

DOI: 10.15825/1995-1191-2026-2-227-237

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АЛЛОГЕННЫХ И КСЕНОГЕННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ЦИРКУЛЯРНОГО ДЕФЕКТА КИШКИ

И.М. Насибуллин¹, Р.Р. Хасанов^{1, 2}, А.И. Лебедева¹, О.Р. Шангина¹, В.Н. Павлов¹, Д.Е. Халилов¹

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Российская Федерация

² Клиника детской хирургии медицинского факультета Мангейм Университета Гайдельберг, Гайдельберг, Федеративная Республика Германия

Целью работы явилось исследование регенераторных свойств аллогенных и ксеногенных биоматериалов для восстановления циркулярных дефектов кишки. **Материалы и методы.** В эксперименте использовали крыс-самцов линии Wistar половозрелых, возраст 1 год, вес 300 г (n = 98). В опытной группе животным (n = 49) трансплантировали аллогенный децеллюляризованный биоматериал, изготовленный из кишки крысы. В контрольной группе (n = 49) пересаживали ксеногенный биоматериал, изготовленный из кадаверной фиброзной капсулы почки человека. У крыс обеих групп была резецирована часть подвздошной кишки размером 30 мм, после чего в область дефекта помещали биоматериалы в виде трубки аналогичных размеров конец в конец. В последующем исследуемые биоматериалы подвергались децеллюляризации и морфологическим исследованиям. **Результаты.** В опытной группе через 2–3 месяца после трансплантации аллогенного децеллюляризованного биоматериала восстанавливалась архитектура всех слоев стенки тонкой кишки, аллогенный биоматериал полностью резорбировался и замещался органоспецифическим регенератом. Верифицировано наличие кровеносных сосудов, нервных волокон и пейеровых бляшек. В контрольной группе после трансплантации ксеногенного биоматериала определялась смертность животных в 100% случаях в ранние сроки (7–14 сут) в связи с отторжением трансплантата и развитием выраженной иммунной воспалительной реакции в брюшной полости. **Заключение.** Использование предложенного метода в эксперименте достоверно способствует регенерации протяженного участка тонкой кишки от 30 мм, демонстрирует возможность восстановления кишечника со всеми структурными элементами, присущими кишечной стенке, и может быть применимо для лечения заболеваний, ассоциированных с СКК, воспалительно-деструктивными заболеваниями или для восполнения циркулярного дефекта после резекции кишки.

Ключевые слова: синдром короткой кишки, тонкий кишечник, аллогенные биоматериалы, ксеногенные трансплантаты, регенерация.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF ALLOGENEIC AND XENOGENEIC BIOMATERIALS FOR REGENERATION OF CIRCULAR INTESTINAL DEFECTS

I.M. Nasibullin¹, R.R. Khasanov^{1, 2}, A.I. Lebedeva¹, O.R. Shangina¹, V.N. Pavlov¹, D.E. Khalilov¹

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

² Heidelberg University, Heidelberg, Germany

Objective: to investigate the regenerative potential of allogeneic and xenogeneic biomaterials in the repair of circular bowel defects. **Materials and methods.** The study was conducted on sexually mature male Wistar rats (1 year old, weighing ~300 g; n = 98). In the experimental group (n = 49), allogeneic decellularized biomaterial

Для корреспонденции: Насибуллин Ильдар Марсович. Адрес: 450008, Уфа, ул. Ленина, 3. Тел. (905) 000-83-76. E-mail: nim_76@mail.ru

Corresponding author: Ildar Nasibullin. 3, Lenina str., Ufa, 450008, Russian Federation. Phone: (905) 000-83-76. E-mail: nim_76@mail.ru

(ADB) derived from rat bowel was implanted. In the control group (n = 49), xenogeneic biomaterial derived from the fibrous capsule of a human cadaveric kidney was used. In both groups, a 30-mm segment of the ileum was resected, and the biomaterials were implanted at the defect site as end-to-end tubular grafts of similar dimensions. The implanted biomaterials were subsequently subjected to decellularization and morphological analysis. **Results.** In the experimental group, 2–3 months after transplantation of ADB, the full architectural structure of the small bowel wall was restored. The implanted biomaterial was completely resorbed and replaced by an organ-specific regenerate, with confirmed presence of blood vessels, nerve fibers, and Peyer's patches. In the control group, transplantation of xenogeneic biomaterial resulted in 100% mortality within the early postoperative period (7–14 days), associated with graft rejection and a pronounced immune-inflammatory response in the abdominal cavity. **Conclusion.** The proposed approach promotes regeneration of continuous small bowel segments measuring 30 mm or more and enables restoration of all structural components of the bowel wall. This method shows potential for the treatment of conditions such as short bowel syndrome, inflammatory-destructive bowel diseases, and for the closure of circular defects following bowel resection.

Keywords: short bowel syndrome, small intestine, allogeneic biomaterials, xenogeneic grafts, regeneration.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром короткой кишки (СКК) – это тяжелое заболевание, характеризующееся недостаточным функционированием кишечного эпителия, вызванного врожденным отсутствием кишечника или из-за приобретенной патологии вследствие хирургической резекции 50–75% абсолютной длины кишечника по поводу болезни Крона, инфаркта брыжеечной артерии, венозного тромбоза, неполного заворота кишок, аганглиоза кишечника, травмы или опухоли [1]. Пациентам с СКК часто требуются сочетание поддерживающего парентерального питания (ПП), консервативного и хирургического лечения, заключающегося в различных видах реконструктивных вмешательств на кишечнике [1]. Исследования показывают, что ПП увеличивает продолжительность жизни пациентов с СКК и в некоторых случаях является единственным эффективным методом лечения [2]. В случаях приобретенного синдрома короткой кишки раннее применение ПП достоверно улучшает прогноз, а в случае тотального ПП однозначно улучшает отдаленные исходы [3]. Однако долгосрочная зависимость от полного ПП существенно снижает качество жизни пациентов и может сопровождаться жизнеугрожающими осложнениями (катетер-ассоциированный сепсис, диссеминированный тромбоз, печеночная недостаточность), а также приводит к изменению микробиома кишечника и викарной атрофии энтероцитов, что может вторично усугубить кишечную недостаточность [4–6]. В тяжелых случаях, когда зависимость от ПП приводит к необратимой кишечной недостаточности, для достижения энтеральной автономии может быть рассмотрена трансплантация донорского тонкого кишечника (в том числе органо-комплекса), однако ряд исследований показал высокую летальность и неоднозначные результаты такого метода наряду с известными сложностями подбора донора и необходимостью иммуносупрессорной терапии [7, 8]. Операция трансплантации по поводу воспалительных заболеваний кишечника имеет вы-

