	10,0
Стенозирующий анастомозит	1	5,0

У 31 пациента выявлена сопутствующая патология. Преобладали заболевания сердечно-сосудистой системы (12 наблюдений) и последствия тяжелой сочетанной травмы (8 наблюдений).

Клинические проявления РСТ зависели от длительности заболевания, диаметра трахеи в месте сужения и неизменном сегменте.

При несостоятельности трахеального анастомоза дефект, как правило, образуется по переднебоковым стенкам, а шов мембранозной части трахеи чаще не страдает. Трахеопищеводный свищ осложнил циркулярную резекцию, выполненную на фоне распространённого гнойного медиастинита, флегмоны шеи.

По ЭХО-КГ (14 пациентов) изучалась гемодинамика правых отделов сердца, степень легочной гипертензии (ЛГ). ЛГ развилась у 3 (21,4 %) из них: у 1 – ЛГ 2-й степени, у 2 – ЛГ 1-й степени. Просвет трахеи в месте стеноза колебался от 0,4 до 0,8 см. Толщина стенки правого желудочка у пациентов с ЛГ составила 30 (26–42) мм, без нее – 26 (25–30) мм. Давление в правом желудочке при ЛГ составило 40 (38–41) мм рт. ст., без нее – 26 (23–28) мм рт. ст. Среднее давление составило 26 (24–38) мм рт. ст. Итак, у больных с ЛГ выявлено статистически значимое повышение давления в правом желудочке сердца ($p_U = 0,017$).

При проведении бактериологического исследования у 25 пациентов (по данным историй болезни) обнаружено 22 вида микроорганизмов, основными из них были: *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 21$), грибы рода *Candida* ($n = 12$), *Streptococcus viridans* ($n = 10$), *Staphylococcus aureus* ($n = 10$), *Escherichia coli* ($n = 6$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 6$), *Staphylococcus oralis* ($n = 6$), *Serratia marcescens* ($n = 5$), *Neisseria species* ($n = 4$) и *Staphylococcus haemolyticus* ($n = 4$). В исследование включены пациенты, которым был выполнен бактериологический анализ мокроты ($n = 25$). В каждом наблюдении обнаружено от 1 до 5 штаммов бактерий (Таблица 7).

Таблица 7 – Выявленные ассоциации микроорганизмов у пациентов с рубцовым стенозом трахеи

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Грибы рода <i>Candida</i>	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		6 (18,2 %)	5 (15,2 %)	4 (12,1 %)	3 (9 %)	4 (12,1 %)	5 (15,2 %)
Грибы рода <i>Candida</i>	6 (18,2 %)		3 (9 %)	6 (18,2 %)	3 (9 %)	2 (6 %)	2 (6 %)
<i>Streptococcus viridans</i>	5 (15,2 %)	3 (9 %)		2 (6 %)	2 (6 %)	1 (3 %)	2 (6 %)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (12,1 %)	6 (18,2 %)	2 (6 %)		2 (6 %)	1 (3 %)	1 (3 %)
<i>Escherichia coli</i>	3 (9 %)	3 (9 %)	2 (6 %)	2 (6 %)		3 (9 %)	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4 (12,1 %)	2 (6 %)	1 (3 %)	1 (3 %)	3 (9 %)		0
<i>Serratia marcescens</i>	5 (15,2 %)	2 (6 %)	2 (6 %)	1 (3 %)	0	0	

Ассоциации микроорганизмов выявлены в 84,8 % случаев, из них ассоциации двух микроорганизмов – в 24,2 %, трех – в 27,2 %, четырех – в 21,2 %, пяти – в 12,1 %. Чаще встречаются ассоциации синегнойной палочки и грибов рода *Candida* – 18,2 %; золотистого стафилококка и грибов рода *Candida* – 18,2 %;

синегнойной палочки и *Streptococcus viridans* – 15,2 %; синегнойной палочки и *Serratia marcescens* – 15,2 %; синегнойной палочки и золотистого стафилококка – 12,1 %; синегнойной палочки и *Klebsiella pneumoniae* – 12,1 %. Прочие сочетания представлены менее чем в 10 % наблюдений.

Исследованы показатели внешнего дыхания (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты оценки показателей внешнего дыхания у пациентов со стенозом трахеи (спирография, %) ($n = 35$)

Показатели	Спирография при поступлении	Спирография при выписке	Норма
ЖЕЛ, %	85,5 (63,0–96,0)	92,0 (78,0–106,0)	> 80,0
ФЖЕЛ, %	86,5 (68,0–99,0)	95,0 (78,0–112,0)	> 80,0
ОФВ1, л	65,0 (40,0–90,0)	68,0 (50,0–93,0)	> 75,0
ОФВ1/ФЖЕЛ	82,0 (60,0–94,0)	82,0 (62,0–94,0)	> 75,0
МОС 25–75 %	45,0 (27,0–64,0)*	53,0 (47,0–74,0)*	> 75,0
ПОС, %	34,5 (24,0–55,0)*	44,0 (34,0–64,0)*	> 80,0
МОС25 %	38,0 (26,0–56,0)*	48,0 (37,0–69,0)*	> 80,0
МОС50 %	37,5 (23,0–52,0)*	47,0 (27,0–60,0)*	> 80,0
МОС75 %	47,0 (30,0–73,0)*	43,0 (34,0–70,0)*	> 80,0

Примечание: ЖЕЛ – жизненная емкость легких; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; ОФВ1 – объем форсированного выдоха за первую секунду маневра форсированного выдоха; ОФВ1/ФЖЕЛ – объем форсированного выдоха в % к ФЖЕЛ; МОС 25–75 % – максимальная объемная форсированная скорость выдоха в интервале 25–75 % ФЖЕЛ; ПОС – пиковая объемная форсированная скорость выдоха; МОС 25 % – максимальная объемная форсированная скорость выдоха в интервале 25 % ФЖЕЛ; МОС 50 % – максимальная объемная форсированная скорость выдоха в интервале 50 % ФЖЕЛ; МОС 75 % – максимальная объемная форсированная скорость выдоха в интервале 75 % ФЖЕЛ; * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$)

У пациентов со стенозом трахеи жизненная емкость легких (ЖЕЛ) и форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) сохранены в пределах нормы ($> 80\%$) до и после проведенного лечения, что обусловлено сохранением объема паренхимы легкого и его дыхательной функции в полном объеме. При поступлении выявлено статистически значимое снижение по сравнению с нормой следующих показателей: максимальная объемная форсированная скорость выдоха в интервале 25–75 % ФЖЕЛ (МОС 25–75 %; $p_U = 0,001$), пиковая объемная форсированная скорость выдоха (ПОС; $p_U = 0,001$), МОС 25 % ($p_U = 0,001$), МОС 50 % ($p_U = 0,001$), МОС 75 % ($p_U = 0,009$). При выписке сохранялось статистически значимое снижение этих же показателей: МОС 25–75 % ($p_U = 0,010$), ПОС ($p_U = 0,001$), МОС 25 % ($p_U = 0,001$), МОС 50 % ($p_U = 0,001$), МОС 75 % ($p_U = 0,003$). У 100 % пациентов с РСТ отмечается нарушение функции внешнего дыхания по обструктивному типу при поступлении с незначительной положительной динамикой после проведенного лечения.

Индекс Тиффно изучался у 35 пациентов (Рисунок 11).

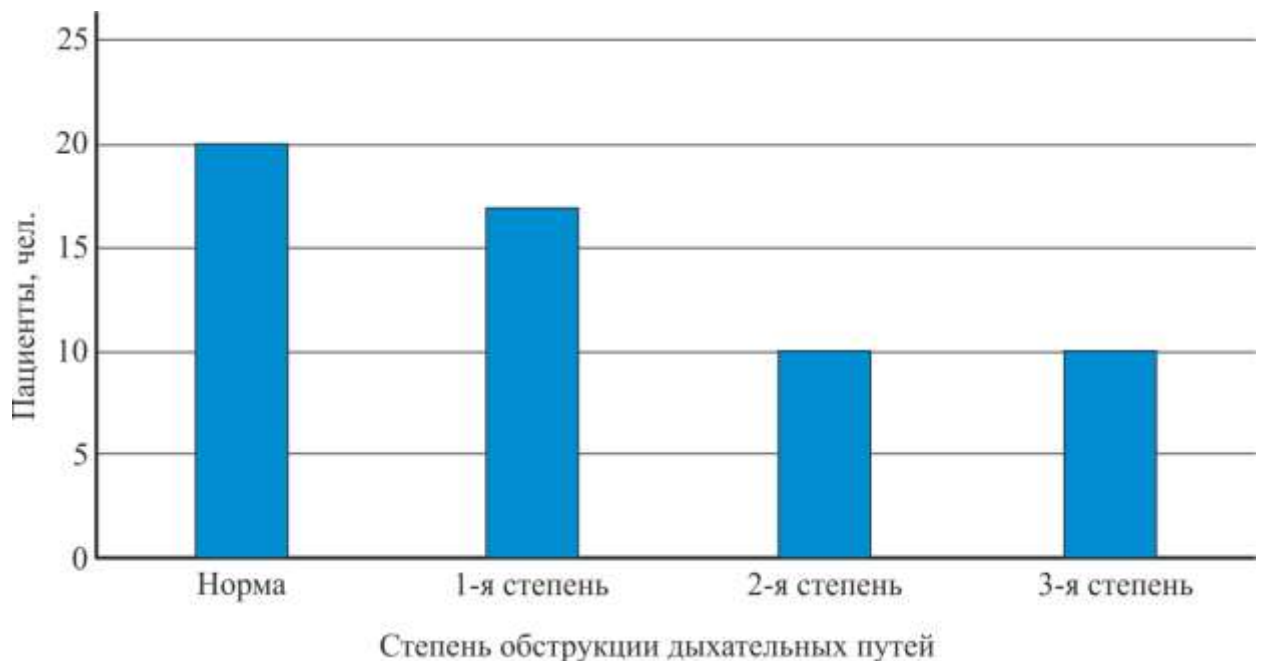


Рисунок 11 – Распределение пациентов по степени обструкции дыхательных путей

Итак, у 35 % пациентов обструкция внешних дыхательных путей была средней и тяжелой степени.

Таким образом, на основании оценки результатов лечения 51 пациента установлено, что основные причины стеноза трахеи – длительная ИВЛ через трахеостому (72,5 %) и оротрахеальную интубационную трубку (21,5 %). Преобладали комбинированные поражения трахеи (38,0 %) и стеноз шейного отдела трахеи (31,0 %). Для лечения выполнялись бужирование (37,0 %), циркулярная резекция (17,1 %), протезирование Т-стендом (16,5 %), эндоскопическое удаление грануляций и линейное стентирование (7,0 %). Пластическое закрытие трахеостомы как заключительный этап лечения составило 12,9 %. Осложнения после парахирургических и реконструктивных вмешательств развивались у 22,4 % пациентов. Ключевые причины осложнений – ишемическое повреждение слизистой оболочки трахеи, бактериальная контаминация ассоциаций микроорганизмов (84,9 %), включающих госпитальные штаммы, устойчивые к антибактериальным препаратам широкого спектра действия. Вышеуказанные операции при РСТ и трахеопищеводном свище на фоне распространенного медиастинита и флегмоны шеи часто осложнялись несостоятельностью трахеального анастомоза рецидивом свища.

Приводим клинические наблюдения.

Пациентка В., 57 лет. Поступила в клинику в январе 2013 г. с диагнозом: постинтубационный стеноз шейного и верхнегрудного отделов трахеи, стадия декомпенсации. Острая дыхательная недостаточность 3-й степени.

В ноябре 2012 г. пострадала в дорожно-транспортном происшествии (ДТП) (пешеход), поступила в Иркутскую городскую клиническую больницу № 3 со множественной скелетной травмой, открытой черепно-мозговой травмой. При поступлении: состояние крайне тяжелое, выполнена репозиция перелома лучевой кости, скелетное вытяжение за мыщелки бедер и пяточные кости, остеосинтез таза стержневыми стабилизирующими аппаратами внешней фиксации. Находилась на ИВЛ через интубационную трубку в течение 5 суток. Далее была выполнена трахеостомия, трахеостома удалена на 23-и сутки. После

удаления трахеостомы постепенно нарастала дыхательная недостаточность. По результатам МСКТ: стеноз трахеи до 3,4 мм на протяжении 17 мм. После консультации торакального хирурга в январе 2013 г. переведена в ИОКБ. Выполнено 6 сеансов бужирования стриктуры с незначительным эффектом. В конце января 2013 г. проведена циркулярная резекция шейного и верхнегрудного отдела трахеи комбинированным шейно-трансстернальным доступом. Проводились симптоматическая терапия, физиолечение. Состояние улучшилось. Выписана для продолжения лечения по месту жительства.

В июне 2013 г. поступила повторно с жалобами на одышку. Выполнена ФБС: на 5 см дистальнее голосовой щели выявлено сужение трахеи до 0,5 см в зоне трахеотрахеального анастомоза. Проведено 4 сеанса бужирования – без эффекта. По данным МСКТ определяется сужение до 4,1 мм протяженностью 14 мм в верхней трети трахеи. По результатам ЭХО-КГ толщина стенки правого желудочка – 30 мм, расчетное давление – 41 мм рт. ст., ЛГ 1-й степени. По результатам спирографии – значительное снижение функции внешнего дыхания по обструктивному типу. В июле выполнена трахеопластическая трахеостомия. В удовлетворительном состоянии пациентка выписана по месту жительства для продолжения лечения с последующей консультацией торакального хирурга через 3 месяца.

В ноябре 2013 г. госпитализирована для пластического закрытия трахеостомы. По результатам ФБС сужения просвета трахеи не определяется. Интраоперационно установлено грубое окостенение хрящей трахеи и гортани, слизистая оболочка и кожа стомы не отделяются. Выполнена резекция 3/4 трахеи, реконструкция трахеопластической трахеостомы. Выписана на медицинскую паузу. В марте 2014 г. успешно выполнено пластическое закрытие трахеопластической трахеостомы, пациентка выписана под наблюдение оториноларинголога по месту жительства.

Многоэтапные вмешательства позволяют вылечить рубцовый стеноз трахеального анастомоза и предупредить его рецидив.

Второе клиническое наблюдение подтверждает, что несостоятельность анастомоза, как правило, развивалась с передней стенки трахеи.

Пациент П., 22 года, в январе 2012 г. поступил в ИОКБ с сочетанной травмой грудной клетки и позвоночника, полученной в результате ДТП. Выполнена трахеостомия.

В июле 2013 г. поступил в клинику с диагнозом: постинтубационный стеноз трахеи, трахеостома. По результатам МСКТ в верхней трети трахеи определяется сужение протяженностью 15,6 мм, просвет – 4,3 мм², хрящи визуализируются фрагментами. По результатам ФБС: просвет сужен до 0,6–0,7 мм на протяжении 2 см, рубцово деформирован. Выполнена операция: циркулярная резекция трахеи. На 8-е сутки выявлена несостоятельность анастомоза по передней стенке, диастаз 1,5 см. Выполнены эндоскопические санации в течение 2 недель: диастаз 2,5 см. Выписан на медицинскую паузу.

Через 10 дней госпитализирован с жалобами на одышку. По результатам ФБС определяются грануляции, суживающие просвет трахеи до 0,6 см. После бужирования выполнена операция: ларинготрахеопластика, эндопротезирование Т-образным стентом. Выписан для дальнейшего лечения по месту жительства.

В первом наблюдении у пациентки в течение 6 месяцев после выполнения ЦРТ сформировалось сужение трахеотрахеального анастомоза с развитием легочной гипертензии. Развитие избыточной рубцовой ткани обусловлено индивидуальными особенностями организма.

Во втором наблюдении операция выполнялась в плановом порядке после достаточной общей подготовки и санации дыхательных путей. Однако протяженность стриктуры, рубцовые изменения стенки трахеи усугубили естественный дефицит регионарного кровообращения и обусловили развитие несостоятельности передней стенки трахеального анастомоза.

Таким образом, результаты клинических исследований, прежде всего анализ причин несостоятельности трахеального анастомоза, послужили основанием для изучения и усовершенствования активизирующих саногенез и стимулирующих репаративные процессы средств, способствующих заживлению ран передней стенки трахеи после их ушивания.

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКИ РУБЦОВЫХ СТЕНОЗОВ ТРАХЕИ

В рамках второй серии экспериментальных исследований проведена оценка влияния локального использования фактора роста эндотелия сосудов на регенерацию стенки трахеи в раннем послеоперационном периоде. Изучена анатомия трахеи крыс линии «Wistar» с уточнением вариантов ее кровоснабжения, разработан способ локальной доставки VEGF в зону оперативного вмешательства и изучена эффективность вещества для профилактики РСТ.

4.1 Результаты исследования топографической анатомии трахеи крыс линии «Wistar»

Для оценки анатомических особенностей трахеи крыс линии «Wistar» совместно с аспирантом ИНЦХТ Е. О. Иноземцевым было выполнено анатомо-топографическое исследование, включающее в себя изучение макроструктурных образований и морфологическое исследование на уровнях гортани, верхней, средней и нижней трети.

Трахея – цилиндрическая трубка, которая начинается от гортани и оканчивается бифуркацией. Ее длина составляет от 4,0 до 4,7 см (в среднем 4,55 см), диаметр – 1,7–2,0 см (в среднем 1,9 мм), толщина стенки – 0,4–0,5 мм (в среднем 0,45 мм). Сверху вниз просвет трахеи сужается, и ее нижний конец отклоняется вправо. Бифуркация трахеи находится на уровне 4–5-го грудных позвонков и по передней поверхности граничит с дугой аорты. Бронхи отходят под острым углом. В месте бифуркации образуется карина (шпора). Хрящи трахеи имеет форму кольца, вследствие чего ее поперечный срез близок к форме круга. Соотношение поперечного размера к переднему составляет 1:0,9.

Трахея состоит из 22–24 (в среднем 23,5) гиалиновых хрящей, соединенных между собой связками. Границей между шейной и грудной частями служит плоскость, проведенная через яремную вырезку грудины. Их соотношение составляет 1:2. На уровне шейного отдела расположена щитовидная железа. Ее перешеек прилежит к передней поверхности трахеи, боковые стенки граничат с ее долями. Грудная часть трахеи в нижней трети боковыми сторонами граничит с медиастинальной плеврой, спереди – с тимусом, а задняя стенка на всем протяжении – с пищеводом. В области бифуркации расположено от 3 до 10 лимфатических узлов.

