

С. В. Шахрай

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ АНАЛЬНОЙ ИНКОНТИНЕНЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

*Проведены экспериментальные исследования на лабораторных животных (белые крысы) по созданию модели анального недержания функционального и органического характера. Лечение полученной патологической модели проводили с помощью инъекционной трансплантации в область анального сфинктера клеточной суспензии. В эксперименте использовали три типа клеточного материала – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга и гладкомышечные клетки. Контрольным группам проводили инъекцию в сфинктер прямой кишки физиологического раствора. На 21-е сутки после клеточной трансплантации животных выводили из эксперимента с изъятием прямой кишки для морфологической оценки изменений в тканях прямой кишки и параректальной клетчатке.*

**Ключевые слова:** анальная инконтиненция, сфинктер прямой кишки, клеточная трансплантация, стволовая клетка.

S. V. Shakhrai

## MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE USE OF CELL TRANSPLANTATION IN THE TREATMENT OF ANAL INCONTINENCE IN EXPERIMENT

*Experimental studies in laboratory animals (white rats). Anal incontinence model was established in experimental conditions. The study created a model of functional and organic incontinence. Treatment was given an experimental model of anal incontinence via injection of the cell suspension transplantation into the region of the anal sphincter. Three types of cell material were used in the experiment – mesenchymal stem cells of adipose tissue, bone marrow mesenchymal stem cells and smooth muscle cells. Control groups of animals were injected with saline solution in the region of the anal sphincter. The animals were taken out of the experiment at day 21 after the cell transplantation. The animals were excised rectum and adrectal tissue for morphological assessment of the changes in the tissues.*

**Key words:** anal incontinence, the sphincter of the rectum, cell transplantation, stem cell.

Для лечения анального недержания в современной хирургии применяются консервативные и хирургические методики. Консервативное лечение сочетает в себе как правило несколько направлений. Это может быть коррекция режима питания и диета, применение комплекса лечебных физических упражнений, улучшение рефлекторных связей с использованием технологий на основе «биологической обратной связи», анальная и сакральная электростимуляция, тиббиальная нейромодуляция. Эффективность консервативных методик колеблется от 15–18% до 70–85% [7]. Хирургические способы лечения недостаточности анального сфинктера применяются при отсутствии эффекта от консервативных мероприятий, а также при инконтиненции второй и третьей степени, наличии у пациента рубцовых деформаций анального канала, нарушении нормальной анатомии в дистальном отделе прямой кишки [1, 10]. Выбор метода хирургической коррекции зависит от степени инконтиненции и объёма повреждений сфинктера.

В своей практике хирурги используют сфинктеропластику, сфинктеролеваторопластику, сфинктероглютеопластику, глютеопластику, грацилопластику и другие реконструктивные операции [10]. Применяется эксплантация синтетических материалов и устройств, моделирующих функцию анального жома [3, 9]. Эффективность хирургических вмешательств также имеет значительную вариабельность – от 18% до 60% положительных результатов. Поэтому поиск новых методик лечения анального недержания является актуальным вопросом проктологии. В этой связи перспективным направлением могут стать технологии клеточной трансплантации [2, 4, 5, 6, 8].

### Материал и методы

Экспериментальные исследования были проведены на белых однополых крысах, которые разделены на две группы:

– А (первая группа, n = 32), создана модель органической формы анального недержания, жи-

вотным под внутримышечным наркозом производили механическое повреждение сфинктера прямой кишки;

– В (вторая группа,  $n = 32$ ), животным формировали модель функциональной сфинктерной недостаточности путем инъекционного введения в область сфинктера прямой кишки препарата «Ди-спорт» (ботулинический токсин типа А – гемагглютинин комплекс);

На 7-е сутки после моделирования сфинктерной недостаточности в каждой из групп А и В были выделены ещё 4 группы (А1, А2, А3, А4, В1, В2, В3, В4) по 8 животных.

Для трансплантации лабораторным животным с недостаточностью анального сфинктера использовали культуру 2-го пассажа мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и костного мозга (МСК ЖТ и КМ) и гладкомышечные клетки (ГМК). Клеточную суспензию вводили инъекционным способом в область внутреннего сфинктера из двух противоположенных точек с помощью инсулинового шприца количеством  $2,5 \times 10^5$  на одну крысу. Группам А1 и В1 вводили МСК ЖТ, группам А2 и В2 – МСК КМ, группам А3 и В3 – ГМК. Контрольным группам А4 и В4 проводили инъекцию в сфинктер прямой кишки физиологического раствора. На 21-е сутки после клеточной трансплантации животных выводили из эксперимента с изъятием прямой кишки для морфологической оценки изменений в тканях.