сокий риск послеоперационных осложнений и смертности [9]. Кроме того, наличие в анамнезе кахексии, полиорганной недостаточности, нередко сопутствующих СКК, может усугубить прогноз пациентам после трансплантации, что подчеркивает необходимость иного подхода [10]. Альтернативные хирургические вмешательства, такие как серийная поперечная энтероластика и продольное удлинение и адаптация кишечника, показали многообещающие результаты у пациентов до 1 года, обеспечивая достаточную энтеральную абсорбцию и необходимую длину тонкого кишечника, но операции имеют ряд соответствующих ограничений. Не всегда можно достичь полноценной кишечной автономии, оперативные вмешательства связаны с большим риском послеоперационных осложнений [11]. При этом традиционная терапия, в т. ч. парентеральное питание, может быть недостаточной для обеспечения полноценного метаболического статуса у пациентов с СКК [8]. Однако ПП все еще занимает важную роль в коррекции метаболических сдвигов и может быть пожизненно необходимым у пациентов с тяжелой декомпенсированной кишечной недостаточностью. Поэтому существует необходимость разработки новых подходов к лечению, включая методы регенеративной медицины – тканевой инженерии. К скаффолдам предъявляется ряд требований, направленных на восстановление анатомических и функциональных характеристик кишечника путем создания трехмерных структур [12]. Они должны обладать потенциалом к индукции регенерации, контролируемой биодеградация, обеспечивать адаптивное микроокружение для селективного роста тканей на месте имплантации [13, 14]. С этой целью применяют различные виды биологических каркасов *in vivo*: полигликолевую кислоту, матригель, ксеногенный коллагеновый матрикс [15–17], хитозан/коллагеновую каркасную трехмерную матрицу [18]. Однако полученный трансплантат не отвечал долгосрочным функциональным и механическим требованиям, после имплантации наблюдалась регенерация

кишечника с тонким мышечным слоем, которая исчезала к 16-й неделе [19]. Среди биосовместимых материалов выделяют биоматериалы, созданные на основе аллогенного экстрацеллюлярного матрикса. Последний может представлять собой как бесклеточный дермальный матрикс, фиброин, подслизистую основу тонкой кишки, коллагеновую губку, так и децеллюляризованную кадаверную тонкую кишку [20–22]. Единичные исследования показывают, что аллогенные децеллюляризованные биоматериалы на основе коллагенового матрикса могут эффективно замещаться собственными тканями, способствуя регенерации тканей без формирования рубца или капсулы, а также ингибируя воспалительные фиброзные изменения в тканях [23–26]. Несмотря на широкое применение аллотрансплантатов в различных областях хирургии, данный биоматериал для восстановления дефекта кишки ранее не применялся. Целью настоящего исследования явилось обоснование возможности применения аллогенного биоматериала для восстановления циркулярного дефекта подвздошной кишки крысы размером 30 мм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

В эксперименте были использованы половозрелые крысы-самцы линии Wistar ($n = 120$), возраст 1 год, масса 300 г. Все проводимые эксперименты получили одобрение комитета по биологической безопасности и биоэтике ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России, протокол № 45 (Уфа, Россия). Настоящее исследование проводилось с соблюдением положений Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными и директивы 2010/63/EU. Животных содержали в лабораторных клетках с соблюдением температурного, водно-пищевого и циркадного режимов. Животные были разделены на 2 группы. 1-й группе ($n = 60$) была проведена операция по имплантации аллогенного децеллюляризованного биоматериала, смоделированного в виде адаптированной трубки длиной 30 мм и диаметром 5 мм. 2-й группе ($n = 60$) трансплантировали аналогичный по размерам, геометрической конфигурации и прочностным характеристикам ксенотрансплантат, полученный из кадаверной ткани фиброзной капсулы почки человека. За 1–2 суток проводилась предоперационная подготовка. Животные содержались на диете, включающей 5% глюкозу. За 30 минут перед операцией проводилась инъекция цефтриаксона 1,0–0,2 мл и атропина сульфата 0,1% – 0,05 мл подкожно. Далее животных наркотизировали раствором диэтилового эфира с помощью маски Шиммельбуша. После обработки кожи йодонатом натрия с 96% этанолом послойным рассечением тканей выполняли срединный лапаротомический доступ длиной 30 мм

и визуализировали содержимое брюшной полости. После верификации анатомического перехода тонкого в толстый кишечник в рану выводили петлю – дистальный отдел подвздошной кишки вместе с брыжейкой с соответствующими аркадами. Дальнейшие манипуляции были проведены с помощью микрохирургической техники под постоянным визуальным контролем хирургического операционного микроскопа Carl Zeiss Opmi MD Opton S-3 (Германия). Далее удаляли часть кишки в виде циркулярного дефекта длиной 30 мм, между проксимальным и дистальным отделами кишки имплантировали биоматериалы конец в конец в виде циркулярно уложенного лоскута через все слои стенки кишки с использованием нитей Vicryl 10-0 непрерывным обвивным швом. Затем место операции укрывали петлей большого сальника, которую фиксировали серозно-мышечными швами для закрытия дефекта брыжейки. Рану передней брюшной стенки ушили послойно Vicryl 5-0. В послеоперационном периоде животных содержали в течение 48 часов на жидкой диете (глюкоза 5%), а затем возвращали на полноценный корм. После операции животных выводили из эксперимента инсуффляцией парами хлороформа на 7, 14, 21, 30, 60, 90, 150, 240-е сутки, при этом иссекали ткани места операции с окружающими тканями для проведения морфологического исследования.

Изготовление биоматериалов

Аллотрансплантаты для хирургии с торговой маркой ALLOPLANT® производятся в лаборатории консервации тканей Всероссийского центра глазной и пластической хирургии ФГБОУ ВО «БГМУ» МЗ РФ (г. Уфа). Аллогенные трансплантаты были изготовлены из фрагментов тонкой кишки крысы, ксеногенные – из фиброзной капсулы почки человека. Как аллогенные, так и ксеногенные образцы биоматериалов были обработаны методом детергентной децеллюляризации, который позволяет элиминировать клеточные компоненты тканей и сохранять их исходную фиброархитектонику и физико-пластические свойства, и изготавливались согласно ТУ 9398-001-04537642-2011 [26] (рис. 1). Образцы исследуемых биоматериалов подвергали механической очистке от остатков прилегающих тканей и посторонних загрязнений, затем промывали в проточной воде. Размеры ткани для пересадки готовились в соответствии с дефектами кишки. Для проведения децеллюляризации образцы подвергали стандартной методике, помещали в стеклянную емкость с 3% раствором перекиси водорода и подвергали перемешиванию на орбитальном шейкере PSU-20i (Латвия) со скоростью 200 об./мин при температуре 25 °С в течение 15 минут для удаления кровяных элементов и тканевой жидкости. Далее тщательно промывали образцы стерильной дистиллированной водой 30 минут, затем

30 минут изотоническим раствором натрия хлорида. На следующем этапе исследуемые образцы для обезжиривания помещали в 95% раствор этилового спирта и диэтилового эфира в соотношении 3 : 1 на 3 часа, после чего тщательно промывали стерильной дистиллированной водой в течение 30 минут. После этого многократно промывали в гипертоническом растворе натрия хлорида 30 минут. После чего ткани помещали в стеклянные флаконы с раствором 70% этилового спирта, герметично укупоривали и стерилизовали ионизирующим излучением потоков быстрых электронов на РТК ЛУ-7-2 (г. Саров, Россия) в дозе 15 кГр (1,5 Мрад).