Наружный слой трахеи представлен рыхло-волокнистой адвентициальной оболочкой. Она более выражена на переднелатеральных поверхностях, покрывая сосудисто-нервный пучок и переходя в адвентицию пищевода.

Мышечная стенка трахеи представлена пересеченными косыми слоями и единичными мышечными пучками по передней и боковым стенкам в подслизистом слое. Гладкие мышечные волокна выражены в кольцевых связках (Рисунок 12).

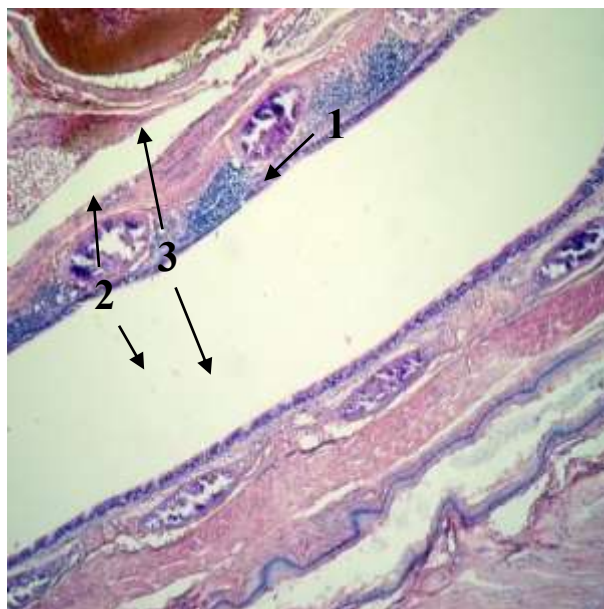


Рисунок 12 – Морфологическая структура трахеи крысы линии «Wistar», продольный срез: 1 – просвет трахеи; 2 – хрящевое кольцо; 3 – мышечные волокна. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$

Просвет трахеи выстлан слизистой оболочкой с выраженной подслизистой основой и кровеносными сосудами. В подслизистом слое содержится большое количество лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue), особенно в зоне бифуркации (Рисунок 13). Слизистая оболочка представлена однорядным респираторным эпителием. В межхрящевых отделах выявляются железы секреции. У крыс переход эпителия с многослойного плоского неороговевающего на однорядный ворсинчатый происходит ниже голосовых связок в полости гортани. У человека – на уровне гортаноглотки, а голосовые связки покрыты многослойным плоским неороговевающим эпителием (Рисунок 14).

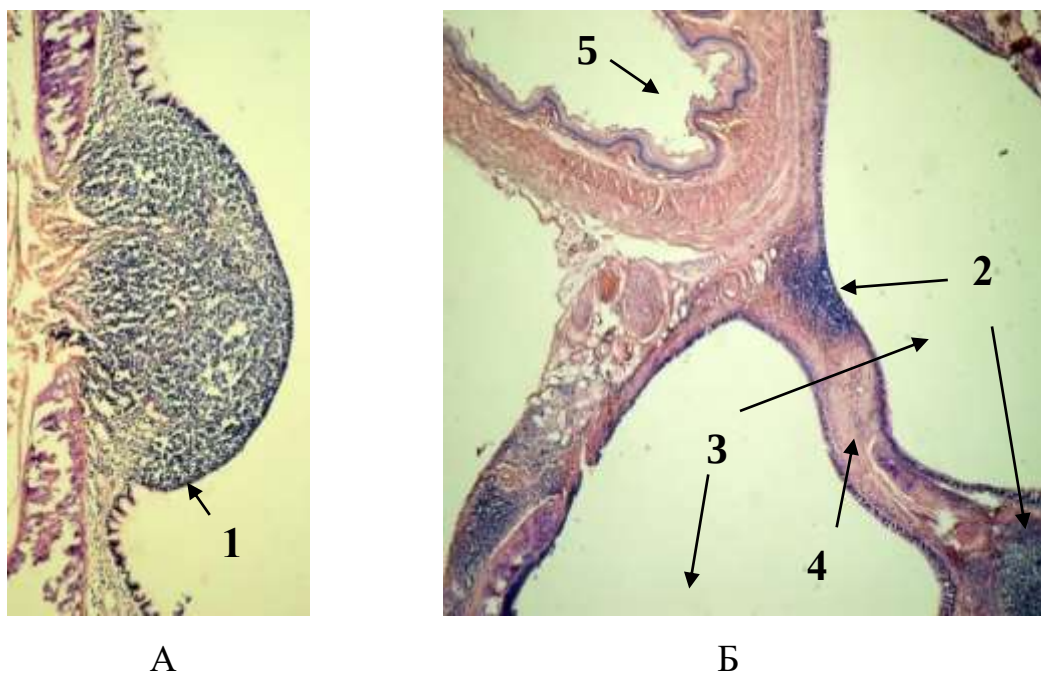


Рисунок 13 – Морфологическая структура трахеи крысы линии «Wistar»: стенка (А), поперечный срез на уровне бифуркации трахеи (Б): 1 – MALT; 2 – множественные MALT; 3 – просвет бронхов; 4 – карина; 5 – просвет пищевода. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 75$ (А), $\times 50$ (Б)

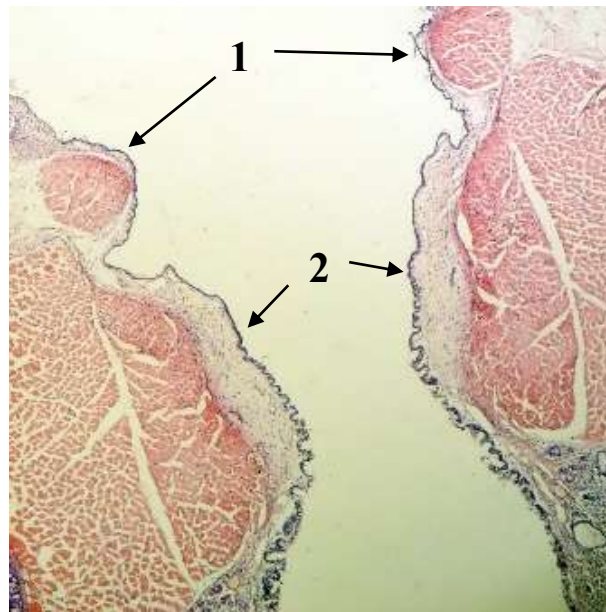


Рисунок 14 – Морфологическая структура трахеи крысы линии «Wistar»:

1 – голосовые складки; 2 – место перехода эпителия с многослойного плоского неороговевающего на однослойный респиаторный.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$

Между трахеей и пищеводом по боковым поверхностям располагается трахеопищеводная борозда, в которой проходят возвратные гортанные нервы и трахеопищеводное сосудистое сплетение.

Кровоснабжение трахеи осуществляется ветвями верхних, нижних щитовидных и бронхиальных артерий. Верхние щитовидные кровоснабжают гортань и верхнюю часть шейного отдела, нижние идут по боковым поверхностям в трахео-пищеводной борозде до щитовидной железы и кровоснабжают нижнюю часть шейного и внутригрудного отделов трахеи. Левая нижняя щитовидная артерия отходит от аорты, правая – от плечеголового ствола. Бронхиальные артерии кровоснабжают область бифуркации трахеи (Рисунок 15).

Нижние щитовидные артерии кровоснабжают глотку, пищевод, трахею, щитовидную и околощитовидные железы. Трахеальные и пищеводные ветви активно анастомозируют между собой, формируя трахеопищеводное сосудистое сплетение, ветви которого проникают в подслизистый слой трахеи. Сосудистая сеть наиболее выражена в области задней стенки. Нижние щитовидные артерии

дают тонкие ветви, расположенные на передней поверхности в адвентициальном слое, что определяет дефицит кровоснабжения этой зоны. Через нижние щитовидные артерии осуществляется кровоснабжение от 3/4 до 4/5 трахеи.

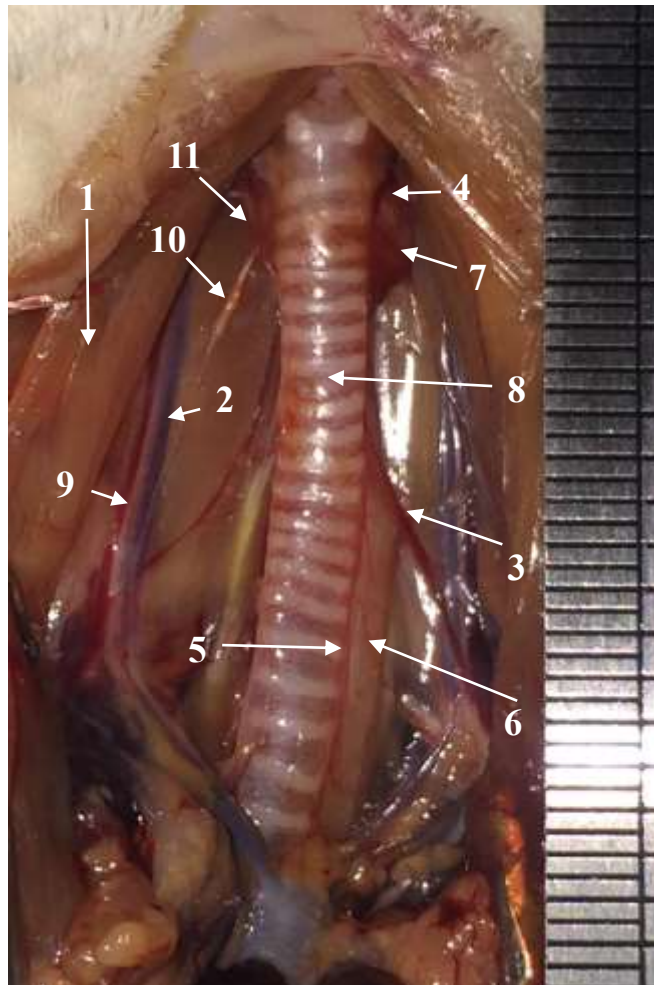


Рисунок 15 – Трахея крысы линии «Wistar»: 1 – щито-шейные мышцы; 2 – правая яремная вена и правая наружная сонная артерия; 3 – левая нижняя щитовидная артерия; 4 – левая верхняя щитовидная артерия; 5 – левая бронхиальная артерия в трахеопищеводной борозде; 6 – пищевод; 7 – щитовидная железа; 8 – трахея; 9 – блуждающий нерв; 10 – краниальный гортанный нерв; 11 – возвратный гортанный нерв

Верхние щитовидные артерии кровоснабжают гортань и совместно с нижними участвуют в кровоснабжении первых 2–5 колец трахеи.

Венозный отток осуществляется через глубокое подслизистое и поверхностное сплетения, дренирующие кровь в вены щитовидной железы, а также в непарную и полунепарную вены. Кровь от задней стенки трахеи и пищевода оттекает в трахеопищеводное сплетение.

Иннервация трахеи осуществляется ветвями возвратного и симпатического нервов.

4.2 Стеноз трахеи и дисфункция малого круга кровообращения

Изучено развитие дисфункции малого круга кровообращения при 55–60%-м сужении трахеи у крыс группы 1.1 (что соответствует 3-й степени стеноза у пациентов) по сравнению со здоровыми животными группы 1.2.

Этапы операции подробно описаны в главе 2. Детали фиксации трубки в трахее представлены на Рисунках 16 и 17.

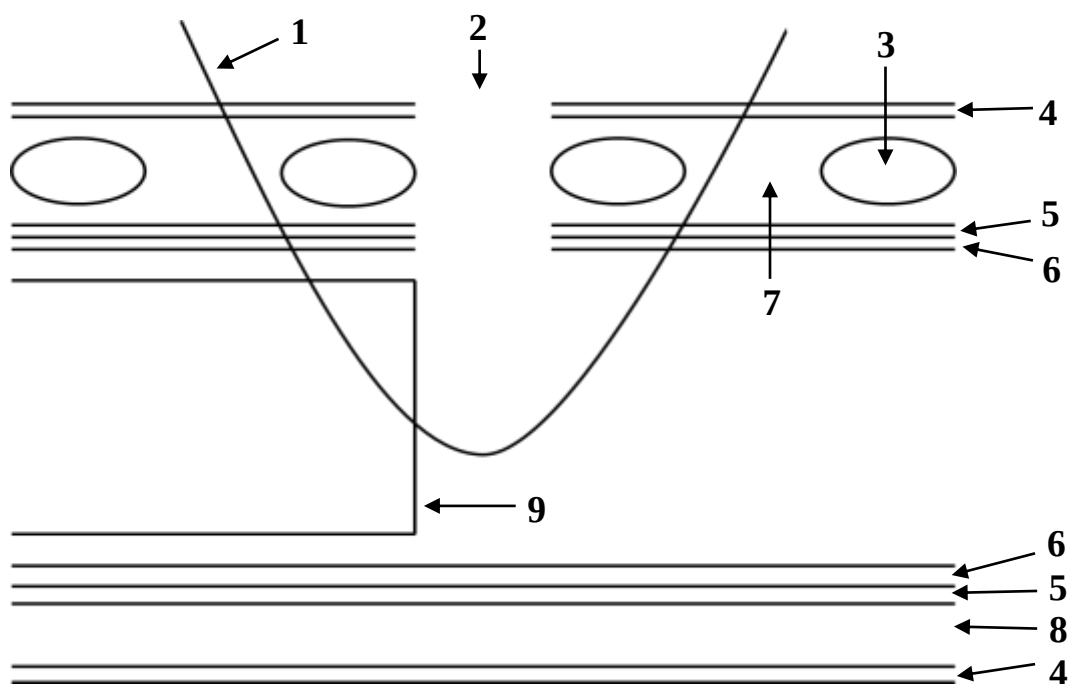


Рисунок 16 – Схема фиксации трубки в просвете трахеи (поперечный срез):

- 1 – нить; 2 – операционная рана; 3 – хрящевое полукольцо трахеи;
- 4 – серозная оболочка; 5 – подслизистый слой; 6 – слизистая оболочка;
- 7 – межхрящевая связка; 8 – перепончатая часть с гладкомышечными волокнами;
- 9 – трубка в просвете трахеи

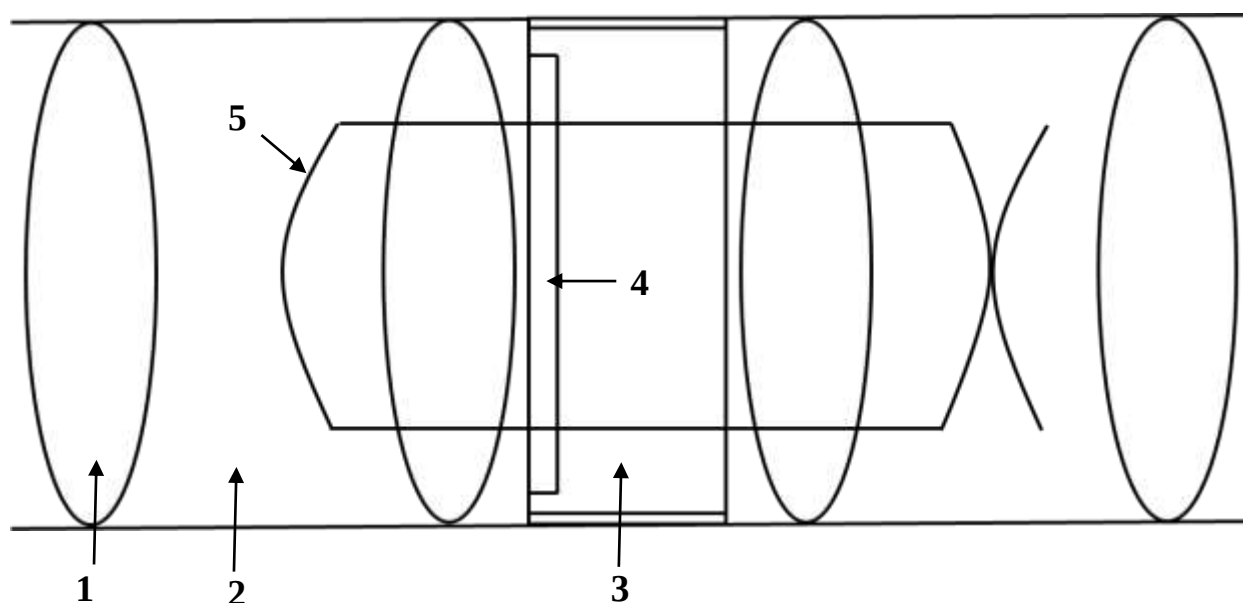


Рисунок 17 – Схема фиксации трубки в просвете трахеи (вид сверху):

- 1 – хрящевое полукольцо трахеи; 2 – межхрящевая связка;
3 – операционная рана; 4 – трубка в просвете трахеи; 5 – нить

Фиксирующие лигатуры проведены за кольцами трахеи с узлами на наружной стороне.

Для анализа дисфункции малого круга кровообращения выполнено измерение давления в правом желудочке сердца. После эвтаназии проведено раздельное взвешивание миокарда, измерение его толщины прямым методом и с использованием морфометрии (Таблица 9).

Согласно данным, приведенным в Таблице 9, вес сердца составлял 1,376 г, вес правого желудочка – 0,281 г ($p_U = 0,005$), толщина миокарда – 1,8 мм (на 69,9 % больше нормы ($p_U = 0,005$)); отмечается статистически значимое увеличение давления ($p_U = 0,005$).

Частота дыхания и сердечных сокращений также отличается от нормы ($p_U = 0,0037$; $p_U = 0,0037$).