Все экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с современными принципами и нормами биоэтики, в том числе «Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных, используемых в эксперименте и для других научных целей» (1986), «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», Этического кодекса СММНО (1985), «Всемирной декларацией прав животных» («Universal Declaration of Animal Rights», принятой Международной Лигой Прав Животных в 23 сентября 1977 года в Лондоне и объявленной 15 октября 1978 года в штабе ЮНЕСКО в г. Париже), а также Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, которые используются в научных целях. Объём и характер экспериментальных исследований согласован с комитетом по биоэтике БелМАПО.

На светооптическом уровне проводили оценку гистологических изменений ректальных тканей с использованием микроскопов «Leica DMLS» (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, ФРГ) и «Zeiss» (Zeiss

AG, ФРГ), выполнено морфометрическое измерение зон с помощью цветных видеокамер «DMLS» и «Canon Power Shot G3», программного обеспечения «Qwin Leica» и «Bioscan».

### Результаты и обсуждение

У всех животных в группе А4 в зоне повреждения имеются очаги скле-роза с разрушением структурных элементов мышечной стенки, в группе В4 в стенке кишки животных во всех случаях структурных изменений не обнаружено.

Во всех случаях в группе А<sub>1</sub> в зоне трансплантации отсутствовал слой поперечно-полосатых мышц, а гладкомышечный компонент кишечной стенки был резко гиперплазирован и представлен двумя слоями клеток: поперечным и продольным. При этом отмечалось плотное, компактное расположение гладкомышечных миоцитов в обоих слоях. По периферии зоны повреждения миоциты поперечно-полосатых мышц располагались в виде отдельных разнонаправленных пучков среди фиброзной ткани, а гладкомышечные клетки формировали один поперечный слой. Толщина гладкомышечного слоя в зоне трансплантации составила 482,8 (422,5÷502,5) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с контролем ( $p = 0,0001$ ).

В группе исследования В<sub>1</sub> (введение МСК ЖТ) во всех случаях выявлена схожая гистологическая картина: слизистая прямой кишки выстлана многослойным плоским эпителием, в подслизистой основе выявлен очаговый фиброз в зоне трансплантации, гладкомышечный компонент кишечной стенки был представлен двумя слоями клеток: поперечным и продольным. Пучки миоцитов продольного (наружного) слоя были разделены тонкими фиброзными перегородками. По периферии зоны трансплантации МСК ЖТ располагались миоциты поперечно-полосатых мышц в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно), при этом последние формировали один слой. Толщина гладкомышечного слоя в зоне трансплантации составила 447,4 (394,6÷478,2) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с контролем ( $p = 0,00012$ , Манн-Уитни U-тест).

В группе исследования А<sub>2</sub>, где лечение органической формы инконтиненции проводили путем

трансплантации суспензии МСК КМ отмечены во всех наблюдениях схожие гистологические изменения: слизистая прямой кишки выстлана многослойным плоским эпителием, в подслизистой основе выявлен очаговый фиброз, в зоне трансплантации выявлены «островки» поперечно-полосатых мышц, гладкомышечный компонент кишечной стенки был представлен преимущественно гиперплазированным циркулярным слоем, в котором отмечались прослойки фиброзной ткани среди пучков мышечных клеток, по периферии зоны трансплантации миоциты поперечно-полосатых мышц так же, как и гладкомышечные клетки располагались в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно), при этом последние формировали один слой, были выявлены пучки гладкомышечных клеток, расположенных продольно. Толщина мышечного слоя в зоне трансплантации составила 282,3 (264,5÷305,7) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с нормой ( $p = 0,00023$ ).

В группе исследования В<sub>2</sub> (трансплантация МСК КМ) у всех животных выявлены схожие гистологические изменения: слизистая прямой кишки выстлана многослойным плоским эпителием, в подслизистой основе выявлен очаговый фиброз в зоне трансплантации, гладкомышечный компонент кишечной стенки представлен двумя слоями клеток, которые расположены в поперечном и продольном направлении, пучки миоцитов

слоя были разделены тонкими фиброзными перегородками, по периферии зоны трансплантации МСК ЖТ располагались миоциты поперечно-полосатых мышц в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно), при этом последние формировали один слой. Толщина мышечного слоя в зоне трансплантации составила 290,2 (254,6÷312,4) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с контролем ( $p = 0,00012$ , Манн-Уитни U-тест).