Гистологические и иммуногистохимические исследования

Аутопсийный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин для гистологической заливки Гистомикс (ООО «ЭргоПродакшн», Россия). Гистологические срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Leica, Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону (ООО «ЭргоПродакшн», Россия). Для иммуногистохимических исследований парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Leica, Германия). В качестве первичного антитела применяли ресам-М1 (H-3) в разведении 1 : 300 (Sc-376764) (Santa Cruz Biotechnology, США), CD86 (E-AB-40090) разведении 1 : 150 (Elabscience, КНР) и NF-h (E5) в разведении 1 : 300 (Sc22909) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для окрашивания использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Гер-

мания). Реакции были выполнены после депарфинизации и дегидратации, демаскировки антигенов фосфатно-солевым буфером (pH 8,0) в течение 30 минут, блокировки эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода с экспозицией 30 минут при 37 °С. Для отмывки использовали PBS буфер (pH 7,4). Срезы выдерживали в протеиновом блоке при 37 °С 30 мин, после чего наносили антитела, инкубировали 20 мин. Ядра докрашивали гематоксилином. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием микроскопа Leica DMD 108 (Leica, Германия) со специализированным программным обеспечением. Фоторегистрацию макропрепаратов проводили Nikon Eclipse 80i (камера Nikon DS-Fi1) (Nikon, Япония).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проведена с использованием программного обеспечения Jamovi версии 2.6.44 и Microsoft Excel 2019 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе после применения ксеногенного трансплантата 43 животных из 49 (87,6%) погибли после операции в ближайшие 7 суток, остальные 4 животных прожили до 14 суток. Таким образом, послеоперационная летальность составила 100%. Досуточная летальность к абсолютному числу крыс составляла 53,3%. Макроскопически имплантированный биоматериал после вмешательства сохранял целостность, имел умеренную геморрагическую имбибицию поверхности и выраженный сосудистый рисунок (рис. 2).

Гистологическая картина этих образцов соответствовала картине выраженной воспалительной ре-

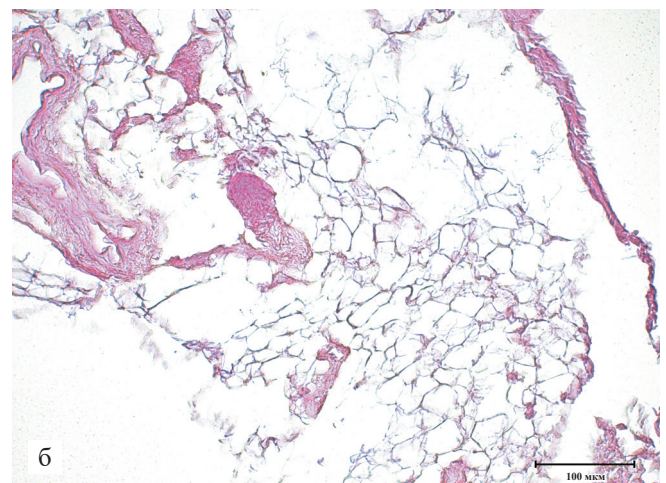
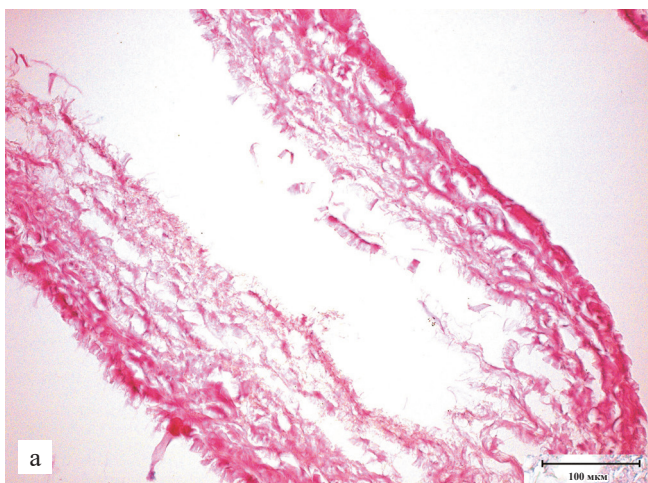


Рис. 1. Биоматериалы: а – ксенотрансплантат из фиброзной капсулы почки человека; б – аллотрансплантат из тонкого кишечника крысы. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Biomaterials: а – xenograft derived from the fibrous capsule of a human kidney; б – allograft derived from the small bowel of a rat. H&E stain

акции – некроза. Выявлялись признаки некробиотических процессов: лизис частиц ксенотрансплантата, дилатация, полнокровие и стаз сосудов кровеносного русла, выраженная инфильтрация воспалительными клетками: нейтрофилами, макрофагами, лейкоцитами, лимфоцитами, гнойное расплавление трансплантированных и окружающих зону операции тканей (рис. 3).

В опытной группе животных после аллотрансплантации досуточная летальность составила 2%

(n = 1). При морфологическом исследовании через 7 дней после проведенной операции аллогенный биоматериал подвергался постепенной биодеградации и резорбции макрофагами. Параллельно он замещался грануляционной тканью, представленной рыхлой волокнистой соединительной тканью с макрофагально-фибробластической инфильтрацией и наличием лейкоцитов (рис. 4).

На месте трансплантата формировалась грануляционная ткань. Со стороны просвета кишки опреде-