Таблица 9 – Результаты исследования миокарда и давления в правом желудочке на 14-е сутки после сужения просвета трахеи

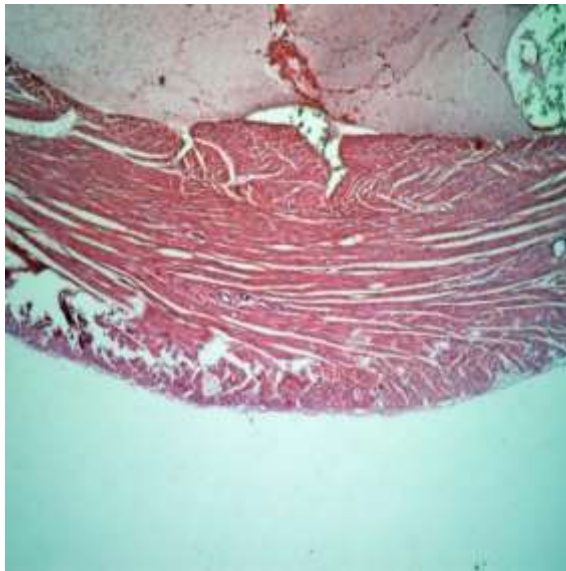
Исследования	Группы	
	1.2 (норма)	1.1
Давление в правом желудочке, мм рт. ст.	25,0 (24,0–26,0)	46,5 (46,0–48,0)*
Вес сердца, г	1,182 (1,134–1,220)	1,376 (1,310–1,392)*
Вес правого желудочка, г	0,174 (0,170–0,182)	0,281 (0,267–0,287)*
Толщина миокарда правого желудочка, мм	1,1 (1,0–1,1)	1,8 (1,8–1,9)*
Толщина миокарда правого желудочка, усл. ед.	809 (767–844)	1376 (1333–1445)*
Частота дыхания	85 (82–88)	157 (148–164)*
Пульс	320 (300–340)	535 (480–550)*

Примечание: * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$)

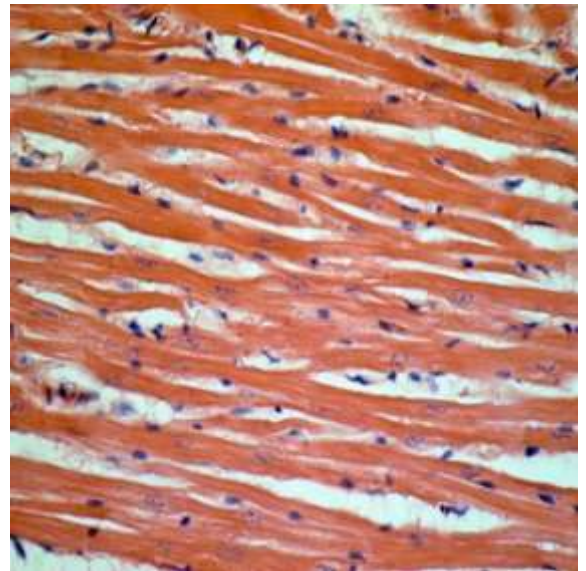
Для оценки влияния одномоментного сужения трахеи на малый круг кровообращения проведено морфологическое исследование миокарда животных группы 1.1 на 3-и, 7-е и 14-е сутки.

На Рисунке 18 показано, что в норме миокард – в виде плотных волокон, межклеточное вещество представлено незначительно, веретенообразные ядра кардиомиоцитов.

На 3-и сутки после создания модели в группе 1.1 отмечается отек стромы миокарда (Рисунок 19Б, 1), Строение кардиомиоцитов сохранено (Рисунок 19Б, 2).

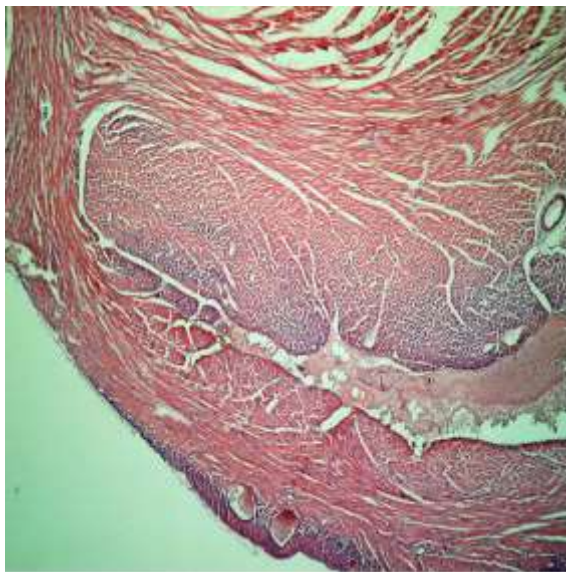


А

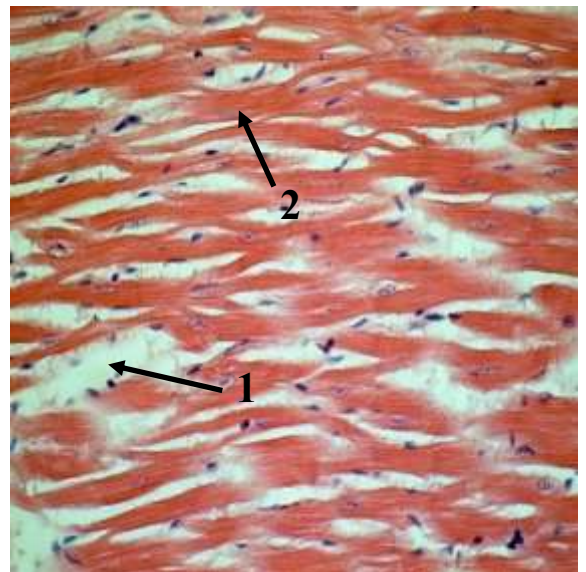


Б

Рисунок 18 – Структура правого желудочка на поперечном срезе у животных группы 1.2. А – уровень среднего сегмента; Б – кардиомиоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$ (А), $\times 75$ (Б)



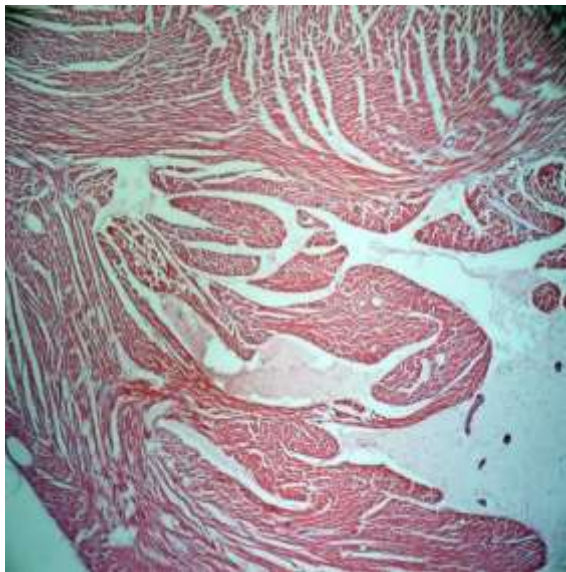
А



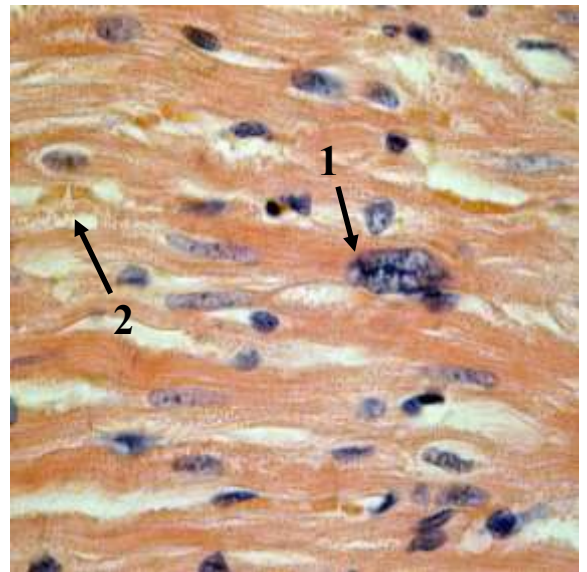
Б

Рисунок 19 – Морфологическая структура миокарда на третьи сутки у животных группы 1.1, световая микроскопия. Структура правого желудочка на поперечном срезе. А – уровень среднего сегмента; Б – кардиомиоциты правого желудочка; 1 – отек стромы миокарда; 2 – сохранено строение кардиомиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$ (А), $\times 100$ (Б)

На седьмые сутки в группе 1.1 отмечаются утолщение стенки правого желудочка (Рисунок 20А), увеличение размера ядер кардиомиоцитов (Рисунок 20Б, 1), дистрофические изменения (Рисунок 20Б, 2).



А

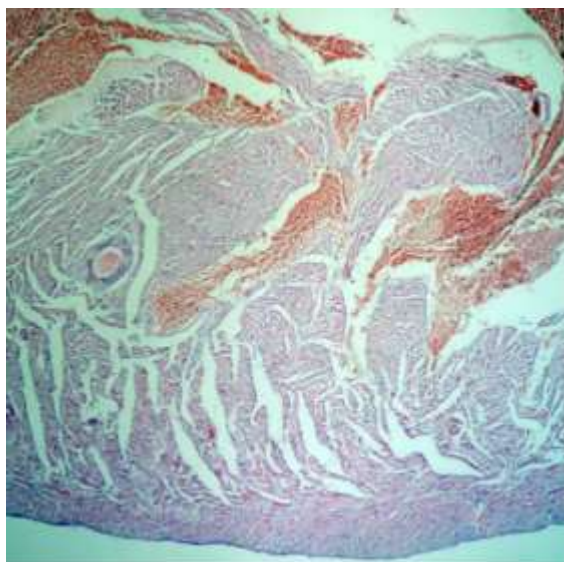


Б

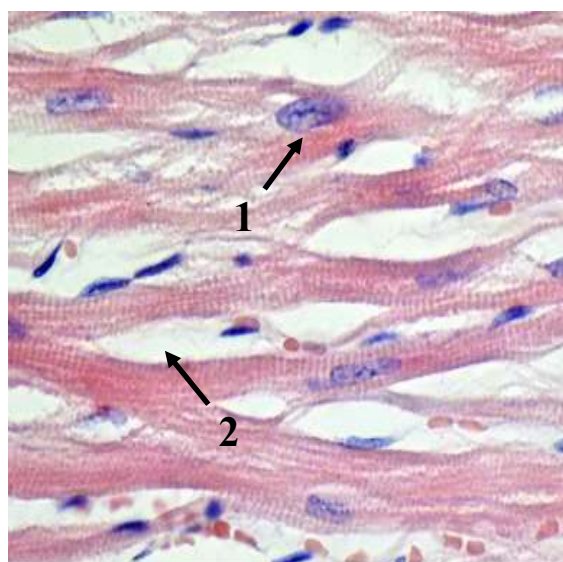
Рисунок 20 – Морфологическая структура миокарда на седьмые сутки у животных группы 1.1, световая микроскопия. Структура правого желудочка на поперечном срезе. А – уровень среднего сегмента; Б – кардиомиоциты правого желудочка. 1 – увеличение размера ядер кардиомиоцитов; 2 – дистрофические изменения. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 50$ (А), $\times 120$ (Б)

На четырнадцатые сутки в группе 1.1 отмечаются гипертрофия миокарда правого желудочка (Рисунок 21А), увеличение ядер кардиомиоцитов (Рисунок 21Б, 1), отек стромы (Рисунок 21Б, 2).



А



Б

Рисунок 21 – Морфологическая структура миокарда на 14-е сутки после моделирования сужения трахеи у животных группы 1.1, световая микроскопия. Структура правого желудочка на поперечном срезе.

А – уровень среднего сегмента; Б – кардиомиоциты правого желудочка.

1 – увеличение размера ядер кардиомиоцитов; 2 – отек стромы миокарда.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$ (А), $\times 120$ (Б)

Таким образом, стеноз трахеи, смоделированный одномоментным сужением ее просвета более чем на 50 %, индуцирует развитие легочной гипертензии к 14-м суткам исследования с формированием гипертрофии миокарда правого желудочка.

Для оценки влияния сужения трахеи в эксперименте на бактериальную обсемененность выполнены бактериологические исследования (Таблица 10).

Таблица 10 – Микробная обсемененность трахеи крыс после моделирования сужения просвета трахеи ($Lg \text{ КОЕ/см}^2$) (медиана, квартили)

Сутки	Микроорганизмы						
	1	2	3	4	5	6	7
3-и сутки	0 (0,0–4,0)	0 (0,0–4,0)	3,0 (0,0–5,0)*	1,5 (0,0–3,0)	5,5 (4,0–6,0)	4,0 (3,0–5,0)	0 (0,0–4,0)*
7-е сутки	1,7 (0,0–3,0)	0 (0,0–0,0)	3,5 (3,0–4,0)*	1,5 (0,0–3,0)	0 (0,0–0,0)	1,8 (0,0–4,0)	0 (0,0–3,0)*
14-е сутки	1,5 (0,0–3,0)	0 (0,0–0,0)	3,0 (3,0–3,0)*	0 (0,0–0,0)	0 (0,0–0,0)	1,5 (0,0–3,0)	0 (0,0–3,0)*

Примечание * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$). Микроорганизмы: 1 – *Citrobacter freundii*; 2 – *Streptococcus pneumoniae*; 3 – *Staphylococcus epidermidis*; 4 – грибы рода *Candida*; 5 – *Proteus mirabilis*; 6 – *Escherichia coli*; 7 – общая обсемененность всеми микроорганизмами

По результатам бактериологического исследования выявлено, что у здоровых крыс линии «Wistar» отсутствуют микроорганизмы – трахея стерильна.

После моделирования сужения просвета трахеи по оригинальной методике на третьи сутки определяли рост микроорганизмов в количестве 10^3 – 10^5 КОЕ: *C. freundii*, пневмококка, эпидермального стафилококка, грибов рода *Candida*, *Pr. mirabilis*, эпидермального стафилококка в виде ассоциаций – в 100 % случаев.

На 7-е сутки выявлен рост в количестве 10^3 – 10^4 КОЕ *C. freundii*, эпидермального стафилококка, грибов рода *Candida*, эпидермального стафилококка в виде ассоциаций – в 100 % случаев. На 14-е сутки выявлен рост в количестве 10^3 КОЕ *C. freundii*, эпидермального стафилококка, кишечной палочки в виде ассоциаций – в 100 % случаев.

Также оценивалась суммарная обсемененность трахеи на 3-и, 7-е и 14-е сутки исследования (Рисунок 22).

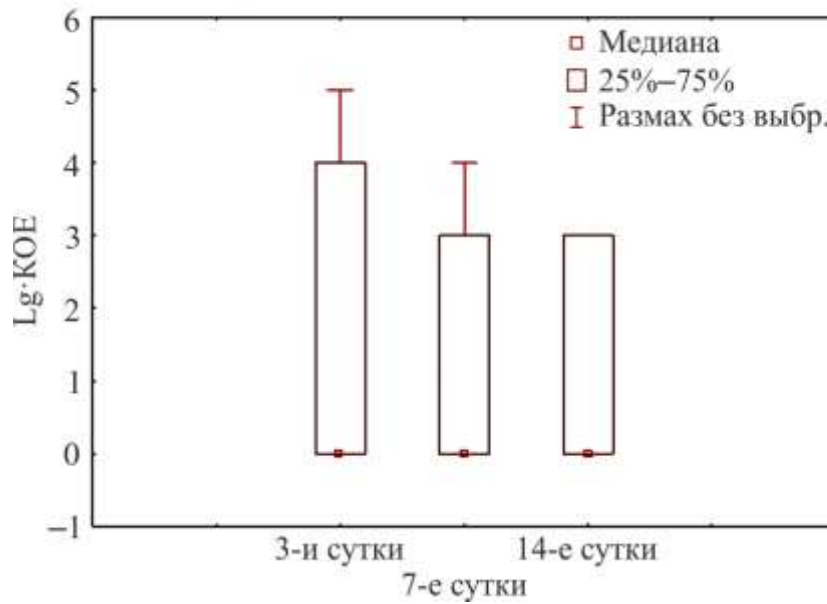


Рисунок 22 – Диаграмма показателей обсемененности трахеи на 3-и, 7-е и 14-е сутки исследования у животных группы 1.1

При оценке показателя суммарной обсемененности обнаружено статистически значимое различие с нормой на 3-и ($p_U = 0,0005$), 7-е ($p_U = 0,0046$) и 14-е ($p_U = 0,0152$) сутки; в динамике различий между 3-ми и 7-ми и 7-ми и 14-ми сутками не выявлено (соответственно $p_W = 0,1305$ и $p_W = 0,1814$). При сравнении между группами различий между 3-ми и 7-ми и 7-ми и 14-ми сутками не обнаружено (соответственно $p_U = 0,2012$ и $p_U = 0,2383$); между 3-ми и 14-ми сутками установлены различия ($p_U = 0,0266$), что говорит о снижении бактериальной контаминации в течение исследования (см. Рисунок 22).

Рост микроорганизмов в раннем послеоперационном периоде говорит о нарушении защитных функций слизистой оболочки трахеи и инфицировании дыхательных путей микрофлорой окружающей среды. К 7-м суткам отмечали уменьшение количества микроорганизмов в трахее и их видового разнообразия с тенденцией дальнейшего снижения к 14-м суткам исследования.

4.3 Результаты разработки биокомпозиционного материала, содержащего фактор роста эндотелия сосудов

Подчеркиваем еще раз, что одним из основных биологически активных веществ в организме, отвечающих за ангиогенез, является фактор роста эндотелия сосудов. Возрастание его концентрации в органе-мишени может привести к увеличению количества капилляров и улучшению его кровоснабжения, в том числе и в раннем послеоперационном периоде. Для доставки VEGF в зону оперативного вмешательства и длительного его высвобождения разработан биокомпозиционный материал в виде лекарственной пленки. Состав БKM представлен в Таблице 11.

Таблица 11 – Состав оригинального биокомпозиционного материала

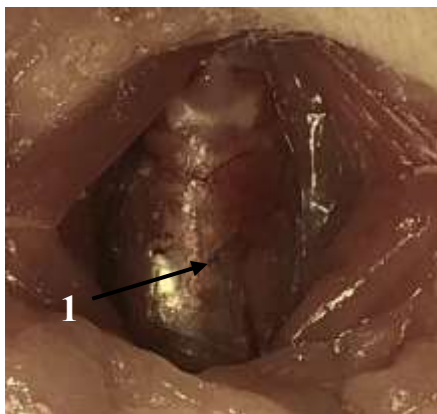
Компоненты биокомпозиционного материала	Массовые части
30%-й водный раствор желатина	1,5
20%-й раствор человеческого альбумина	1,0
Поливинилпирролидон	0,1
Коллаген	3,0
Фибриноген	0,125
Тромбин	1,0
Фактор роста эндотелия сосудов	0,02
Физиологический раствор	10,0

Методика и методология изготовления БKM с VEGF детально описана в главе 2.