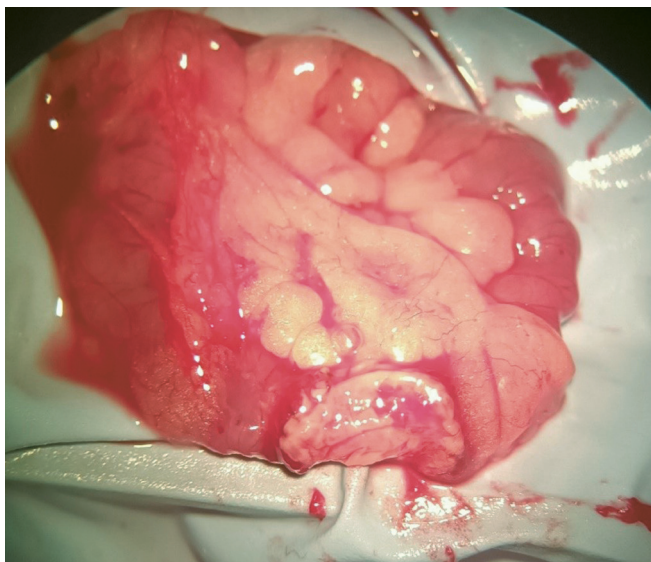


Рис. 2. Вид биоматериала после имплантации

Fig. 2. Gross appearance of the biomaterial following implantation



Рис. 3. Некроз кишки после проведения ксенотрансплантации. Микрофото

Fig. 3. Intestinal necrosis following xenotransplantation. Micrograph

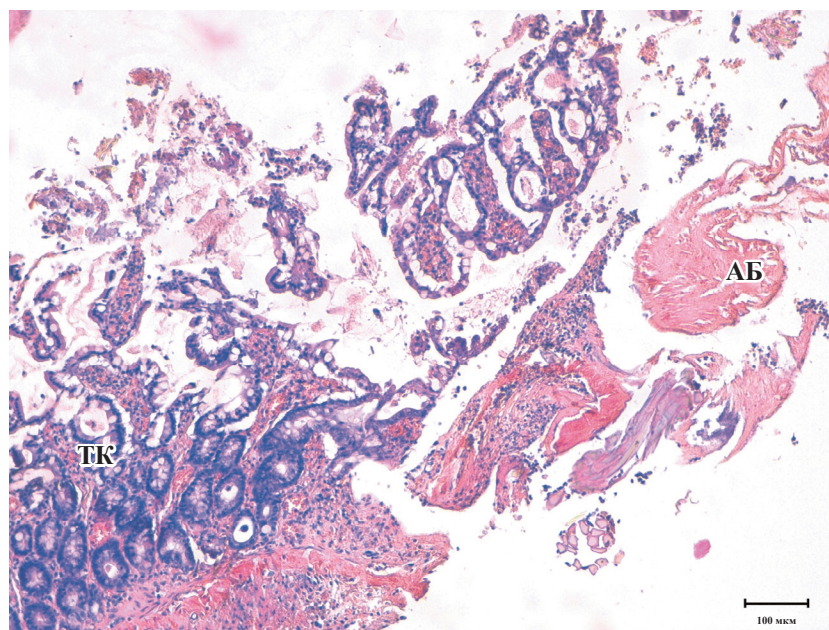


Рис. 4. 7 дней после трансплантации аллогенного биоматериала (АБ) в дефект тонкой кишки (ТК). Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 4. Seven days after transplantation of allogeneic biomaterial (АБ) into a small intestinal (ТК) defect. H&E stain

лялись признаки разрастания однослойного эпителия со стороны окружающих тканей на новообразованные коллагеновые волокна грануляционной ткани (рис. 5).

Спустя 14 суток аллогенного биоматериала не было обнаружено. Он замещался грануляционной тканью, состоящей из разнонаправленных коллагеновых волокон, инфильтрированных макрофа-

гально-фибробластическими клетками (рис. 6, а). В перифокальной зоне определялись признаки дифференциации эпителиальных клеток, появлялись колоноциты, каемчатые энтероциты, единичные бокаловидные клетки, ворсинки удлинялись, формировалась собственная пластинка слизистой оболочки кишки. Также выявлялась сеть разнонаправленных гемокапилляров. Интенсивно окраши-

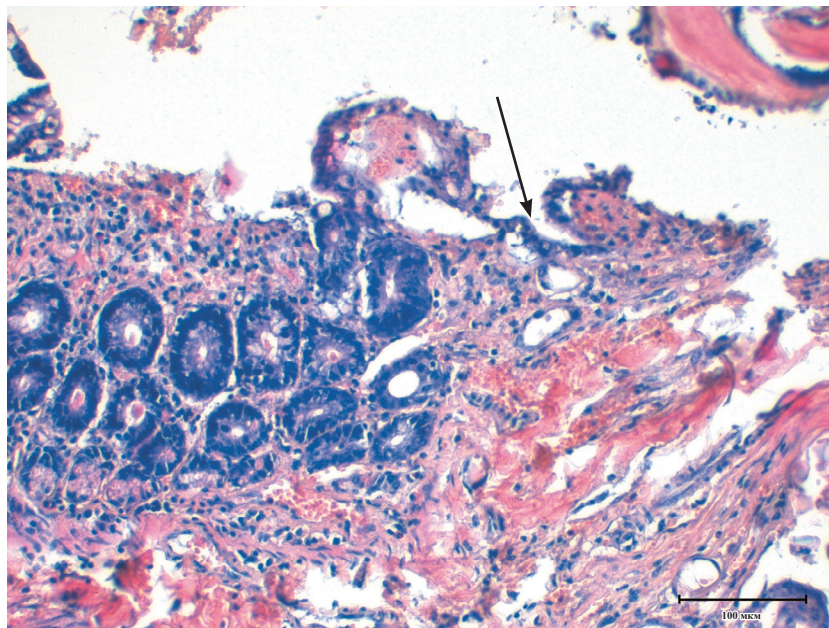


Рис. 5. 7 дней после трансплантации аллогенного биоматериала в дефект тонкой кишки. Монослой эпителиоцитов на границе с грануляционной тканью (↑). Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 5. Seven days after transplantation of allogeneic biomaterial into a small intestinal defect. A monolayer of epithelial cells bordering the granulation tissue (↑). H&E stain

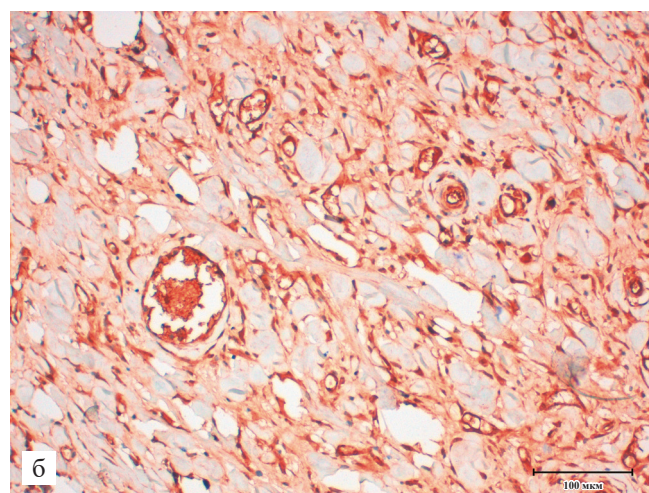
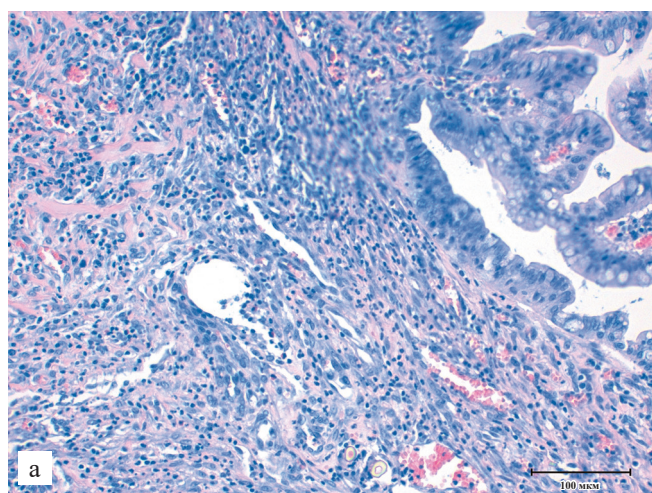


Рис. 6. 14 суток после трансплантации аллогенного биоматериала в дефект тонкой кишки: а – грануляционная ткань, окраска гематоксилином и эозином; б – выявление PECAM-клеток (коричневое окрашивание), непрямого иммунопероксидазного метода выявления антител к PECAM с докраской гематоксилином

Fig. 6. Fourteen days after transplantation of allogeneic biomaterial into a small intestinal defect: a – granulation tissue, H&E stain; б – detection of PECAM-positive cells (brown staining), indirect immunoperoxidase staining for PECAM with hematoxylin counterstaining

вались PECAM⁺ клетки (маркер эндотелиоцитов) (рис. 6, б).

Спустя 1 месяц аллогенный биоматериал был полностью на всем протяжении замещен грануляционной тканью, в которой проявлялись признаки зрелости. Пучки коллагеновых волокон приобретали одновекторное направление, параллельную ори-

ентацию вдоль длинной оси кишки. Наблюдались признаки пролиферации и миграции гладкомышечных клеток со стороны резецированной кишки из его мышечного слоя (как внутреннего циркулярного, так и наружного продольного) в межволоконные промежутки новообразованной волокнистой соединительной ткани (рис. 7, а). Миграции лейомиоцитов

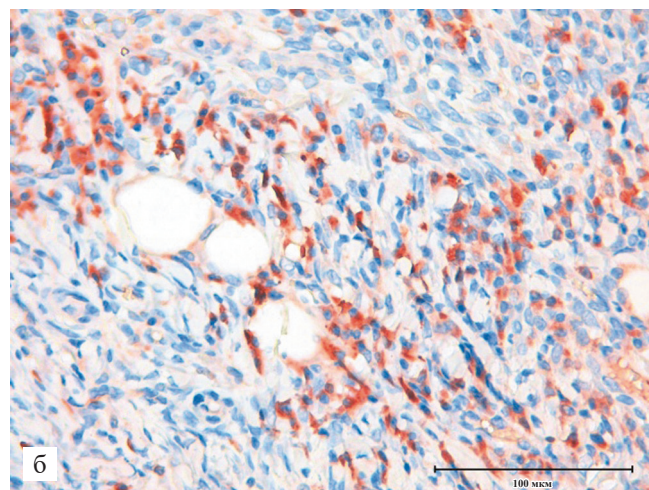
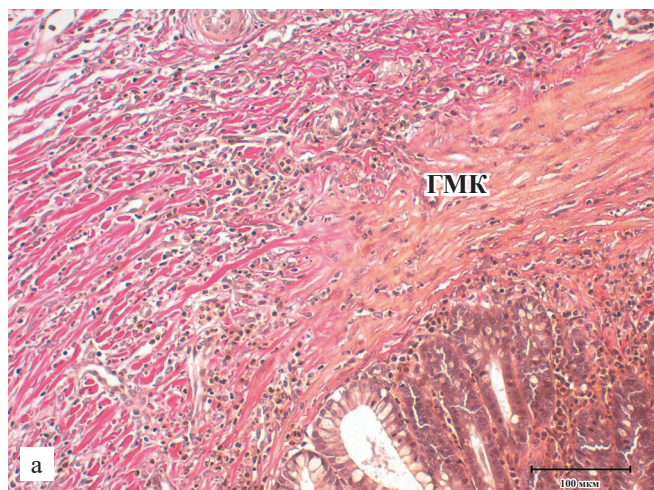


Рис. 7. Новообразованная грануляционная ткань через 30 суток после трансплантации аллогенного биоматериала: а – коллагеновые волокна имеют упорядоченную архитектуру, гладкомышечные клетки (ГМК) вдоль параллельно ориентированных новообразованных коллагеновых волокон, окраска по Ван-Гизону; б – выявление CD86-клеток, непрямым иммунопероксидазным методом выявления антител к CD86 с докраской гематоксилином

Fig. 7. Newly formed granulation tissue 30 days after transplantation of allogeneic biomaterial: a – organized collagen fiber architecture with smooth muscle cells (ГМК) aligned parallel to the newly formed collagen fibers, Van Gieson stain; б – detection of CD86-positive cells, indirect immunoperoxidase staining for CD86 with hematoxylin counterstain

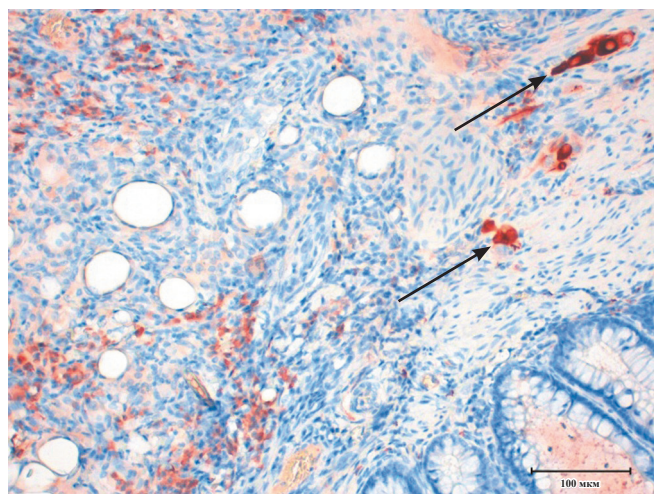


Рис. 8. Нервные клетки ганглий в стенке новообразованной тонкой кишки через 30 суток после трансплантации аллогенного биоматериала. Непрямой иммунопероксидазный метод выявления антител к NF-h с докраской гематоксилином

Fig. 8. Ganglion nerve cells in the wall of the newly formed small intestine 30 days after transplantation of allogeneic biomaterial. Indirect immunoperoxidase staining for NF-H with hematoxylin counterstain

предшествовала инфильтрация фибробластических и макрофагальных клеток, которые определялись в преобладающем количестве. Наблюдались макрофаги CD86⁺ (рис. 7, б).

В новообразованном межмышечном пространстве между наружным и внутренним циркулярными слоями определялись скопления нервных клеток ганглий мышечно-кишечного ауэрбаха нервного сплетения, также нейроэндокринные клетки были диссеминированы в подслизистом слое (рис. 8).