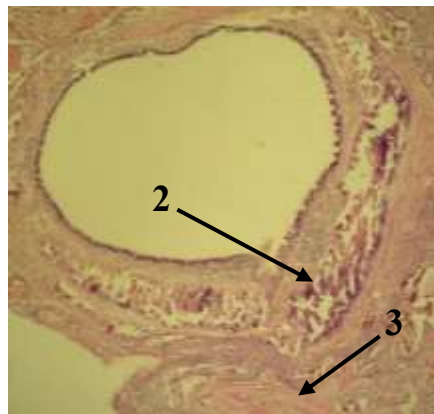
Подчеркнем, что готовая эластичная пленка имеет шероховатую поверхность и надежно фиксируется на влажной поверхности. Пленку нарезали на квадраты 5×5 мм и стерилизовали этиленоксидом в течение 5 ч. Далее фрагменты БKM упаковывали в индивидуальные полиэтиленовые оболочки (Рисунок 23) и хранили в холодильнике при температуре $+4 \div +6$ °C. БKM размещали на ране трахеи (Рисунок 24).



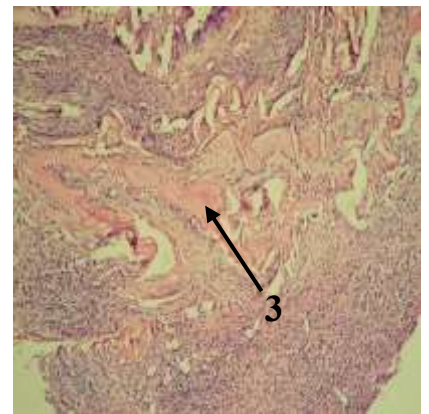
Рисунок 23 – Высушенный биоконпозиционный материал
в полистироловой форме



А



Б



В

Рисунок 24 – Крыса после оперативного вмешательства с локальным применением биоконпозиционного материала: передняя поверхность трахеи с размещенным БКМ (А); морфологическая структура зоны повреждения трахеи на 21-е сутки (Б); БКМ на передней поверхности трахеи (В); 1 – БКМ на передней поверхности трахеи; 2 – зона оперативного вмешательства; 3 – БКМ.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$ (Б), $\times 50$ (В)

Концентрация VEGF в БКМ при разведении пленки на 0,5 мл физиологического раствора определялась в количестве 148,00 pg.

4.4 Роль фактора роста эндотелия сосудов в эволюции раневого процесса и профилактике рубцового стеноза трахеи

Для оценки эффективности заживления раны трахеи и профилактики РСТ с БКМ, содержащим VEGF, проведена вторая серия экспериментов. В группе 2.1 выполняли восстановительную операцию на трахее без использования БКМ, в группе 2.2 – с использованием БКМ без VEGF, в основной группе – с использованием БКМ с VEGF.

Оценивали количество VEGF в нанограммах периферической крови, прочность рубца. Морфологические изменения анализировали методом световой микроскопии. На основании морфометрии оценивали количество сосудов и изменения в стенке трахеи. Исследовали влияние VEGF на показатели воспаления и неспецифической резистентности организма.

Для оценки обмена VEGF в раннем послеоперационном периоде определяли его уровень в периферической крови (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты оценки количества VEGF в плазме крови после восстановительной операции на трахее, pg/ml (медиана, квантили)

Группы	Сутки			
	1-е	3-и	7-е	21-е
2.1	4,1 (2,6–6,8)*	5,0 (4,5–7,0)*	8,9 (5,3–10,4)	12,4 (9,9–16,3)* ⁺
2.2	7,3 (5,6–15,6)	6,1 (3,1–10,2)	12,9 (7,4–14, 7)	17,9 (11,9–26,4)*
2.3	232,2 (217,7–240,9)* ^{#^}	246,3 (191,4–270,3)* ^{#^}	187,3 (146,2 –212,1)* ^{o#^}	42,1 (25,8–47,9)* ⁺
Норма	8,9 (8,2–10,0)			

Примечание. Статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: * – по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$); [#] – между группами 2.1 и 2.3 на один срок ($p_U \leq 0,05$); [^] – между группой 2.2 и основной группой на один срок ($p_U \leq 0,05$). Статистически значимые различия по критерию Вилкоксона: ^o – по сравнению с показателем в той же группе на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); ⁺ – по сравнению с показателем в той же группе на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$)

При оценке количества VEGF на 1-е сутки отмечается его увеличение в группе 2.3 ($p_U = 0,005$) по сравнению с нормой. Выявлены статистически значимые различия между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,005$) и группами 2.3 и 2.2 ($p_U = 0,005$).

На 3-и сутки уровень VEGF в группе 2.3 был выше нормы ($p_U = 0,005$). Отмечаются статистически значимые различия с группами контроля (соответственно $p_U = 0,005$; $p_U = 0,005$).

Количество VEGF на 7-е сутки в группе 2.3 оставалось выше нормы ($p_U = 0,005$). Выявлены аналогичные различия с предыдущими сроками исследования (соответственно $p_U = 0,005$ и $p_U = 0,005$).

К 21-м суткам VEGF в группе 2.3 оставался повышенным относительно нормы ($p_U = 0,005$) и группы 2.1 ($p_U = 0,005$).

В основной группе на 7-е сутки VEGF снижался ($p_W = 0,028$) с максимальным уменьшением на 21-е сутки ($p_W = 0,028$).

В динамике проанализированы показатели воспаления в периферической крови. Результаты представлены в Таблице 13.

На 3-и сутки количество лейкоцитов было выше нормы во всех группах (соответственно $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$) с их увеличением в группе 2.3 по сравнению с группой 2.2 ($p_U = 0,023$). На 7-е сутки статистически значимых различий не выявлено, показатель был выше нормы у всех животных (соответственно $p_U = 0,001$; $p_U = 0,023$; $p_U = 0,002$). На 21-е сутки обнаружены статистически значимые различия между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,006$). Число лейкоцитов было выше нормального значения во всех группах (соответственно $p_U = 0,001$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). У животных основной группы количество лейкоцитов было минимальным на 21-е сутки при сохраняющихся высоких показателях в контрольных группах и существенно снижалось на 7-е сутки исследования в группе 2.3 ($p_W = 0,036$).

Таблица 13 – Результаты сравнительного анализа количества лейкоцитов и изменений в лейкоцитарной формуле под воздействием биокомпозиционного материала, содержащего VEGF, после выполнения восстановительной операции на трахее (медиана, квартили)

Показатели	Группы	Сутки		
		3-и	7-е	21-е
Лейкоциты, $\times 10^9$	2.1	11,9 (11,7–16,2)*	10,5 (7,9–13)*	11,1 (10,4–12,5)*
	2.2	8,3 (7,5–11,3)* [◇]	8,1 (6,6–10,8)*	9,2 (7,5–11,2)* [◇]
	2.3	13,5 (12,0–16,6)* [^]	9,2 (7,0–13,4)* [•]	6,5 (5,4–11,2)* [#]
	Норма	3,2 (3,2–3,3)		
Сегментоядерные, %	2.1	33,0 (28,0–44,0)	18,5 (13,0–24,0)* [•]	27,0 (21,0–36,0)* [○]
	2.2	37,0 (27,0–42,5)	25,0 (17,0–32,5)* [◇]	28,0 (27,5–34,0)*
	2.3	38,5 (30,0–45,0)	35,5 (23,0–41,0) [#]	18,5 (17,0–22,0)* [○]
	Норма	38,5 (38,0–39,0)		
Эозинофилы, %	2.1	2,0 (1,0–3,0)	2,0 (2,0–3,0)	4,5 (2,0–7,0) [○]
	2.2	3,0 (1,5–5,0)	2,0 (1,5–3,0)	4,0 (2,5–6,5)*
	2.3	4,5 (3,5–5,5)*	2,5 (2,0–4,0)	4,5 (4,0–6,5)*
	Норма	2,0 (2,0–2,0)		
Моноциты, %	2.1	7,0 (5,0–8,0)	6,0 (4,0–8,0)	4,0 (3,0–5,0)*
	2.2	8,5 (6,5–10,5)	4,0 (1,5–6,0)	6,0 (5,0–7,0) [◇]
	2.3	8,5 (7,0–11,5)*	4,5 (2,0–7,5) [•]	7,0 (5,5–8,5) [#]
	Норма	6,5 (6,0–7,0)		
Лимфоциты, %	2.1	53,0 (42,0–63,0)	71,0 (70,0–78,0)* [•]	65,0 (56,0–71,0)
	2.2	47,5 (44,0–58,0)	68,0 (62,0–77,0)* [•]	59,5 (53,0–62,5)*
	2.3	48,0 (42,0–56,0)	55,5 (52,0–69,0)* [#]	70,0 (65,5–70,5)*
	Норма	50,5 (50,0–51,0)		

Примечание. Статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: * – по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$); [◇] – между группами 2.1 и 2.2 на один срок ($p_U \leq 0,05$); [#] – между группами 2.1 и 2.3 на один срок ($p_U \leq 0,05$); [^] – между группами 2.2 и 2.3 на один срок ($p_U \leq 0,05$). Статистически значимые различия по критерию Вилкоксона: [•] – на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); [○] – на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$)

Количество сегментоядерных нейтрофилов на 3-и сутки было нормальным. На 7-е сутки выявлены существенные различия между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,019$). На 21-е сутки различий не установлено. По сравнению со здоровыми животными показатель был ниже во всех группах (соответственно $p_U = 0,010$; $p_U = 0,036$; $p_U = 0,002$). В группе 2.3 отмечалось снижение количества сегментоядерных нейтрофилов к 21-м суткам исследования ($p_W = 0,206$).

Отмечалось увеличение эозинофилов в основной группе на 3-и ($p_U = 0,008$) и 21-е ($p_U = 0,006$) сутки.

Количество моноцитов на 3-и сутки было одинаковым. Определялось повышение их количества в основной группе 2.3 ($p_U = 0,010$). На 7-е различий между группами и нормой не было; на 21-е сутки зафиксированы различия между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,012$) и 2.2 и 2.1 ($p_U = 0,023$) – уменьшение количества моноцитов в группе 2.1 ($p_U = 0,015$), а также в группе 2.3 на 7-е сутки исследования ($p_W = 0,036$).

При оценке количества лимфоцитов на 7-е сутки отмечалось статистически значимое различие между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,023$); их число увеличено во всех группах (соответственно $p_U = 0,001$; $p_U = 0,003$; $p_U = 0,031$). На 21-е сутки различий между группами не установлено.

Таким образом БКМ, содержащий VEGF, оказывает воздействие на системную воспалительную реакцию организма с ограничением воспалительных процессов уже к 7-м суткам исследования.

Изучены показатели факторов защиты в периферической крови: фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, НСТ_{сп.}, НСТ_{инд.}, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) (Таблица 14).

Таблица 14 – Результаты сравнительного анализа показателей неспецифического иммунитета в послеоперационном периоде при использовании оригинальной лекарственной пленки (медиана, квантили)

Показатели неспецифического иммунитета	Группы	Сутки		
		3-и	7-е	21-е
Фагоцитарный индекс, %	2.1	67,0 (61,0–83,0)*	71,5 (56,0–77,0)*	82,0 (71–84)* [○]
	2.2	83,5 (76,0–91,5)* [◇]	77,0 (74,0–85,5)*	73,5 (69,5–78,0)*
	2.3	89,0 (87,0–91,0)* [#]	78,5 (70,5–84,5)* [●]	80,0 (78,0–84,0)* [^]
	Норма	52,0 (49,0–55,0)		
Фагоцитарное число, %	2.1	2,2 (1,9–2,7)*	2,2 (2,0–2,4)*	2,1 (2,0–2,2)*
	2.2	2,3 (2,2–2,6)*	2,0 (1,9–2,2)* [●]	2,3 (2,1–2,5)* ^{○◇}
	2.3	2,6 (2,3–2,6)*	1,9 (1,9–2,0)* ^{●#}	2,3 (2,1–2,4)* [○]
	Норма	1,6 (1,5–1,6)		
НСТ _{сп.} , %	2.1	9,0 (7,0–9,0)*	8,5 (6,0–13,0)*	7,0 (5,0–12,0)
	2.2	4,0 (2,0–6,0) [◇]	3,5 (2,5–7,0) [◇]	8,0 (4,0–11,5) [○]
	2.3	17,0 (12,5–21,5)* ^{#^}	6,0 (4,5–21)	17,0 (10,0–24,5)*
	Норма	4,0 (4,0–5,0)		
НСТ _{инд.} , %	2.1	10,0 (8,0–13,0)	12,5 (9,0–16,0)	13,5 (9,0–17,0)
	2.2	8,5 (5,0–11,0)*	10,0 (6,5–14,0)	18,0 (11,0–30,0)
	2.3	24,5 (15,0–35,5)* ^{#^}	26,5 (17,5–50,5)* ^{#^}	26,0 (22,0–40,0)* [#]
	Норма	14,0 (14,0–15,0)		
ЦИК, %	2.1	12,0 (10,0–15,0)	9,5 (6,0–12,0)*	12,5 (9,0–15,0)
	2.2	20,0 (8,0–35,5)	10,0 (6,0–15,5)	10,0 (7,0–19,0)
	2.3	10,0 (5,5–15,5)	10,5 (8,0–18,5)	10,0 (6,0–18,0)
	Норма	7,0 (7,0–8,0)		

Примечание. Статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: * – по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$); [◇] – между группами 2.1 и 2.2 на один срок ($p_U \leq 0,05$); [#] – между группами 2.1 и 2.3 на один срок ($p_U \leq 0,05$); [^] – между группами 2.2 и 2.3 на один срок ($p_U \leq 0,05$). Статистически значимые различия по критерию Вилкоксона: [●] – на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); [○] – на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$)

При определении количества нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе (фагоцитарный индекс), на 3-и сутки выявлены статистически значимые различия

между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,006$), отмечалось высокое значение показателя во всех группах (соответственно $p_U = 0,016$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). На 7-е сутки число нейтрофилов было выше во всех группах (соответственно $p_U = 0,012$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). На 21-е сутки обнаружены статистически значимые различия между группами 2.3 и 2.2 ($p_U = 0,044$). Во всех группах число нейтрофилов было выше нормы (соответственно $p_U = 0,001$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). Установлено снижение числа нейтрофилов на 7-е сутки в группе 2.3 ($p_W = 0,050$).

Фагоцитарное число на 3-и сутки повышалось во всех группах (соответственно $p_U = 0,028$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). На 7-е сутки были отмечены различия между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,004$). На 21-е сутки показатель повышался во всех группах (соответственно $p_U = 0,010$; $p_U = 0,002$; $p_U = 0,002$). В группе 2.3 отмечается снижение фагоцитарного числа на 7-е сутки ($p_W = 0,012$) и повышение – на 21-е сутки ($p_W = 0,018$).

На 3-и сутки выявили различия в показателях НСТ_{сп.} между группами 2.3 и 2.1 ($p_U = 0,016$) и группами 2.3 и 2.2 ($p_U = 0,002$): НСТ_{сп.} был выше в группе 2.3 ($p_U = 0,002$). На 7-е сутки различий между группами 2.3 и 2.1 и 2.3 и 2.2 не зафиксировано. На 21-е сутки различий между группами не обнаружено, отмечалось повышение НСТ_{сп.} в группе 2.3 ($p_U = 0,023$).

Отмечено повышение НСТ_{инд.} на 3-и сутки в группе 2.3 по сравнению с группами 2.1 ($p_U = 0,005$) и 2.2 ($p_U = 0,002$). Метаболический потенциал стимулированных фагоцитирующих клеток на 7-е и 21е сутки ($p_U = 0,023$) был повышен в основной группе по сравнению с группами 2.1 ($p_U = 0,002$) и 2.2 ($p_U = 0,002$). Статистически значимых различий между группами не выявлено.

Таким образом, применение БКМ, содержащего VEGF, стимулирует неспецифический иммунный ответ начиная с 3-х суток исследования.

Изучено влияние БКМ, содержащего VEGF, на бактериальную обсемененность трахеи. Проведены логарифмирование и сравнительный анализ с использованием критериев Манна – Уитни и Вилкоксона для выявления его действия на видовой состав микроорганизмов.

С 3-х суток определялся рост ассоциативной флоры: *Pr. rettgeri*, грибов рода *Candida*, *C. freundii*, эпидермального стафилококка, синегнойной палочки, золотистого стафилококка и микоплазмы в количестве 10^3 КОЕ. К 7-м суткам отмечали увеличение количества микроорганизмов и их видового разнообразия с уменьшением к 21-м суткам. При использовании оригинальной пленки определяются ассоциации *P. rettgeri*, грибов рода *Candida*, *P. mirabilis*, *C. freundii*. Использование оригинальной пленки не увеличивает местную микробную нагрузку в раннем послеоперационном периоде: выявляются единичные колонии *P. rettgeri*, грибов рода *Candida*, эпидермального стафилококка и кишечной палочки (10^3 КОЕ).

Результаты, полученные при морфологическом исследовании стенки трахеи, представлены на Рисунках 25–29.