Через 2–3 месяца наблюдались признаки восстановления всех слоев стенки тонкой кишки. Происходило замещение дефекта с формированием мышечного слоя, состоящего из внутренней пластинки – циркулярно расположенных гладких мышечных клеток – и из наружной – продольно ориентированных лейомиоцитов. Наружный слой новообразованной кишки был представлен слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани – адвентицией. В слизистой оболочке отмечалась вариабельность высоты ворсинок от 57 до 69 мкм. Основу клеток ворсинок составляли призматические всасывающие клетки, однако среди них встречались многочислен-

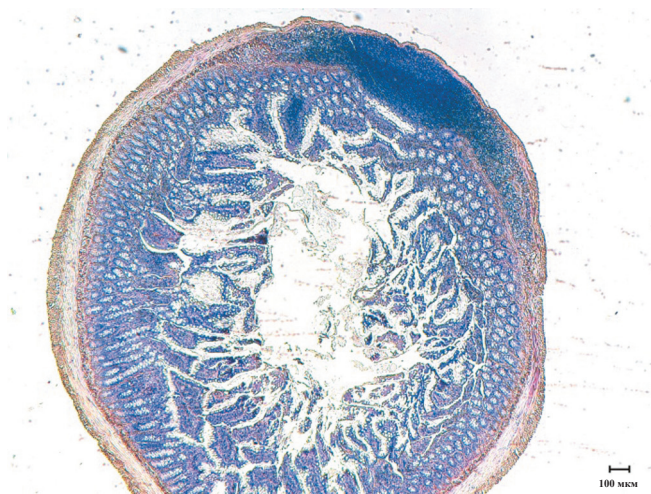


Рис. 9. Состояние тонкой кишки крысы после трансплантации аллогенного биоматериала через 3 месяца. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 9. Rat small bowel three months after transplantation of allogeneic biomaterial. H&E stain

ные бокаловидные клетки и клетки Панета. Собственная пластинка слизистой оболочки кишки состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани и содержала кровеносные сосуды и лимфатические капилляры. В слизистой оболочке выявлялись скопления лимфоидной ткани – пейеровы бляшки, что соответствует нормальной структуре стенки тонкой кишки. Спаечный процесс не обнаружен (рис. 9).

Следовательно, в начальные сроки эксперимента аллогенный биоматериал резорбировался макрофагами. На его месте формировалась грануляционная ткань, которая со временем постепенно замещалась органоспецифичными тканями со стороны интактной зоны тонкого кишечника со всеми ее структурными элементами. На основе новообразованной волокнистой соединительной ткани дефект тонкой кишки замещался мышечно-соединительно-тканевым регенератом. Мышечный слой тонкой кишки состоял из продольно и поперечно ориентированных гладких мышечных клеток. Слизистая оболочка с характерными многочисленными удлинненными ворсинками и подслизистая оболочки присутствовали, были обращены в просвет кишки. Снаружи мышечного слоя определялась фиброзная тонкая пластинка – адвентиция.

ОБСУЖДЕНИЕ

Протестирована возможность применения биометриков различного происхождения для удлинения кишки 30 мм. В регенеративной медицине для этой цели в равной степени используются как ксено-, так и аллогенные биоматериалы [27]. Исследуемые биоматериалы были обработаны по одинаковой методике, но результаты морфологического исследования

оказались противоположны. Так, при ксенотрансплантации наблюдалась летальность животных в ранние сроки в связи с отторжением биоматериала, развитием острого воспалительного иммунного ответа. Несмотря на отсутствие клеточных элементов, коллагеновые волокна имеют различную антигенную детерминированность, обусловленную инфильтрирующими макрофагальными клетками, которые и определяют исход заживления [28]. Результаты данного исследования показывают, что восстановление дефекта в группе животных с применением аллогенного трансплантата произошло. Смертность экспериментальных животных крайне низкая – 2%, или $n = 1$ в абсолютном значении, в то время как в контрольной группе 87,6%, или $n = 43$ в абсолютном значении. Можно полагать, что аллотрансплантаты не вызывают иммунного воспаления, биосовместимы. Выявлено, что они подвергаются постепенному лизису, биодеградации за счет макрофагальных клеток, которые преобладали в данной клеточной популяции. Нейтрофилы, лимфоциты обнаружены не были. Макрофаги находились в клеточных кооперациях с фибробластами, которые мигрировали на смену им для синтеза коллагеновых волокон грануляционной ткани. Различные подтипы макрофагов имеют различные функции в управлении восстановления тканей. Выявлено, что при резорбции аллогенного биоматериала принимают участие макрофаги с фенотипом CD86, которые являются классически активированными. M1-макрофаги экспрессируют повышенные уровни iNOS, CD86 и CD169 и т. д. [29–31]. Также многочисленные исследования указывают на ингибирование фиброза тканей за счет индуцированных макрофагов аллогенными биоматериалами [32, 33], которые функционируют в противовес профиброгенным M2 клеткам и являются их антагонистами, что особенно важно в начальный период ремоделирования [34]. В ранней стадии эксперимента макрофаги с фенотипом M1 мигрируют в область имплантации, вызывая фагоцитоз фрагментов биоматериала, что является критически важным для индукции образования грануляционной ткани [35]. Активная резорбция биоматериала, происходящая в ткани кишечника на 7–14-е сутки, способствует миграции и восстановлению слизистой оболочки и подслизистой ткани, что было представлено в 100% ($n = 5/5$) образцов ткани выведенных экспериментальных животных и соответствует данным других авторов [36]. Грануляционная ткань, формирующаяся на месте резорбированного биоматериала, присутствует в организме животного с 14-го по 30-й день и характеризуется наличием разнонаправленных коллагеновых волокон. Она является подложкой для миграции эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкого кишечника со стороны перифокальной зоны. Полностью сформированные крипты и ворсинки, окруженные

плоским эпителием, продемонстрировали эпителиальную дифференцировку (колоноциты, каемчатые энтероциты, бокаловидные клетки, клетки Панета, нейроэндокриноциты). Со временем архитектура коллагеновых волокон становилась упорядоченной, вектор волокон был ориентирован вдоль длинной оси кишечника, вероятно, это связано с контракцией органа. В расширенные межволоконные пространства прорастали лейомиоциты мышечного слоя. Во всех образцах, в которых обнаруживалась регенерация эпителия, также отмечалась более или менее развитая гладкомышечная мускулатура, состоящая из двух слоев – продольного и циркулярного. Наблюдались и другие структурные элементы кишки – кровеносные сосуды и нервные волокна. Обнаружена активная экспрессия фактора эндотелиальных клеток PECAM, которые участвовали в формировании сосудистых почек. Это указывает на активный процесс ангиогенеза, обеспечивающего необходимую перфузию для поддержания метаболических процессов в области анастомоза, и способствует доставке клеток, необходимых для дальнейшего этапа роста ткани [37]. Иннервация является ключом к успешной и состоятельной регенерации с конечной целью восстановления функции органа [38, 39]. Нервные волокна и нервные узлы энтеральной нервной системы располагались между циркулярным и продольным слоями мышц, а также в подслизистой основе. Нейроэндокринные клетки были распределены в эпителии слизистой оболочки и подслизистом слое. Известно, что энтеральная нервная система имеет потенциал к внутриклеточной регенерации и происходит при повреждении от предшествующих мышечно-нервных сплетений – ганглий Мейснеровского или ауэрбахова сплетений – и устанавливает прямые синаптические связи [40, 41]. К 60-му дню после трансплантации аллогенного матрикса произошло восстановление всех слоев стенки тонкой кишки, включая мышечный слой, слизистую оболочку, подслизистую пластинку и адвентицию. Возможность появления на данных сроках лимфоидного аппарата подтверждается множеством исследований, подчеркивающих вовлеченность иммунорегенераторных процессов [42, 43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При помощи микрохирургических кишечных швов была достигнута механическая герметичность между индивидуально адаптированными трансплантатами и стенками резидуальной тонкой кишки соответственно их толщине и соразмерности слоев. Это является предиктором успешной регенерации. После пересадки ксеногенного биоматериала летальность экспериментальных животных достигала 100% в ранние сроки после операции в связи с выраженной иммунной реакцией «трансплантат против хозяина» и отторжением ксеногенного биоматериала. После

применения АБ через 2–3 месяца после операции наблюдалось восстановление трехслойной микроанатомии и архитектоники всех слоев стенки тонкой кишки, что подтверждается непосредственной визуализацией кишечной стенки в различных плоскостях. Формирование в течение 1 месяца сосудистых структур демонстрирует ангиогенный потенциал аллогенного биоматериала и косвенно указывает на состоятельность перфузии участка кишки. Образование нервных ганглий служит доказательством перистальтической деятельности новообразованной кишки и формирования нервных кишечных сплетений. Таким образом, использование предложенного метода в эксперименте действительно способствует регенерации протяженного участка тонкой кишки от 30 мм, демонстрирует эффективность в восстановлении микроархитектоники кишечника со всеми структурными элементами кишечной стенки и может быть применимо для лечения заболеваний, ассоциированных с СКК.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Seetharam P, Rodrigues G.* Short bowel syndrome: a review of management options. *Saudi J Gastroenterol.* 2011; 17 (4): 229–235. doi: 10.4103/1319-3767.82573. PMID: 21727727; PMCID: PMC3133978.
2. *Lloyd DA, Vega R, Bassett P, Forbes A, Gabe SM.* Survival and dependence on home parenteral nutrition: experience over a 25-year period in a UK referral centre. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24 (8): 1231–1240. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.03106.x. PMID: 17014582.
3. *Sabharwal G, Strouse PJ, Islam S, Zoubi N.* Congenital short-gut syndrome. *Pediatr Radiol.* 2004; 34 (5): 424–427. doi: 10.1007/s00247-003-1087-2. Epub 2003 Dec 16. PMID: 14676985.
4. *Jia Q, Li H, Zhou H, Zhang X, Zhang A, Xie Y et al.* Role and effective therapeutic target of gut microbiota in heart failure. *Cardiovasc Ther.* 2019; 2019: 5164298. doi: 10.1155/2019/5164298.
5. *DiMartini A, Rovera GM, Graham TO, Furukawa H, Todo S, Funovits M et al.* Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1998; 22 (6): 357–362. doi: 10.1177/0148607198022006357. PMID: 9829608.
6. *Atema JJ, Mirck B, Van Arum I, Ten Dam SM, Serlie MJ, Boermeester MA.* Outcome of acute intestinal failure. *Br J Surg.* 2016; 103 (6): 701–708. doi: 10.1002/bjs.10094. PMID: 26999497.
7. *Cowles RA, Ventura KA, Martinez M, Lobritto SJ, Harren PA, Brodlye S et al.* Reversal of intestinal failure-associated liver disease in infants and children on parenteral nutrition: experience with 93 patients at a referral center for intestinal rehabilitation. *J Pediatr Surg.* 2010;

- 45 (1): 84–88. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.10.014. PMID: 20105585.
8. Spagnuolo MI, Cicalese MP, Bruzzese E, Caiazzo MA, Di Caro S, Squeglia V, Guarino A. Eleven years of management of children with intestinal failure and not candidates for intestinal transplantation. *Transplant Research and Risk Management*. 2010; 2: 71–75. doi: 10.2147/TRRM.S11930.
9. Kaye AJ, Patel SJ, Meyers SR, Ahlawat S. Outcomes of inflammatory bowel disease in hospitalized patients with generalized anxiety disorder. *Cureus*. 2022; 14 (8): e27656. doi: 10.7759/cureus.27656. PMID: 36072180; PMCID: PMC9439936.
10. Goulet O, Abi Nader E, Pigneur B, Lambe C. Short bowel syndrome as the leading cause of intestinal failure in early life: some insights into the management. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2019; 22 (4): 303–329. doi: 10.5223/pghn.2019.22.4.303. PMID: 31338307; PMCID: PMC6629594.
11. Камалова АА, Подшивалина АА, Сазеева ГИ, Дружкова ЕЕ. Региональный опыт лечения детей с синдромом короткой кишки. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2022; 67 (5): 231–236. Kamalova AA, Podshivalina AA, Sageeva GI, Druzhkova EE. Regional experience in the treatment of children with short bowel syndrome. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics)*. 2022; 67 (5): 231–236. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2022-67-5-231-236>.
12. Ladd MR, Costello CM, Gosztyla C, Werts AD, Johnson B, Fulton WB et al. Development of intestinal scaffolds that mimic native mammalian intestinal tissue. *Tissue Eng Part A*. 2019; 25 (17–18): 1225–1241. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0239. PMID: 30652526; PMCID: PMC6760185.
13. Wang Y, Wang Z, Dong Y. Collagen-based biomaterials for tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023; 9 (3): 1132–1150. doi: 10.1021/acsbomaterials.2c00730. PMID: 36800415.
14. Binlath T, Thammanichanon P, Rittipakorn P, Thinsathid N, Jitprasertwong P. Collagen-based biomaterials in periodontal regeneration: current applications and future perspectives of plant-based collagen. *Biomimetics (Basel)*. 2022; 7 (2): 34. doi: 10.3390/biomimetics7020034. PMID: 35466251; PMCID: PMC9036199.
15. Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc*. 1997; 29: 848–851. doi: 10.1016/s0041-1345(96)00164-9. PMID: 9123551.
16. Kim SS, Kaihara S, Benvenuto MS, Choi RS, Kim BS, Mooney DJ et al. Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine 1, 2. *Transplantation*. 1999; 67 (2): 227–233. doi: 10.1097/00007890-199901270-00007. PMID: 10075585.
17. Kaihara S, Kim SS, Kim BS, Mooney D, Tanaka K, Vacanti JP. Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel. *Transplantation*. 2000; 69 (9): 1927–1932. doi: 10.1097/00007890-200005150-00031. PMID: 10830233.
18. Zakhem E, Raghavan S, Bitar KN. Neo-innervation of a bioengineered intestinal smooth muscle construct around chitosan scaffold. *Biomaterials*. 2014; 35 (6): 1882–1889. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.049. PMID: 24315576.
19. Hori Y, Nakamura T, Kimura D, Kaino K, Kurokawa Y, Satomi S et al. Experimental study on tissue engineering of the small intestine by mesenchymal stem cell seeding. *J Surg Res*. 2002; 102 (2): 156–160. doi: 10.1006/jsre.2001.6294. PMID: 11796013.
20. Liu Z, Rütten S, Buhl EM, Zhang M, Liu J, Rojas-González DM et al. Development of a Silk Fibroin-Small Intestinal Submucosa Small-Diameter Vascular Graft with Sequential VEGF and TGF- β 1 Inhibitor Delivery for In Situ Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2023; 23 (9): 2300184. doi: 10.1002/mabi.202300184.
21. Nakase Y, Hagiwara A, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T et al. Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng*. 2006; 12 (2): 403–412. doi: 10.1089/ten.2006.12.403. PMID: 16548698.
22. Khasanov R, Svoboda D, Tapia-Laliena MÁ, Kohl M, Maas-Omlor S, Hagl CI et al. Muscle hypertrophy and neuroplasticity in the small bowel in short bowel syndrome. *Histochem Cell Biol*. 2023; 160 (5): 391–405. doi: 10.1007/s00418-023-02214-4. PMID: 37395792; PMCID: PMC10624713.
23. Pahari MP, Raman A, Bloomenthal A, Costa MA, Bradley SP, Banner B et al. A novel approach for intestinal elongation using acellular dermal matrix: an experimental study in rats. *Transplant Proc*. 2006; 38 (6): 1849–1850. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.05.052. PMID: 16908302.
24. Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kuriu Y et al. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 2007; 137 (1): 61–68. doi: 10.1016/j.jss.2006.06.019. PMID: 17084409.
25. Мулдашев ЭР, Муслимов СА, Вялков ВА, Галимова ВУ, Нигматуллин РТ, Салихов АЮ и др. Биоматериал «Аллоплант» для регенеративной хирургии. Патент RU 2189257 C1. 2002-09-20. Muldashev ER, Muslimov SA, Vyalkov VA, Galimova VU, Nigmatullin RT, Salikhov AYU et al. Biomaterial «Alloplant» dlya regenerativnoy khirurgii. Patent RU 2189257 C1. 2002-09-20. [In Russ, English abstract].
26. Регенеративная медицина. Под ред. Э.Р. Мулдашева. Уфа: ГУП «Башкортостан», 2014; 432. Regenerativnaya meditsina. Pod red. E.R. Muldasheva. Ufa: GUP «Bashkortostan», 2014; 432. [In Russ, English abstract].
27. Chen Y, Guo C, Manousiouthakis E, Wang X, Cairns DM, Roh TT et al. Bi-layered tubular microfiber scaffolds as functional templates for engineering human intestinal smooth muscle tissue. *Adv Funct Mater*. 2020; 30 (17): 2000543. doi: 10.1002/adfm.202000543. Epub 2020 Feb 27. PMID: 33692658; PMCID: PMC7938961.