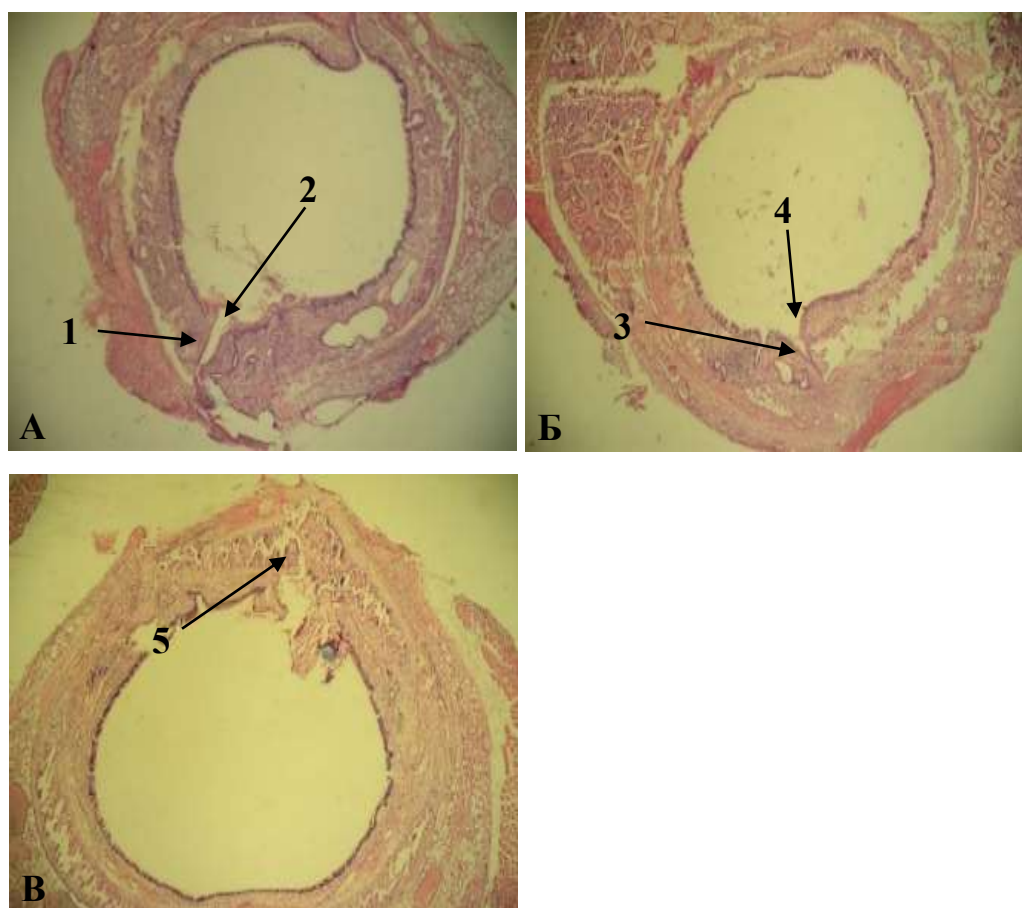


Рисунок 25 – Морфологическая структура стенки трахеи, просвет трахеи, срез на уровне средней трети (3-и сутки исследования): группы 2.1 (А), 2.2 (Б) и 2.3 (В); 1, 3, 5 – послеоперационная рана (группы 2.1, 2.2, 2.3 соответственно); 2 – диастаз краев раны; 4 – «карман» в слизистой оболочке трахеи.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$ (А, Б, В)

При гистологическом исследовании на 3-и сутки в группах 2.3 и 2.1 визуализируется диастаз краев раны, в группе 2.2 виден «карман» в слизистой оболочке трахеи (см. Рисунок 25).

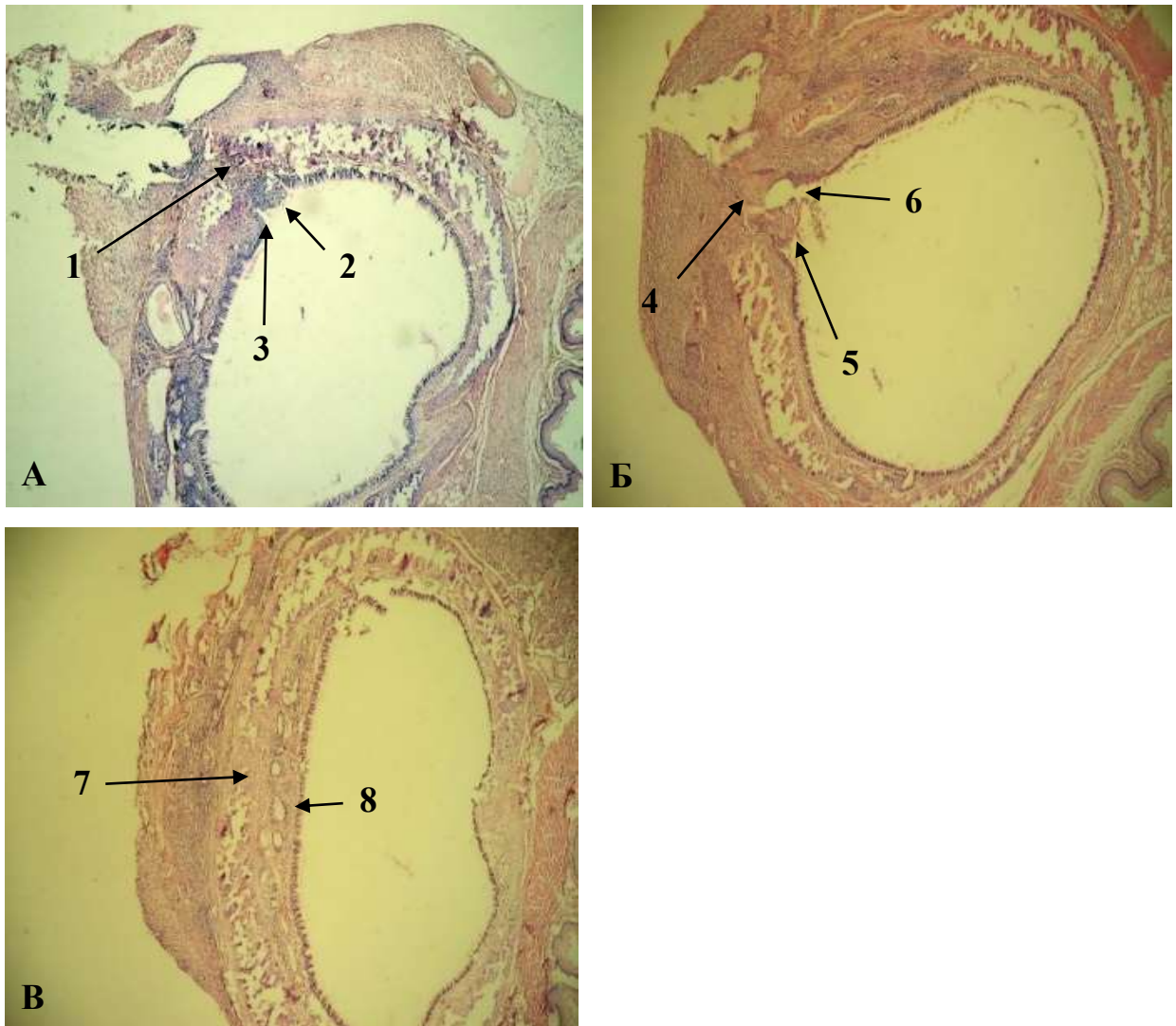


Рисунок 26 – Морфологическая структура стенки трахеи, просвет трахеи, срез на уровне средней трети (7-е сутки исследования): группы 2.1 (А), 2.2 (Б) и 2.3 (В). 1, 4, 7 – послеоперационная рана (группы 2.1, 2.2, 2.3 соответственно); 2, 5 – лейкоцитарный инфильтрат (группы 2.1, 2.2 соответственно); 3, 6 – «карман» в слизистой оболочке трахеи (группы 2.1, 2.2 соответственно); 8 – слизистая оболочка трахеи без дефекта. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 40$ (А, Б, В)

В основной группе на 7-е сутки выявлены заживление раны без дефектов во всех слоях стенки трахеи, множественные железы и новообразованные сосуды в подслизистом слое. В контрольных группах зафиксированы лейкоцитарная инфильтрация, дефект слизистой оболочки (см. Рисунок 26).

В основной группе на 21-е сутки наступило сращение краев раны, обнаруживались множественные железы и новообразованные сосуды в подслизистом слое трахеи (Рисунок 27).

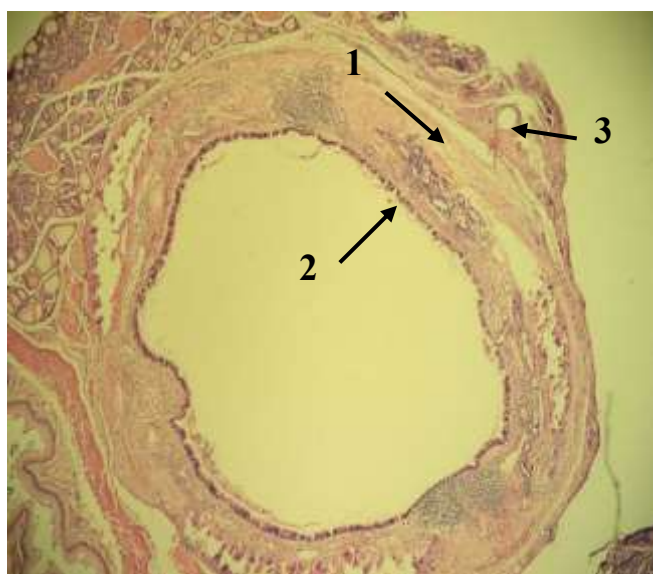


Рисунок 27 – Морфологическая структура стенки и просвет трахеи, срез на уровне ее средней трети, группа 2.3 (21-е сутки исследования):
1 – послеоперационная рана; 2 – слизистая оболочка трахеи без дефекта;
3 – просвет от шовного материала. Окраска гематоксилином и эозином.

Увеличение $\times 40$

В группах 2.1 и 2.2 на 21-е сутки хрящ не восстановлен, в зоне операции выявлены деформация стенки, слизистая оболочка с дефектом (Рисунки 28, 29).

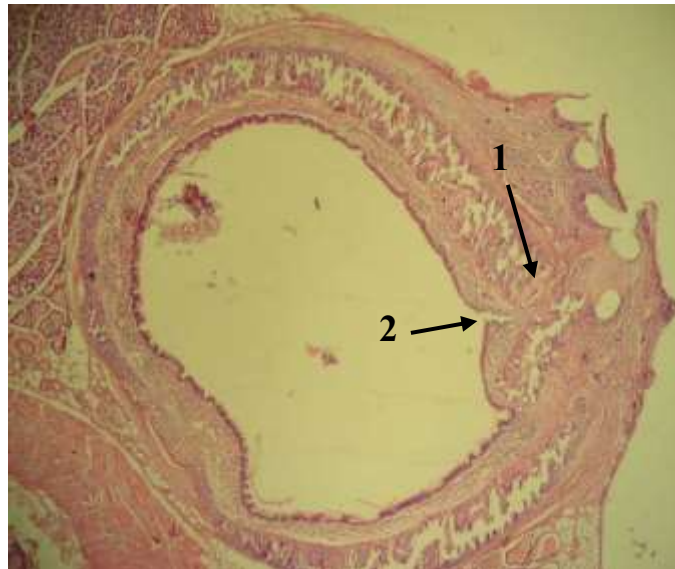


Рисунок 28 – Морфологическая структура стенки и просвет трахеи, срез на уровне ее средней трети, группа 2.1 (21-е сутки исследования):
1 – послеоперационная рана; 2 – «карман» в слизистой оболочке трахеи.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$



Рисунок 29 – Морфологическая структура стенки и просвет трахеи, срез на уровне ее средней трети, группа 2.2 (21-е сутки исследования):
1 – послеоперационная рана; 2 – «карман» в слизистой оболочке трахеи.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$

Для оценки влияния оригинальной лекарственной пленки на репаративные процессы выполнено морфометрическое исследование на 3-и, 7-е и 21-е сутки послеоперационного периода (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты морфометрии тканей трахеи в группах 2.1, 2.2 и 2.3

Показатель	Группы	Сутки		
		3-и	7-е	21-е
Толщина стенки трахеи, у. е.	2.1	599 (440–664)	610 (484–647)	458 (438–499)
	2.2	428 (409–460)	584 (543–611)	342 (290–372) [°]
	2.3	485 (352–570)	603(524–630) [•]	371 (340–425) ^{°°}
Толщина рубца, у. е.	2.1	236 (141–467)	295 (183–367)	338 (273–426)
	2.2	250 (221–306)	301 (261–341)	255 (232–278) [°]
	2.3	238 (220–274)	259 (201–365)	145 (142–161) ^{°#°}
Площадь зоны операции, у. е.	2.1	589442 (526472–669725)	449400 (443216–504963)	352878 (311953–461386)
	2.2	331446 (274700–410721)	464795 (410518–519287)	236953 (188176–285510) ^{*°}
	2.3	477581 (421533–516670)	627434 (561469–707666) [#]	398487 (222046–483714) [°]
Площадь сосудов, %	2.1	3847 (2339–8502)	2725 (1680–3579)	722 (471–2128)
	2.2	2239 (1841–5410)	1752 (1475–1843)	4973 (4513–5421) ^{*°}
	2.3	5995 (3260–6587)	10220 (4210–14704)	10060 (5837–15239) ^{°#}
Соотношение толщины рубца к толщине стенки, %	2.1	37 (32–70)	48 (41–57)	77 (56–93)
	2.2	58 (54–64)	51 (46–69)	72 (59– 80)
	2.3	52 (48–63)	47 (32–57)	36 (30–50) ^{°#}
Соотношение площади сосудов к площади зоны операции, %	2.1	1 (0,3–1,8)	0,6 (0,3–0,7)	0,2 (0,2–0,5)
	2.2	0,7 (0,6–1,3)	0,4 (0,4–0,4) [•]	1,9 (1,3–2,5) ^{*°}
	2.3	1,4 (0,6–1,6)	1,6 (0,4–2,3)	2,9 (2,8–3,3) [°]

Примечание. Статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: * – между группами 2.1 и 2.2 ($p_U \leq 0,05$); [°] – между группами 2.1 и 2.3 ($p_U \leq 0,05$); [#] – между группами 2.2 и 2.3 ($p_U \leq 0,05$). Статистически значимые различия по критерию Вилкоксона: [•] – на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); [°] – на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$)

Таким образом, в основной группе толщина стенки трахеи увеличивалась к 7-м ($p_W = 0,028$) и уменьшалась на 21-е сутки исследования ($p_W = 0,028$). Установлено ее уменьшение по сравнению с группой 2.1 ($p_U = 0,045$).

Толщина послеоперационного рубца статистически значимо уменьшается в основной группе на 21-е сутки исследования ($p_W = 0,028$) до минимальных показателей ($p_U = 0,005$; $p_U = 0,042$).

На 7-е сутки площадь зоны операции в основной группе статистически значимо больше, чем в группе 2.2 ($p_U = 0,019$). На 21-е сутки она становилась наименьшей ($p_W = 0,046$).

На 21-е сутки площадь сосудов в зоне операции была больше, чем в группах 2.1 и 2.2 (соответственно $p_U = 0,008$; $p_U = 0,045$).

Соотношение площади сосудов к площади зоны оперативного вмешательства в основной группе не менялось. На 21-е сутки показатель был больше в группах 2.3 и 2.2 по сравнению с группой 2.1 (соответственно $p_U = 0,013$; $p_U = 0,008$).

Для оценки влияния VEGF на прочность стенки трахеи в зоне оперативного вмешательства выполнена ранотензиометрия (Таблица 16).

Таблица 16 – Результаты ранотензиометрии зоны оперативного вмешательства в группах 2.1, 2.2 и 2.3, у. е.

Группы	Сутки		
	3-и	7-е	21-е
2.1	135 (130–140)	160 (140–180) [•]	200 (190–210) [°]
2.2	130 (120–140)	175 (150–200) [•]	215 (200–230) [°]
2.3	140 (130–150)	220 (200–240) ^{°#•}	265 (250–280) ^{°#°}

Примечание. Статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: [°] – между группами 2.1 и 2.3 ($p_U \leq 0,05$); [#] – между группами 2.2 и 2.3 ($p_U \leq 0,05$). Статистически значимые различия по критерию Вилкоксона: [•] – на 3–7-е сутки ($p_W \leq 0,05$); [°] – на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$).

На 3-и сутки разрыв трахеи в зоне оперативного вмешательства происходил при нагрузке в 130–140 у. е. во всех группах.

К 7-м суткам в основной группе разрыв фиксировался при нагрузке 220 у. е., в группах 2.1 и 2.2 – при 160 и 175 у. е. соответственно. Статистически значимых различий не выявлено.

На 21-е сутки разрыв трахеи в основной группе происходил при нагрузке в 265 у. е., что больше чем в группах 2.1 и 2.2 (соответственно $p_U = 0,004$; $p_U = 0,004$).

Проведена оценка влияния БКМ, содержащего VEGF, на бактериальную обсемененность при реконструктивной операции на трахее (Таблицы 17–19).

На 3-и сутки послеоперационного периода определяли рост микроорганизмов в количестве 10^3 КОЕ: грибов рода *Candida*, эпидермального стафилококка, синегнойной палочки, золотистого стафилококка, микоплазмы в виде ассоциаций – в 100 % случаев.

На 7-е сутки также зафиксирован рост микроорганизмов в количестве 10^3 КОЕ: *Pr. rettgeri*, грибов рода *Candida*, *C. freundii*, эпидермального стафилококка, синегнойной палочки, золотистого стафилококка, микоплазмы в виде ассоциаций – в 100 % случаев.

На 21-е сутки микробная флора не обнаружена.

Грибы рода *Candida* фиксируются с 3-х суток исследования, причем отмечается статистически значимое отличие от нормальных показателей на 7-е сутки ($p_U = 0,0013$), а различия между сроками – на 21-е сутки ($p_W = 0,0277$). Зафиксирован рост эпидермального стафилококка начиная с 3-х суток со статистически значимыми отличиями от нормальных показателей на 7-е сутки ($p_U = 0,0246$); различия между сроками не выявлены. Количество прочих микроорганизмов статистически значимо не отличается от нормальных показателей.

Таблица 17 – Микробная обсемененность фрагмента трахеи крыс после реконструктивной операции на трахее в группе 2.1, Lg КОЕ/см²

Сутки	Микроорганизмы, Lg КОЕ/см ²									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3-и сутки	0	1,5 (0,0–3,0)	0	0	1,5 (0,0–3,0)	0 (0,0–3,0)	0 (0,0–3,0)	0 (0,0–3,0)	0	0 (0,0–3,0)*
7-е сутки	0 (0,0–3,0)	3,0 (3,0–3,0)*	0	1,5 (0,0–3,0)	3,0 (0,0–3,0)*	0	0	0	0	3,0 (0,0–3,0)*
21-е сутки	0	0°	0	0	0	0	0	0	0	0°

Примечание: * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни: по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$); ° – значимые различия по критерию Вилкоксона (по сравнению с показателем в той же группе) на 7–21-е сутки ($p_W \leq 0,05$); 1 – *Proteus rettgeri*; 2 – грибы рода *Candida*; 3 – *Proteus mirabilis*; 4 – *Citrobacter freundii*; 5 – *Staphylococcus epidermidis*; 6 – *Pseudomonas aeruginosa*; 7 – *S. aureus*; 8 – микоплазма; 9 – *Escherichia coli*; 10 – общая обсемененность всеми микроорганизмами

Таблица 18 – Микробная обсемененность фрагмента трахеи крыс после реконструктивной операции на трахее с использованием лекарственной пленки пролонгированного действия в группе 2.2, Lg КОЕ/см²

Сутки	Микроорганизмы, Lg КОЕ/см ²									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3-и сутки	0	3,0 (3,0–3,0)*	1,5 (0,0–3,0)	1,5 (0,0–3,0)	0	0	0	0	0	3,0 (0,0–3,0)*
7-е сутки	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21-е сутки	0	0 (0,0–3,0)	0	0	0	0	0	0	0	0*

Примечание: * – статистически значимые различия по критерию Манна – Уитни по сравнению с нормой ($p_U \leq 0,05$).

Микроорганизмы: 1 – *Proteus rettgeri*; 2 – грибы рода *Candida*; 3 – *Proteus mirabilis*; 4 – *Citrobacter freundii*; 5 – эпидермальный стафилококк; 6 – синегнойная палочка; 7 – золотистый стафилококк; 8 – микоплазма; 9 – кишечная палочка; 10 – общая обсемененность всеми микроорганизмами.

Таблица 19 – Микробная обсемененность фрагмента трахеи крыс после реконструктивной операции на трахее с использованием лекарственной пленки пролонгированного действия, содержащей VEGF, в группе 2.3, Lg КОЕ/см²

Сутки	Микроорганизмы, Lg КОЕ/см ²									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3-и сутки	0 (0,0–3,0)	0	0	0	1,5 (0,0–3,0)	0	0	0	0	0
7-е сутки	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,0–3,0)	0
21-е сутки	0	0 (0,0–3,0)	0	0	0 (0,0–3,0)	0	0	0	0	0

Примечание. Микроорганизмы: 1 – *Proteus rettgeri*; 2 – грибы рода *Candida*; 3 – *Proteus mirabilis*; 4 – *Citrobacter freundii*; 5 – эпидермальный стафилококк; 6 – синегнойная палочка; 7 – золотистый стафилококк; 8 – микоплазма; 9 – кишечная палочка; 10 – общая обсемененность всеми микроорганизмами.

Также оценивалась суммарная обсемененность трахеи на 3-и, 7-е и 21-е сутки. При анализе показателя суммарной обсемененности трахеи выявлено статистически значимое различие с нормой на 3-и ($p_U = 0,0001$) и 7-е ($p_U = 0,000004$) сутки. Статистически значимые различия между группами зафиксированы на 21-е сутки ($p_W = 0,00126$), однако отмечается тенденция к увеличению обсемененности стенки трахеи к 7-м и снижение – к 21-м суткам.

На 3-и сутки послеоперационного периода определяли рост микроорганизмов в количестве 10^3 КОЕ: грибов рода *Candida*, *P. mirabilis*, *C. freundii* в виде ассоциаций – в 100 % случаев.

На 7-е сутки микроорганизмы не обнаружены. На 21-е сутки отмечено их появление в количестве 10^3 КОЕ. Установлен рост грибов рода *Candida* в 100 % случаев.

Выявлены следующие изменения количества микроорганизмов: количество грибов рода *Candida* статистически значимо отличается от нормальных показателей на 3-и сутки исследования ($p_U = 0,0013$), различия между сроками не отмечены; количество прочих микроорганизмов статистически значимо не отличается от нормальных показателей.

При оценке суммарной обсемененности трахеи выявлено статистически значимое различие с нормой на 3-и сутки ($p_U = 0,0001$); статистически значимые различия между группами не обнаружены (соответственно $p_W = 0,0679$; $p_W = 0,0679$).

Таким образом, использование лекарственной пленки пролонгированного действия не увеличивает микробную нагрузку на трахею в раннем послеоперационном периоде по сравнению с группой 2.1.

При использовании лекарственной пленки пролонгированного действия, содержащей VEGF, в послеоперационном периоде выявлен единичный рост колоний микроорганизмов в количестве 10^3 КОЕ. Обнаружены *P. rettgeri*, грибы рода *Candida*, эпидермальный стафилококк и кишечная палочка.

Все это свидетельствует о том, что улучшение васкуляризации стенки трахеи в раннем послеоперационном периоде в результате применения

лекарственной пленки пролонгированного действия, содержащей VEGF, приводит к усилению местных защитных реакций организма.

Итак, показана эффективность применения БКМ, содержащего VEGF, для индукции регенерации тканей трахеи и профилактики РСТ в зоне оперативного вмешательства за счет стимуляции ангиогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение регенерации стенки трахеи после длительной оротрахеальной интубации или трахеостомии, травм шеи – основная причина развития РСТ [51]. Ежегодно число пациентов с обсуждаемой патологией увеличивается на 5 % [2]. В результате перенесенного заболевания до 25 % из них остаются инвалидами [59]. Осложнения хирургического лечения возникают в 28 % наблюдений, в результате которых 10 % пациентов погибают [41]. Нарушение регенерации стенки трахеи при РСТ связано с травмой гиалиновых хрящей и развитием аутоиммунного воспаления, дефицитом кровоснабжения передней стенки, присоединением госпитальной ассоциированной микрофлоры, системной гипоксией [13].

На первом этапе исследования проведен анализ результатов лечения пациентов с РСТ. Основными причинами развития осложнений были трахеостомия (72,5 %) и длительная оротрахеальная интубация (21,5 %) вследствие черепно-мозговой травмы (27,4 %), сочетанной травмы (21,6 %), тяжелой соматической патологии (19,6 %) и перенесенных плановых (13,7 %) и экстренных (11,8 %) оперативных вмешательств. У 80,0 % пациентов был стеноз 3–4-й степени, что служило показанием для экстренного восстановления проходимости дыхательных путей. Преобладали комбинированные поражения (38,0 %) и стеноз шейного отдела трахеи (32,0 %). Выявлена средняя корреляция между степенью сужения трахеи и тяжестью состояния пациента при поступлении ($R = 0,573$),

Хирургические вмешательства по поводу РСТ сопровождались послеоперационными осложнениями в 22,4% случаев. Одним из факторов, утяжеляющих течение заболевания, было присоединение ассоциированной бактериальной инфекции [28].

Для изучения нарушений гемодинамики малого круга при сужении просвета трахеи была разработана его экспериментальная модель. Установлено, что сужение трахеи более чем на 50 % приводит к увеличению массы миокарда,

толщины стенки и давления в правом желудочке. При одномоментном сужении просвета трахеи на 14-е сутки определено разделение групп по следующим дискриминирующим факторам: масса, давление, толщина миокарда правого желудочка, сегментоядерные лейкоциты, фагоцитоз, НСТ_{инд.}, НСТ_{сп.}, лейкоциты, эритроциты [3, 29]. Обнаруженные изменения подтверждены гистологически: начиная с 7-х суток определяются отек стромы, увеличение ядер кардиомиоцитов, дистрофические процессы, утолщение стенки правого желудочка. Обнаруженные изменения соответствуют развитию ЛГ и отражают течение заболевания в клинике, что дает возможность изучения как механизмов нарушения функций внешнего дыхания и гемодинамики, так и методов их коррекции.

Проведенные исследования показали, что несостоятельность анастомоза при циркулярной резекции трахеи возникает по передне-боковой полуокружности [5]. Выдвинута гипотеза о том, что регенерацию стенки трахеи после реконструктивных операций можно улучшить стимуляцией ангиогенеза локальным воздействием фактора роста эндотелия сосудов, что приведет к увеличению количества сосудов в подслизистом слое, ранней эпителизации слизистой оболочки трахеи и улучшению механических свойств послеоперационного рубца.

В связи с этим предложен новый биокomпозиционный материал (30%-й водный раствор желатина – 1,5 МЧ; 20%-й раствор человеческого альбумина – 1,0 МЧ; поливинилпирролидон – 0,1 МЧ; коллаген – 3,0 МЧ; фибриноген – 0,125 МЧ; тромбин – 1,0 МЧ; VEGF – 0,02 МЧ; физиологический раствор – 10,0 МЧ). Показатель VEGF в основной группе был больше нормы в 27 раз на 7-е сутки исследования и выше, чем в группах 2.1 и 2.2 (Глава 5; см. Таблицу 16). Полученные результаты, по нашему мнению, связаны с экзогенным внесением VEGF в организм животных и индукции выработки собственного VEGF [12].

Для проведения анатомического обоснования применения биокomпозиционного материала, содержащего VEGF, было выполнено топографо-анатомическое исследование трахеи крыс линии «Wistar». Выявлены гиалиновые хрящи в форме кольца; в подслизистом слое трахеи обнаружены

множественные участки MALT со скоплением в области карины, создающие барьер для инфекции. Они обеспечивают хороший местный иммунитет. По гистологическому строению стенка трахеи крысы близка к трахее человека, имеет выраженную адвентицию, хрящевой каркас, подслизистую основу и слизистую оболочку. Особенность кровоснабжения – сегментарный и радиальный характер. Передняя стенка трахеи обеспечивается нижней и верхней щитовидными артериями, ветви которых расположены в адвентициальном слое. Задняя и боковая поверхности кровоснабжаются этими же сосудами. Формируются продольные сосудистые анастомозы, которые образуют выраженное трахеопищеводное сплетение. Из него ветви проникают в подслизистый слой трахеи, где сосудистая сеть наиболее выражена в задней полуокружности, то есть мембранозная часть кровоснабжается лучше, чем передняя стенка. Выявленные топографо-анатомические особенности позволяют предположить, что влияние на ангиогенез стенки трахеи может улучшить ее регенеративные возможности [27].

Для подтверждения этой гипотезы исследовали эффективность фактора роста эндотелия сосудов в раннем послеоперационном периоде.

Установлено, что при использовании БКМ, содержащего VEGF, различия по сравнению с контролем в регенерации тканей стенки трахеи проявлялись уже на 7-е сутки: эпителизация слизистой оболочки; в зоне послеоперационной раны определяется большое количество новообразованных сосудов и желез. К 21-м суткам сохранялась высокая плотность сосудов. Происходило заживление тонким послеоперационным рубцом [30].

При оценке механических свойств, установлено статистически значимое увеличение прочности трахеи в 1,5 раза начиная с 7-х суток.

Выяснено, что БКМ, содержащий VEGF, оказывает воздействие на системный воспалительный ответ организма. В основной группе выявлено статистически значимое уменьшение количества лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, увеличение эозинофилов к 21-м суткам и снижение количества моноцитов начиная с 7-х суток.

БКМ, содержащий VEGF, статистически значительно способствует увеличению фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа с 3-х суток. Установлено усиление фагоцитарной активности лейкоцитов, проявляющееся статистически значимым повышением НСТ_{сп.} и НСТ_{инд.} начиная с 3-х суток исследования.

Влияние VEGF на бактериальную обсемененность трахеи проявляется единичным ростом колоний, в отличие от контрольных животных, у которых обнаружена массивная ассоциативная микробная контаминация дыхательных путей (Рисунок 30).

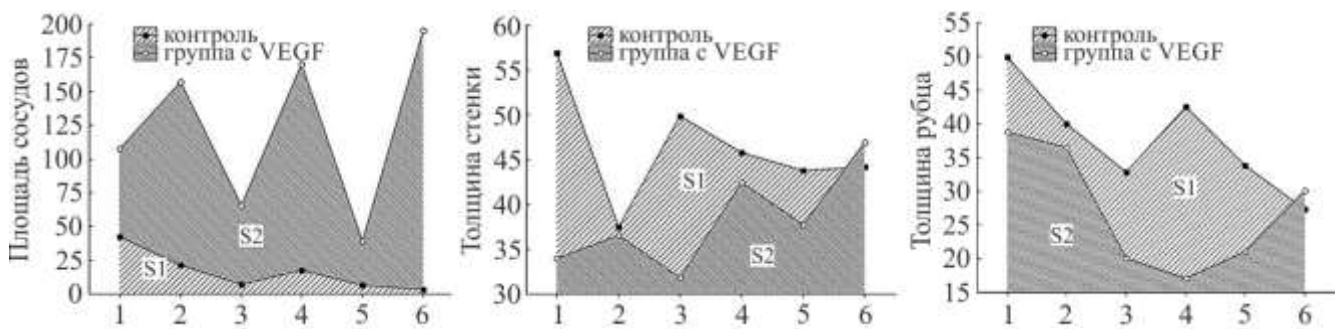


Рисунок 30 – Сравнительные данные показателей интегральной площади толщины рубца, площади сосудов и толщины стенки трахеи у 6 животных контрольной группы (S1) и животных с VEGF (S2) на 21-е сутки наблюдения

При сравнении интегральной площади толщины послеоперационного рубца трахеи выявлено уменьшение площади на 31 %, увеличение площади сосудов на 569% и уменьшение толщина стенки трахеи на 16,9% в группе с БКМ с VEGF по сравнению с группой контроля.

На Рисунке 31 представлена концептуальная схема механизмов регенерации стенки трахеи при воздействии VEGF после выполнения восстановительной операции.

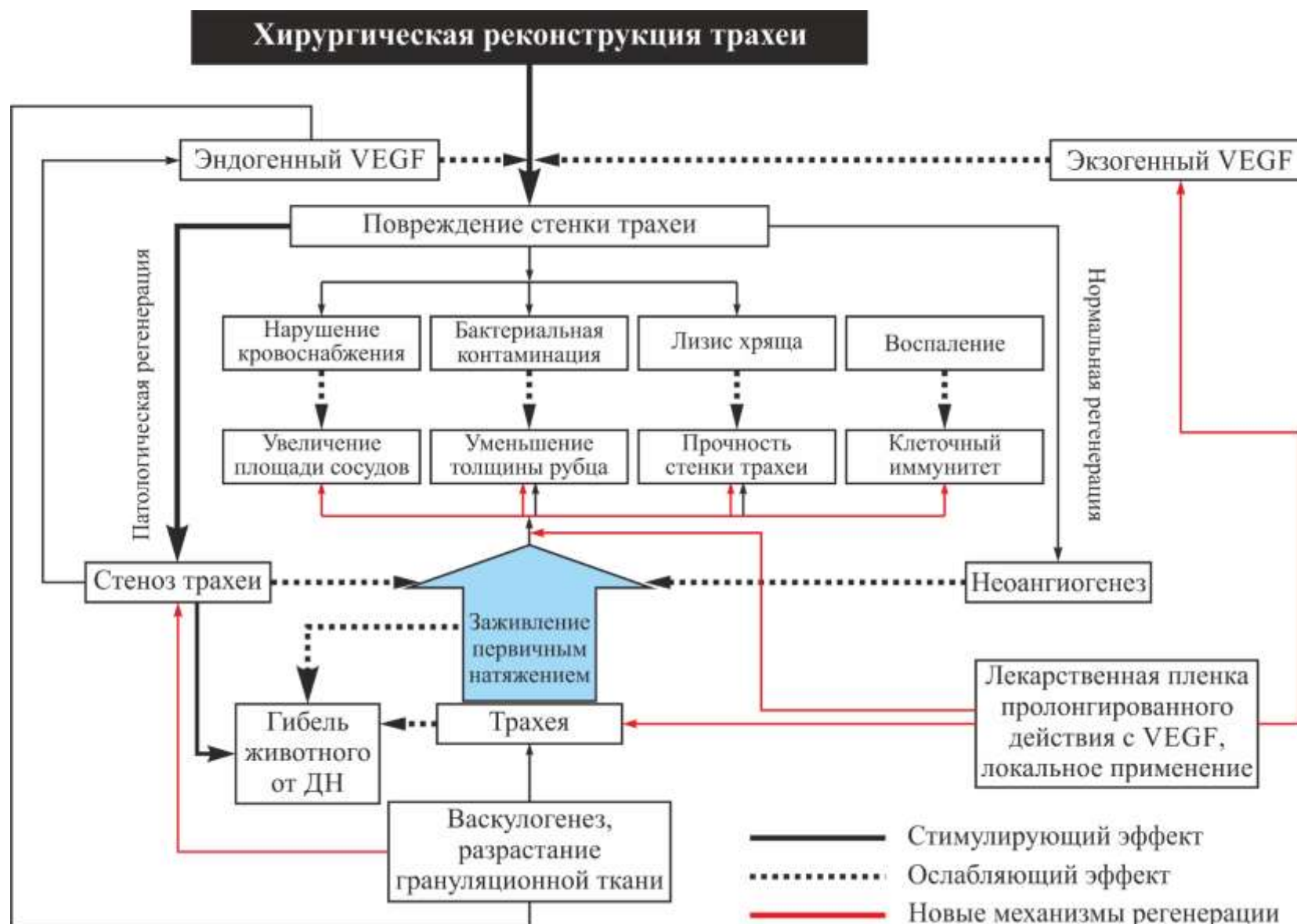


Рисунок 31 – Схема механизмов регенерации стенки трахеи при локальной стимуляции ангиогенеза:

ДН – дыхательная недостаточность

Повреждение передней стенки трахеи усугубляет дефицит локального кровоснабжения и способствует присоединению бактериальной инфекции, лизису хряща, развитию воспаления и сужению просвета трахеи с развитием дыхательной недостаточности и гибели животного.

Повреждение стенки трахеи с развитием стеноза является пусковым механизмом для выработки эндогенного VEGF, однако при патологическом течении регенерации развивается избыточный рост сосудов и разрастание грануляционной ткани, приводящие к дальнейшему сужению просвета и смерти животного.

Для предотвращения развития патологической регенерации предложено использовать экзогенный VEGF в виде БКМ, что позволяет обеспечить заживление раны первичным натяжением с увеличением площади сосудов, прочности стенки трахеи и уменьшением толщины рубца со стимуляцией неспецифических факторов защиты.

Таким образом, обобщенные результаты работы расширяют современные представления о механизмах регенерации стенки трахеи в условиях локального воздействия VEGF и могут быть основанием для дальнейшего исследования с обоснованием трансляции разработанных методов стимуляции ангиогенеза тканей в клинику.