28. Лебедева АИ, Муслимов СА, Мусина ЛА. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза. *Биомедицина*. 2013; 1 (4): 114–123. Lebedeva AI, Muslimov SA, Musina LA. Experimental modeling of the process of chronic inflammation and fibrosis. *Journal Biomed*. 2013; 1 (4): 114–123. [In Russ, English abstract].
29. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (11): 723–737. doi: 10.1038/nri3073. PMID: 21997792; PMCID: PMC3422549.
30. Sicari BM, Johnson SA, Siu BF, Crapo PM, Daly KA, Jiang H et al. The effect of source animal age upon the *in vivo* remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold. *Biomaterials*. 2012; 33 (22): 5524–5533. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.017. PMID: 22575834; PMCID: PMC3569720.
31. Liu Z, Zhu J, Li Z, Liu H, Fu C. Biomaterial scaffolds regulate macrophage activity to accelerate bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023; 11: 1140393. doi: 10.3389/fbioe.2023.1140393. PMID: 36815893; PMCID: PMC9932600.
32. Лебедева АИ, Гареев ЕМ, Афанасьев СА, Кондратьева ДС, Муслимов СА, Попов СВ. Аллогенный биоматериал – ингибитор фиброза в ишемически поврежденном миокарде. *Медицинская иммунология*. 2023; 25 (2): 301–308. Lebedeva AI, Gareev EM, Afanasiev SA, Kondratieva DS, Muslimov SA, Popov SV. Allogeneic biomaterial: a fibrosis inhibitor in ischemic myocardial damage. *Medical Immunology (Russia)*. 2023; 25 (2): 301–308. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.15789/10.15789/1563-0625-ABA-2359>.
33. Мусина ЛА, Шакиров РФ, Галимова ВУ, Шангина ОР, Лебедева АИ, Кадыров РЗ. Биоматериал «Аллоплант» как ингибитор рубцевания поврежденной роговицы (иммуногистохимическое исследование). *Практическая медицина*. 2019; 17 (1): 112–116. Musina LA, Shakirov RF, Galimova VU, Shangina OR, Lebedeva AI, Kadirov RZ. «Alloplant» biomaterial as the inhibitor of scarring the damaged cornea (immunohistochemical study). *Practical medicine*. 2019; 17 (1): 112–116. [In Russ, English abstract].
34. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor α suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000; 275 (20): 15220–15225. doi: 10.1074/jbc.275.20.15220. PMID: 10809757.
35. Censi R, Van Putten S, Vermonden T, Di Martino P, Van Nostrum CF, Harmsen MC et al. The tissue response to photopolymerized PEG-p (HPMAm-lactate)-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 97 (3): 219–229. doi: 10.1002/jbm.a.33048. PMID: 21442723.
36. García-Arrarás JE, Valentín-Tirado G, Flores JE, Rosa RJ, Rivera-Cruz A, San Miguel-Ruiz JE et al. Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*. *BMC Dev Biol*. 2011; 11 (1): 61. doi: 10.1186/1471-213X-11-61. PMID: 22004330; PMCID: PMC3207902.
37. Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J, Cordero KE, Freytes DO, Heber-Katz E et al. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15 (3): 605–614. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0425. PMID: 18652541.
38. Khodosevich K, Monyer H. Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons *in vitro*. *BMC Neurosci*. 2010; 11 (1): 18. doi: 10.1186/1471-2202-11-18. PMID: 20146799; PMCID: PMC2831042.
39. Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 13 (9): 517–528. PMCID: PMC5005185.
40. Fehèr E. Ultrastructural study of nerve terminals in the submucous plexus and mucous membrane after extirpation of the myenteric plexus. *Acta Anat (Basel)*. 1976; 94 (1): 78–88. PMID: 961341.
41. Da Silveira AB, Freitas MA, De Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Furness JB et al. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology*. 2008; 135 (11): 1337–1342. doi: 10.1017/S0031182008004770. PMID: 18664306.
42. Musina LA, Shangina OR, Nigmatullin RT, Muslimov SA. Experimental muscle reinnervation by allogeneic biomaterial illustrates restoration of interlevel relations in human body. *Saratov Medical Journal*. 2020; 16 (2): 623–627.
43. Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T et al. Macrophages – key cells in the response to wear debris from joint replacements. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101 (10): 3033–3045. doi: 10.1002/jbm.a.34599. Epub 2013 Apr 9. PMID: 23568608; PMCID: PMC3775910.

Статья поступила в редакцию 16.10.2025 г.
The article was submitted to the journal on 16.10.2025