ВЫВОДЫ

1. При оценке результатов лечения пациентов установлено, что основной причиной развития рубцового стеноза трахеи была длительная ИВЛ, которая проводилась в большинстве наблюдений при сочетанной травме, черепно-мозговых и спинальных повреждениях, нарушениях мозгового кровообращения. Рубцовый стеноз трахеи у 72,5 % пациентов развивался после трахеостомии и в 21,5 % – в результате оротрахеальной интубации. Из-за рецидива рубцового стеноза трахеи после парахирургического и консервативного лечения 55 % пациентов многократно госпитализировались для повторного бужирования и санации трахеобронхиального дерева. Выявлена прямая средняя корреляция между степенью РСТ (более 50 %) и развитием на фоне дыхательной недостаточности легочной гипертензии ($R = 0,573$) в течение 5 месяцев болезни, что подтверждено в эксперименте.

2. Радикальным методом лечения РСТ является циркулярная резекция трахеи. Наиболее тяжелое осложнение ЦРТ – несостоятельность трахеального анастомоза в результате контаминации дыхательных путей ассоциативной нозокомиальной микрофлорой и развития анастомозита (84,8 %) – встречалось в 20 % наблюдений. Дефект формировался прежде всего по передне-боковой полуокружности соустья при состоятельности швов задней стенки трахеи в 100 % наблюдений. Данные подтверждены результатами изучения анатомии трахеи крыс линии «Wistar» и экспериментальным исследованием.

3. Разработан оригинальный БКМ в виде пленки $0,5 \times 0,5$ см, содержащий VEGF в количестве 148,0 pg/ml при разведении в 0,5 мл физиологического раствора. При размещении на ране передней стенки трахеи пленка сохраняется до 21 суток. Уровень VEGF в плазме крови статистически значимо повышается уже на первые сутки аппликации пленки.

4. При оценке эффективности пленки установлено, что эпителизация дефекта слизистой оболочки наступает на 7-е сутки в результате активного неоангиогенеза со статистически значимым увеличением количества и площади

сосудов. Прочность послеоперационного рубца с уменьшением его толщины статистически значимо увеличивается. БКМ с VEGF способствует купированию общей и местной воспалительной реакции. Установлено, что статистически значимо снижается количество лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в течение 21 суток. В результате активации неспецифического клеточного иммунитета статистически значимо увеличиваются фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, $HCT_{сп.}$ и $HCT_{инд.}$ с третьих суток применения БКМ с VEGF. Закономерностью регенерации после ушивания раны передней стенки трахеи и аппликации БКМ, содержащего VEGF, было статистически значимое уменьшение послеоперационного рубца, толщины стенки трахеи и увеличение площади сосудов в зоне вмешательства по сравнению с группой контроля.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЕРО	– эритропоэтин (англ. erythropoietin)
MALT	– лимфоидная ткань слизистых оболочек (англ. mucosal-associated lymphoid tissue)
NO	– оксид азота
TGF	– трансформирующий фактор роста (transforming growth factor)
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов (англ. vascular endothelial growth factor)
БКМ	– биоконпозиционный материал
ДТП	– дорожно-транспортное происшествие
ЖЕЛ	– жизненная емкость легких
ИВЛ	– искусственная вентиляция легких
КОЕ	– колониеобразующие единицы
ЛГ	– легочная гипертензия
МКБ-10	– Международная классификация болезней 10-го пересмотра
МОС	– максимальная объемная форсированная скорость выдоха определенной доли ФЖЕЛ
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
МСКТ	– мультиспиральная компьютерная томография
МЧ	– массовая часть
НСТ	– нитросиний тетразолий
НСТ _{инд.}	– индуцированный нитросиний тетразолий тест
НСТ _{сп.}	– спонтанный нитросиний тетразолий тест
ОФВ1	– объем форсированного выдоха за первую секунду маневра форсированного выдоха
ПОС	– пиковая объемная форсированная скорость выдоха
РСТ	– рубцовый стеноз трахеи
ФБС	– фибробронхоскопия
ФЖЕЛ	– форсированная жизненная емкость легких

- ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
ЦРТ – циркулярная резекция трахеи
ЭХО-КГ – эхокардиография

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаева, Н. Н. Некоторые патогенетические механизмы раневого процесса при стойких деформациях гортани и трахеи / Н. Н. Абдулаева, Х. К. Ходжаева // Вестник оториноларингологии. – 2002. – № 4. – С. 8–10.
2. Бойко, В. В. Хирургическое лечение больных с рубцовыми стенозами трахеи / В. В. Бойко, А. Н. Шкурат // Международный медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 72–76.
3. Влияние одномоментного экспериментального сужения просвета трахеи на содержание лейкоцитов у крыс / И. С. Курганский, С. А. Лепехова, Л. В. Зарицкая [и др.] // Забайкальский медицинский вестник. – 2019. – № 3. – С. 36–40.
4. Влияние фактора ангиогенеза на морфофункциональное состояние миокарда у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда / А. С. Сисакян, В. А. Оганян, А. Б. Семерджян [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 63–66.
5. Возможности предупреждения несостоятельности швов трахеи / Е. О. Иноземцев, И. С. Курганский, С. А. Лепехова, Е. Г. Григорьев // Вестник оториноларингологии. – 2018. – № 3. – С. 94–97.
6. Возможности эндоскопических и хирургических методов лечения при рубцовых стенозах трахеи / Б. Н. Котив, Л. Н. Бисенков, И. Б. Попов [и др.] // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2013. – № 1. – С. 16–19.
7. Гончарова, А. С. Определение уровней плацентарного фактора роста PlGF в пуповинной крови новорожденных при физиологической и осложненной гестозом беременности / А. С. Гончарова // Методология, теория и практика в современной медицине, биологии, фармацевтике, ветеринарии : Материалы Международной научно-практической конференции. – Новосибирск : ООО «Агенство «Сибпринт», 2013. – С. 9–11.

8. Жестков, К. Г. Стентирование как метод лечения стенозов трахеи / К. Г. Жестков, Б. В. Барский, Н. С. Савельева // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 44–46.

9. Клеточная терапия хронических стенозов гортани и трахеи с применением аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обонятельной выстилки / Н. Г. Антонец, А. Е. Гончаров, В. Л. Чека, Э. А. Стринкевич // Гены и клетки. – 2019. – № 5. – С. 23–24.

10. Клинические рекомендации по хирургическому лечению больных приобретенным рубцовым стенозом трахеи ; утверждены на общем собрании Ассоциации торакальных хирургов России на V Международном конгрессе «Актуальные направления современной кардио-торакальной хирургии» [Электронный ресурс]. – М., 2015. – Режим доступа: http://thoracic.ru/wp-content/uploads/НКТ-по-лечению-приобретенных-рубцовых-стенозов-трахеи-редакция-от-15.09.2015_.pdf (дата обращения: 28.09.2020).

11. Кокорина, В. Э. Применение коллагеназы КК для профилактики постреанимационных стенозов гортани и трахеи / В. Э. Кокорина, Г. Т. Обыденников, Ю. А. Красников // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2004. – № 1. – С. 61–63.

12. Курганский, И. С. Способ изготовления лекарственной плёнки пролонгированного действия, содержащей VEGF / И. С. Курганский // Acta biomedica scientifica. – 2020. – № 6. – С. 282–285.

13. Курганский, И. С. Способы лечения и профилактики рубцовых стенозов трахеи / И. С. Курганский, В. Н. Махутов, С. А. Лепехова // Вестник оториноларингологии. – 2016. – № 1 (81). – С. 66–71.

14. Лекарственная пленка пролонгированного действия и способ ее получения : Пат. 2678200 С1 Рос. Федерация ; МПК А61К 9/00, А61К 38/18, А61К 38/36, А61К 38/38, А61К 38/39, А61К 38/39, А61Р 17/02, А61К 47/06, А61К 47/30 / Курганский И. С., Фаткулин Р. Р., Лепехова С. А., Махутов В. Н., Зарицкая Л. В., Костыро Я. А., Гольдберг О. А., Иноземцев Е. О., Григорьев Е. Г. ; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии

и травматологии», ФГБУН СО РАН. – № 2018127796 ; заявл. 27.07.2018 ; опубл. 24.01.2019. – Бюл. № 3.

15. Лепехова, С. А. Программа стандартных операционных процедур: лабораторные животные (прием, содержание, уход и контроль здоровья животных в вивариях медицинского учреждения) : учебное пособие / С. А. Лепехова. – Иркутск : НЦРВХ СО РАМН, 2012. – 96 с.

16. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках ; 5-я ред. / Пер. Н. В. Зеленецкого. – СПб. : Лань, 2013. – 400 с.

17. Морфологическая и биохимическая оценка ксенотрансплантации клеток селезенки в раннем посттрансплантационном периоде / М. В. Прокопьев, С. А. Лепехова, О. А. Гольдберг [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2002. – № 2 (22). – С. 152–154.

18. Морфологические изменения в трахее при постинтубационном рубцовом стенозе / М. К. Недзьведь, А. А. Татур, С. И. Леонович, А. М. Неровня // Медицинский журнал Белорусского медицинского института. – 2008. – № 1. – С. 1–8.

19. Морфологические изменения при постинтубационном стенозе трахеи / Ю. С. Есаков, Е. А. Дубова, К. Г. Жестков, А. И. Шеголев // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2010. – № 2. – С. 60–63.

20. Мыщик, А. В. Вспользование программы IMAGEJ для автоматической морфометрии в гистологических исследованиях / А. В. Мыщик // Омский научный вестник. – 2011. – № 2 (100). – 187 с.

21. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы (лабораторные животные) / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков. – СПб. : Лань, 2001. – 464 с.

22. Оптимизация ведения больных после трахеостомии и реконструктивных операций на гортани и трахее / Н. В. Лафуткина, Е. А. Кирасирова, Р. Ф. Мамедов [и др.] // Вестник оториноларингологии. – 2021. – № 4 (86). – С. 36–40.

23. Опыт лечения больных с рубцовыми стенозами трахеи / В. К. Корженевский, Т. А. Мкртычева, Р. О. Рахметов [и др.] // Здоровоохранение Югры: опыт и инновации. – 2020. – № 1. – С. 15–21.
24. Осипов, А. С. Постинтубационные трофические повреждения гортани и трахеи. Эндоскопическая диагностика, профилактика и лечение / А. С. Осипов, А. М. Гасанов, Т. П. Пинчук // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2011. – № 4. – С. 68–72.
25. Основные активаторы ангиогенеза и их применение в кардиологии (обзор литературы) / М. Г. Шурыгин, Н. Н. Дремина, И. А. Шурыгина, И. Н. Мачхин // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 6 (44). – С. 199–207.
26. Основы прикладной статистики (использование Excel и Statistica в медицинских исследованиях) : учебное пособие / И. Ф. Спрейс, М. А. Алферова, И. М. Михалевич, Н. Ю. Рожкова. – Иркутск : РИО ГИУВа, 2006. – 71 с.
27. Особенности топографической анатомии трахеи крысы и возможность выполнения оперативных вмешательств / И. С. Курганский, Е. О. Иноземцев, С. А. Лепехова [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2018. – № 3. – С. 218–223.
28. Оценка микробной контаминации трахеобронхиального дерева у пациентов с рубцовыми стенозами трахеи / И. С. Курганский, В. Н. Махутов, С. А. Лепехова [и др.] // Acta biomedica scientifica. – 2017. – № 3. – С. 18–22.
29. Оценка показателей неспецифической резистентности организма в условиях сужения просвета трахеи в эксперименте / И. С. Курганский, С. А. Лепехова, Л. В. Зарицкая [и др.] // Acta biomedica scientifica. – 2018. – № 4. – С. 114–119.
30. Оценка эффективности воздействия VEGF на регенерацию передней поверхности трахеи в раннем послеоперационном периоде / И. С. Курганский, С. А. Лепехова, О. А. Гольдберг [и др.] // Acta biomedica scientifica. – 2020. – № 6. – С. 276–281.

31. Паршин, В. Д. Аллотрансплантация трахеи (анатомическое исследование) / В. Д. Паршин, С. С. Дыдыкин, Е. А. Тарабрин // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2008. – № 2. – С. 56–60.
32. Паршин, В. Д. Контаминация операционной раны в зависимости от варианта ИВЛ при резекции трахеи / В. Д. Паршин, А. В. Старостин, В. В. Паршин // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2020. – № 6. – С. 18–23.
33. Паршин, В. Д. О классификации рубцового стеноза трахеи / В. Д. Паршин // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2020. – № 10. – С. 5–10.
34. Паршин, В. Д. Хирургия рубцовых стенозов трахеи / В. Д. Паршин. – М. : Медицина, 2003. – 152 с.
35. Паршин, В. Д. Хирургия трахеи с атласом оперативной хирургии / В. Д. Паршин, В. А. Порханов. – М. : Альди-Принт, 2010. – 477 с.
36. Перельман, М. И. Хирургия трахеи / М. И. Перельман. – М. : Медицина, 1972. – 65 с.
37. Прогностическая значимость некоторых факторов риска постинтубационных стенозов трахеи при длительной искусственной вентиляции легких (ИВЛ) / Е. В. Серебренникова, А. Г. Короткевич, Е. В. Григорьев [и др.] // Медицина в Кузбассе. – 2012. – № 4 (11). – С. 42–46.
38. Раннее эндоскопическое лечение в профилактике постинтубационных осложнений / А. С. Леонтьев, А. Г. Короткевич, Е. В. Серебренникова, А. П. Викторович // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н. В. Склифосовского. – 2012. – № 3. – С. 12–15.
39. Решетов, И. В. Применение воздушно-плазменного аппарата Плазон в режимах коагуляции и NO-терапии при реконструктивно-пластических операциях у онкологических больных / И. В. Решетов, А. Б. Шехтер, Р. К. Кабисов // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2000. – № 4. – С. 24–39.
40. Самохин, А. Я. Хирургическое лечение рубцовых стенозов трахеи : дис. ... докт. мед. наук : 14.00.27 / Самохин Александр Яковлевич. – М., 1992. – 285 с.

41. Сангинов, А. Б. Этиология и патогенез рубцовых стенозов трахеи / А. Б. Сангинов, И. В. Мосин, Н. В. Мосина // Вестник Авиценны. – 2010. – № 1. – С. 33–39.

42. Скворцов, М. Б. Трахеостомия – важнейший этап в лечении рубцовых трахеальных и гортанотрахеальных стенозов / М. Б. Скворцов, Е. В. Нечаев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 6. – С. 123–126.

43. Способ моделирования гипертензии малого круга кровообращения : Пат. 2627463 С1 Рос. Федерация ; МПК G09B 23/28 / Курганский И. С., Лепехова С. А., Гольдберг О. А., Махутов В. Н. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научный центр хирургии и травматологии». – № 2016129674 ; заявл. 19.07.2016 ; опубл. 08.08.2017. – Бюл. № 22.

44. Способ моделирования рубцового стеноза трахеи : Пат. 2442225 С1 Рос. Федерация ; МПК G09B 23/28 / Копин Е. Ж. ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию Росздрава». – № 2010127584/14 ; заявл. 02.07.2010 ; опубл. 10.02.2012. – Бюл. № 4.

45. Способ моделирования фиброзного стеноза трахеи и главного бронха : Пат. 1499393 СССР ; МПК G 09 B 23/28 / Малиев Б. М. ; заявитель и патентообладатель Московский научно-исследовательский институт туберкулеза. – № 4302424/28-14 ; заявл. 04.09.1987 ; опубл. 07.08.1989. – Бюл. № 29.

46. Способ формирования трахео-трахеального анастомоза : Пат. 2668705 С1 Рос. Федерация ; МПК A61B 17/00 ; СПК A61B 17/00 / Иноземцев Е. О., Григорьев Е. Г., Лепехова С. А., Гольдберг О. А., Курганский И. С. ; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2017128060 ; заявл. 04.08.2017 ; опубл. 02.10.2018. – Бюл. № 28.

47. Тактика консервативного ведения пациентов с хроническими стенозами гортани и трахеи / Е. А. Кирасирова, А. В. Гуров, Е. В. Кулабухов [и др.] // Медицинский совет. – 2020. – № 16. – С. 36–42.

48. Топольницкий, Е. Б. Применение криохирургических и лимфотропных технологий в комплексном лечении постинтубационных стенозов трахеи / Е. Б. Топольницкий, Д. Г. Дамбаев // Вестник оториноларингологии. – 2012. – № 1. – С. 31–33.

49. Трансплантация реваскуляризированного тиреоидотрахеодвудлегочного комплекса (экспериментальное исследование) / В. Д. Паршин, И. Л. Жидков, Д. В. Базаров [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2012. – № 8. – С. 9–12.

50. Трансплантация реваскуляризируемой трахеи: хирургические, патофизиологические и иммунологические проблемы / В. Д. Паршин, Н. О. Миланов, Е. И. Трофимов [и др.] // Итоги 2010. Результаты научных исследований по программной тематике. Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского РАМН. – 2010. – № 16. – С. 148–170.

51. Тришкин, Д. В. Постинтубационная болезнь трахеи: клинимоρφологические варианты / Д. В. Тришкин, Н. В. Новиков, Н. В. Ложкина // Российская оториноларингология. – 2008. – № 6. – С. 137–142.

52. Трутнев, В. К. Материалы к вопросу о лечении хронических стенозов гортани и трахеи / В. К. Трутнев, А. И. Юнина // Тезисы докладов Всероссийской конференции по вопросу тугоухости. – Ленинград : Изд-во Ленингр. науч.-исслед. ин-та уха, горла, носа и речи, 1960. – С. 88.

53. Циркулярная резекция при рубцовом стенозе трахеи: анализ непосредственных и отдаленных результатов / Ю. С. Есаков, А. А. Печетов, Т. Н. Хлань [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2019. – № 2. – С. 19–25.

54. Чернеховская, Н. Е. Лечебная бронхоскопия в комплексной терапии заболеваний органов дыхания : учебное пособие / Н. Е. Чернеховская, В. Г. Андреев, А. В. Поваляев. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – С. 38–45.

55. Шалимов, С. А. Руководство по экспериментальной хирургии / С. А. Шалимов, А. П. Радзиховский, Л. В. Кейсевич. – М. : Медицина, 1989. – 272 с.
56. Шуркалин, Б. К. Руководство по экспериментальной хирургии / Б. К. Шуркалин, В. А. Горский, А. П. Фаллер. – М. : Издат. холдинг «Атмосфера», 2010. – 174 с.
57. Эндопротезирование при лечении больных с рубцовым стенозом трахеи и другими трахеобронхиальными нарушениями / Е. Ж. Копин, В. М. Гершевич, С. В. Черненко, А. С. Вяльцин // Омский научный вестник. – 2011. – № 1. – С. 140–143.
58. Эндоскопическое лечение рубцовых стенозов трахеи / Е. А. Дробязгин, Ю. В. Чикинев, М. С. Аникина, И. Е. Судовых // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2019. – № 5. – С. 10–15.
59. Этиология, профилактика, лечение протяженных и мультифокальных рубцовых стенозов трахеи на стыке наук хирургии и анестезиологии / С. С. Черный, В. Д. Паршин, М. А. Выжигина [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2011. – № 2. – С. 18–23.
60. Этиопатогенетические факторы заживления раны при хронических постинтубационных рубцовых стенозах гортани и трахеи / В. В. Вавин, Д. А. Кузнецова, И. И. Нажмудинов, Х. Ш. Давудов // Вестник оториноларингологии. – 2020. – № 2. – С. 78–83.
61. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain / S. Ogawa, A. Oku, A. Sawano [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – № 273 (47). – P. 31273–31282.
62. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases / V. Joukov, K. Pajusola, A. Kaipainen [et al.] // EMBO J. – 1996. – № 15 (7). – P. 1751.

63. Achen, M. G. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature / M. G. Achen, S. A. Stacker // *Int. J. Exp. Pathol.* – 1998. – № 79 (5). – P. 255–265.
64. An experimental study on SIS in reconstruction of tracheal defect in rabbits / G. Huang, Z. Xiang, Z. Yang [et al.] // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2009. – № 23 (3). – P. 328–331.
65. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways / J. Fang, C. Xia, Z. Cao [et al.] // *FASEB J.* – 2005. – № 19 (3). – P. 342–353.
66. Baiguera, S. Tissue-engineered tracheal transplantation / S. Baiguera, M. A. Birchall, P. Macchiarini // *Transplantation.* – 2010. – № 89 (5). – P. 485–491.
67. Bussolino, F. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties / F. Bussolino, G. Camussi // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – № 229 (2). – P. 327–337.
68. Chen, H. Successful treatment of bronchial obstruction by flexible bronchoscopy and isoniazid: A case report / H. Chen, X. Hong, Y. He // *Exp. Ther. Med.* – 2014. – № 7 (2). – P. 397–400.
69. Clinical application and animal experiment of thoracic tracheal reconstruction by using pulmonary tissue flap / W. J. Shi, S. N. Zhang, W. Yang [et al.] // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* – 2003. – № 41 (3). – P. 218–221.
70. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia / B. Enholm, K. Paavonen, A. Ristimäki [et al.] // *Oncogene.* – 1997. – № 14 (20). – P. 2475–2483.
71. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis / G. Niu, K. L. Wright, M. Huang [et al.] // *Oncogene.* – 2002. – № 21 (13). – P. 2000–2008.
72. Current biology of VEGF-B and VEGF-C / B. Olofsson, M. Jeltsch, U. Eriksson, K. Alitalo // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1999. – № 10 (6). – P. 528–535.

73. Developmental regulation of NO-mediated VEGF-induced effects in the lung / V. Bhandari, R. Choo-Wing, C. G. Lee [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2008. – № 39 (4). – P. 420–430.

74. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms / K. A. Houck, D. W. Leung, A. M. Rowland [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – № 267 (36). – P. 26031–26037.

75. Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy / H. F. Dvorak // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – № 20 (21). – P. 4368–4380.

76. Effect of heparin on inflammation: an animal model of tracheal stents / Y. O. Bicer, S. Koybasi, A. E. Suslu [et al.] // *Laryngoscope.* – 2014. – № 124 (9). – P. 368–372.

77. Effect of VEGF gene therapy and hyaluronic acid film sheath on peripheral nerve regeneration / F. Zor, M. Deveci, A. Kilic [et al.] // *Microsurgery.* – 2014. – № 34 (3). – P. 209–216.

78. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and its receptor, VEGF receptor 3, as a prognostic factor in endometrial carcinoma / Y. Yokoyama, D. S. Charnock-Jones, D. Licence [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – № 9 (4). – P. 1361–1369.

79. Fibrocollagen-covered prosthesis for a noncircumferential segmental tracheal replacement / F. Villegas-Alvarez, J. F. González-Zamora, A. González-Maciel [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2010. – № 139 (1). – P. 32–37.

80. Gene therapy of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor by Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis [Электронный ресурс] / D. Mizokami, K. Araki, N. Tanaka [et al.] // *PLOS One.* – 2015. – № 10 (1). – Режим доступа: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116279> (дата обращения: 06.08.2020).

81. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform

/ B. Olofsson, K. Pajusola, G. von Euler // J. Biol. Chem. – 1996. – № 271 (32). – P. 19310–19317.

82. Gerhardt, H. How do endothelial cells orientate / H. Gerhardt, C. Betsholtz // EXS. – 2005. – № 94. – P. 3–15.

83. Govindaraj, S. Effect of fibrin matrix and vascular endothelial growth factor on reepithelialization of orthotopic murine tracheal transplants / S. Govindaraj, R. Gordon, E. M. Genden // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2004. – № 113 (10). – P. 797–804.

84. Haykal, S. Advances in tracheal tissue-engineering / S. Haykal. – Toronto : Institute of Medical Science University of Toronto, 2013. – P. 36–59.

85. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in an experimental rabbit model / A. Dodge-Khatami, C. L. Backer, L. D. Holinger [et al.] // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2001. – № 122 (3). – P. 554–561.

86. Holmes, D. I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease / D. I. Holmes, I. Zachary // Genome Biol. – 2005. – № 6 (2). – P. 209.

87. Hyder, S. M. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones / S. M. Hyder, G. M. Stancel // Histol, Histopathol. – 2000. – № 15 (1). – P. 325–334.

88. *In vivo* tissue-engineered allogenic trachea transplantation in rabbits: A preliminary report / A. Batioglu-Karaaltin, M. V. Karaaltin, E. Ovali [et al.] // Stem Cell Rev. Rep. – 2015. – № 11 (2). – P. 347–356.

89. Influence of the sFlt-1/PlGF ratio on clinical decision-making in women with suspected preeclampsia – The PreOS study protocol / M. Hund, W. Verhagen-Kamerbeek, M. Reim [et al.] // Hypertens. Pregnancy. – 2015. – № 34 (1). – P. 102–115.

90. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain

of VEGF165 / S. Soker, S. Gollamudi-Payne, H. Fidler [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – № 272 (50). – P. 31582–31588.

91. Is it a viable segment of the trachea without pedicle? (The experimental model in rabbits) / J. A. Munoz, J. Barbeito, F. Dl. Ríos [et al.] // Rev. HUcba. – 2007. – № 1 (3). – P. 7–13.

92. Ishikawa, K. Cell-based therapy for acquired subglottic stenosis: A review of research and future directions / K. Ishikawa, R. G. Elluru // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2014. – № 1. – P. 1003.

93. Kofler, N. M. Angiogenesis versus arteriogenesis: neuropilin 1 modulation of VEGF signaling / N. M. Kofler, M. Simons // F1000Prime Repost. – 2015. – № 7. – P. 26.

94. Lee, J. Y. Comparison of tracheal reconstruction with allograft, fresh xenograft and artificial trachea scaffold in a rabbit model / J. Y. Lee, J. H. Park, D. W. Cho // J. Artific. Organs. – 2018. – № 21 (3). – P. 325–331.

95. Li, J. Successful tracheal autotransplantation with two-stage approach using the greater omentum / J. Li, P. Xu, H. Chen // Ann. Thorac. Surg. – 1997. – № 64 (1). – P. 199–202.

96. Li, X. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D / X. Li, U. Eriksson // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2001. – № 33 (4). – P. 421–426.

97. Local VEGF administration enhances healing of colonic anastomoses in a rabbit model / M. Ishii, E. Tanaka, T. Imaizumi [et al.] // Eur. Surg. Res. – 2009. – № 42 (4). – P. 249–257.

98. Martin, D. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex / D. Martin, R. Galisteo, J. S. Gutkind // J. Biol. Chem. – 2009. – № 284 (10). – P. 6038–6042.

99. McCaffrey, T. V. Classification of laryngotracheal stenosis / T. V. McCaffrey // Laryngoscope. – 1992. – № 102. – P. 1335–1340.

100. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor FLT-1 / B. Barleon, S. Sozzani, D. Zhou [et al.] // *Blood*. – 1996. – № 87 (8). – P. 3336–3343.
101. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D / Y. Yamada, J. Nezu, M. Shimane, Y. Hirata // *Genomics*. – 1997. – № 42 (3). – P. 483–488.
102. Myer, C. M. Proposed grading system for subglottic stenosis based on endotracheal tube sizes / C. M. Myer, D. M. O'Connor, R. T. Cotton // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1994. – № 103. – P. 319–323.
103. Nakayama, M. Experimental reconstruction of the trachea with free jejunal graft / M. Nakayama // *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. – 1990. – № 38 (9). – P. 1429–1435.
104. Optimal bovine collagen concentration to achieve tracheal epithelial coverage of collagen sponges / R. Suzuki, R. Nakamura, Y. Nakaegawa [et al.] // *Laryngoscope*. – 2016. – № 126 (12). – P. 396–403.
105. Ortega, N. Signal relays in the VEGF system / N. Ortega, H. Hutchings, J. Plouët // *Front. Biosci.* – 1999. – № 4. – P. 141–152.
106. Post-intubation tracheal stenosis – morphological-clinical investigations / B. Papla, G. Dyduch, W. Frasik, H. Olechnowicz // *Polish J. Pathol.* – 2003. – № 54 (4). – P. 261–266.
107. Potential role of growth factors and extracellular matrix in wound healing after laryngotracheal reconstruction / D. L. Walner, S. C. Heffelfinger, Y. Stern [et al.] // *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2000. – № 122 (3). – P. 363–366.
108. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C / A. Ristimäki, K. Narko, B. Enholm [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 273 (14). – P. 8413–8418.
109. Purification and refolding of vascular endothelial growth factor-B / S. D. Scrofani, L. J. Fabri, P. Xu [et al.] // *Protein Sci.* – 2000. – № 9 (10). – P. 2018–2025.

110. Regenerative process of tracheal epithelium using a collagen vitrigel sponge scaffold / A. Tani, Y. Tada, T. Takezawa [et al.] // *Laryngoscope*. – 2013. – № 123 (6). – P. 1469–1473.
111. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells / L. Bermont, F. Lamielle, S. Fauconnet [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2000. – № 85 (1). – P. 117–123.
112. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1 / P. N. Bernatchez, S. Rollin, S. Soker, M. G. Sirois // *J. Cell. Biochem*. – 2002. – № 85 (3). – P. 629–639.
113. Role of vascular endothelial growth factor A in children with acquired airway stenosis / R. Rahbar, L. F. Brown, J. Folkman [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2007. – № 116 (6). – P. 430–435.
114. Schroeder, J. W. Jr. Effect of vascular endothelial growth factor on laryngeal wound healing in rabbits / J. W. Schroeder Jr., J. C. Rastatter, D. L. Walner // *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2007. – № 137 (3). – P. 465–470.
115. Shin, J. W. Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis / J. W. Shin, R. Huggenberger, M. Detmar // *Blood*. – 2008. – № 112 (6). – P. 2318–2326.
116. SIS with tissue-cultured allogenic cartilages patch tracheoplasty in a rabbit model for tracheal defect / L. Zhang, Z. Liu, P. Cui [et al.] // *Acta Laryngologica*. – 2007. – № 127 (6). – P. 631–636.
117. Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species / Y. Yamazaki, Y. Matsunaga, Y. Tokunaga [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – № 284 (15). – P. 9885–9891.
118. Stalmans, I. Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome / I. Stalmans // *Verhandelingen – Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*. – 2005. – № 67 (4). – P. 229–276.

119. Surface-modified silicone T-tubes for prevention of tracheal stenosis in a rabbit model / J. S. Choi, J. Y. Lim, I. S. Park [et al.] // *Laryngoscope*. – 2015. – № 125 (6). – P. 1465–1471.
120. Tacrolimus prevents laryngotracheal stenosis in an acute-injury rat model / D. Mizokami, K. Araki, N. Tanaka [et al.] // *Laryngoscope*. – 2015. – № 125 (6). – P. 210–215.
121. The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis: An experimental study / N. Becit, M. Ceviz, H. Koçak [et al.] // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2001. – № 4. – P. 310–316.
122. The effect of vitamin E-coated tracheotomy cannula on tracheal reactive oxygen species / M. Sari, Z. M. Yazici, N. Ozdemir [et al.] // *Trakya Universitesi Tip Fakultesi Dergisi*. – 2010. – № 27 (2). – P. 178–182.
123. The effects of erdosteine on tracheal healing in rats / S. Karapolat, S. Gezer, U. Yildirim [et al.] // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2011. – № 20 (1). – P. 31–37.
124. The effects of hyperbaric oxygen treatment on the healing of tracheal anastomosis following irradiation in rats / B. Celik, A. D. Meydan, M. Kefeli [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2010. – № 58 (8). – P. 481–485.
125. The relationship of VEGF and PGE2 expression to extracellular matrix remodelling of the tenosynovium in the carpal tunnel syndrome / H. Hirata, T. Nagakura, M. Tsujii [et al.] // *J. Pathol.* – 2004. – № 204 (5). – P. 605–612.
126. The roles of transforming growth factor- β_1 and vascular endothelial growth factor in the tracheal granulation formation / Y. C. Lee, M. H. Hung, L. Y. Liu [et al.] // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2011. – № 24 (1). – P. 23–31.
127. Tissue engineering for regeneration of the tracheal epithelium / Y. Nomoto, T. Suzuki, Y. Tada [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2006. – № 115 (7). – P. 501–506.
128. Tissue-engineered allograft tracheal cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation / D. Y. Kim, J. Pyun, J. W. Choi [et al.] // *Laryngoscope*. – 2010. – № 120 (1). – P. 30–38.

129. Topical heparin: A promising agent for the prevention of tracheal stenosis in airway surgery / S. Sen, I. Meteoglu, M. Ogurlu [et al.] // J. Surg. Res. – 2009. – № 157 (1). – P. 23–29.

130. Topical vascular endothelial growth factor in rabbit tracheal surgery: Comparative effect on healing using various reconstruction materials and intraluminal stents / A. Dodge-Khatami, H. W. Niessen, A. Baidoshvili [et al.] // Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. – 2003. – № 23 (1). – P. 6–14.

131. Tracheal defect repair using a PLGA-collagen hybrid scaffold reinforced by a copolymer stent with bFGF-impregnated gelatin hydrogel / Y. Tatekawa, N. Kawazoe, G. Chen [et al.] // Pediatr. Surg. Int. – 2010. – № 26 (6). – P. 575–580.

132. Tracheal reconstruction: mucosal survival on porous titanium / L. M. Janssen, G. J. van Osch, J. P. Li [et al.] // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2009. – № 135 (5). – P. 472–478.

133. Tracheal reconstruction using tissue-engineered cartilage / J. F. Grimmer, C. B. Gunnlaugsson, E. Alsberg [et al.] // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2004. – № 130. – P. 1191–1196.

134. Tracheal regeneration after partial resection: A tissue engineering approach / M. Yamashita, S. Kanemaru, S. Hirano [et al.] // Laryngoscope. – 2007. – № 117 (3). – P. 497–502.

135. Tracheal replacement with cryopreserved tracheal allograft: Experiment in dogs / T. Tojo, K. Niwaya, N. Sawabata [et al.] // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 1998. – № 66 (1). – P. 209–213.

136. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells / E. Giraudo, L. Primo, E. Audero [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – № 273 (34). – P. 22128–22135.

137. Udupa, S. L. Inhibition of lysyl oxidase by isoniazid and its effect on wound healing / S. L. Udupa // Indian J. Exp. Biol. – 1995. – № 33 (4). – P. 278–280.

138. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors / G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak // *FASEB J.* – 1999. – № 13 (1). – P. 9–22.
139. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells / B. Olofsson, E. Korpelainen, M. S. Pepper [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – № 95 (20). – P. 11709–11714.
140. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells / B. Olofsson, K. Pajusola, A. Kaipainen [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. – № 93 (6). – P. 2576–2581.
141. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition / K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas, M. J. Cross // *Cell. Signal.* – 2007. – № 19 (10). – P. 2003–2012.
142. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries / T. Couffinhal, M. Kearney, B. Witzenbichler [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1997. – № 150 (5). – P. 1673–1685.
143. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues / K. Akagi, Y. Ikeda, M. Miyazaki [et al.] // *Br. J. Cancer.* 2000. – № 83 (7). – P. 887–891.
144. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia / B. Witzenbichler, T. Asahara, T. Murohara [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1998. – № 153 (2). – P. 381–394.
145. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells / J. K. Ruohola, E. M. Valve, M. J. Karkkainen [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 1999. – № 149 (1–2). – P. 29–40.
146. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C 8 / V. Joukov, A. Kaipainen, M. Jeltsch [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 1997. – № 173 (2). – P. 211–215.
147. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice / H. P. Gerber, K. J. Hillan, A. M. Ryan [et al.] // *Development.* – 1999. – № 126 (6). – P. 1149–1159.

148. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms / A. Latil, I. Bièche, S. Pesche [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2000. – № 89 (2). – P. 167–171.

149. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor / B. Terman, L. Khandke, M. Dougher-Vermazan [et al.] // *Growth Factors*. – 1994. – № 11 (3). – P. 187–195.

150. VEGF, VEGF-B, VEGF-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa / T. André, L. Kotelevets, J. C. Vaillant [et al.] // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2000. – № 86 (2). – P. 174–181.

151. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues / T. A. Partanen, J. Arola, A. Saaristo [et al.] // *FASEB J.* – 2000. – № 14 (13). – P. 2087–2096.

152. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors / M. M. Mattila, J. K. Ruohola, T. Karpanen [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2002. – № 98 (6). – P. 946–951.