Группа исследования А<sub>3</sub> сформирована из крыс, которым лечение органической формы анальной инконтиненции проводилось трансплантацией суспензии ГМК. Во всех сериях срезов имелась схожая гистологическая картина: слизистая прямой кишки была выстлана многослойным

плоским эпителием, в подслизистой основе выявлен очаговый фиброз, в зоне трансплантации гладкомышечный компонент кишечной стенки был представлен двумя слоями клеток, пучки миоцитов продольного слоя были разделены тонкими фиброзными перегородками, отмечалась преимущественная гиперплазия циркулярного слоя гладкомышечных клеток, по периферии зоны повреждения миоциты поперечно-полосатых мышц так же, как и гладкомышечные клетки располагались в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно), при этом последние формировали один слой. Толщина мышечного слоя в зоне трансплантации составила 456,3 (421,2÷502,3) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с контролем ( $p = 0,00018$  Манн-Уитни U-тест).

При гистологическом исследовании срезов кишечной стенки в группе животных В<sub>3</sub>, где лечение функциональной инконтиненции проводили путем трансплантации суспензии ГМК во всех случаях отмечены похожие гистологические изменения: слизистая прямой кишки выстлана многослойным плоским эпителием, в подслизистой основе выявлен очаговый фиброз, в зоне трансплантации гладкомышечный компонент кишечной стенки был представлен двумя слоями клеток с поперечным и продольным расположением, отмечалась преимущественная гиперплазия циркулярного слоя гладкомышечных клеток, по периферии зоны трансплантации миоциты поперечно-полосатых мышц также, как и гладкомышечные клетки располагались в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно), при этом последние формировали один слой. Толщина мышечного слоя в зоне трансплантации составила 288,2 (271,4÷307,3) пкс. При статистической обработке данных установлено статистически значимое преобладание гладкомышечного компонента стенки прямой кишки в данной группе исследования по сравнению с контролем ( $p = 0,00012$ , Манн-Уитни U-тест).

Таким образом, нужно отметить, что во всех группах исследования отмечается гиперплазия гладкомышечных клеток мышечного слоя стенки прямой кишки на фоне введения клеточной суспензии стволовых и гладкомышечных клеток по сравнению с контрольными группами, что отражается в изменении толщины данного слоя (табл. 1).

Таблица 1. Толщина гладкомышечного слоя прямой кишки в группах сравнения

Группы сравнения	Толщина гладкомышечного слоя, пкс (Ме [25÷75%])	р (Манн-Уитни U-тест)
A <sub>4</sub> , n = 8	97,4 [84,3÷127,2]	P <sub>A4, B4-A1, B1, A2, B2, A3, B3</sub> <0,001 P <sub>A1-B1, A2, B2, A3, B3</sub> <0,001 p <sub>B1-, A2, B2, B3</sub> <0,05 p <sub>A3- A2, B2, B3</sub> <0,05
B <sub>4</sub> , n = 8	95,3 [82,1÷124,7]	
A <sub>1</sub> , n = 8	482,8 [422,5÷502,5]	
B <sub>1</sub> , n = 8	447,4 [394,6÷478,2]	
A <sub>2</sub> , n = 8	282,3 [264,5÷305,7]	
B <sub>2</sub> , n = 8	290,2 [254,6÷312,4]	
A <sub>3</sub> , n = 8	456,3 [421,2÷502,3]	
B <sub>3</sub> , n = 8	288,2 [271,4÷ 307,3]	

Более выраженная пролиферация гладкомышечных клеток отмечена в группах A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>. При этом статистически значимых межгрупповых различий по толщине гиперплазированного гладкомышечного слоя стенки кишки в группах сравнения A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, и B<sub>3</sub> не выявлено (p > 0,001, Манн-Уитни U-тест).

Таким образом, можно отметить, что использование стволовых и гладкомышечных клеток при лечении анальной инконтиненции в эксперименте путём инъекционной аутотрансплантации в стенку прямой кишки сопровождается восстановлением мышечного слоя стенки за счёт пролиферации гладкомышечных клеток с формированием гиперплазированного мышечного слоя. Максимальная гиперплазия гладкомышечного слоя стенки кишки отмечена при введении МСК ЖТ.

## Литература

1. *Anorectal diseases* / Ph. Godeberge [et al.] ; dir. by Ph. Godeberge. – Paris : Medecine-Sciences Flammarion, 2008. – 279 p.
2. Boonen, K. J. The muscle stem cell niche : regulation of satellite cells during regeneration / K. J. Boonen, M. J. Post // *Tissue Eng.* – 2008. – Vol. 14. – P. 419–431.
3. *Carbon-coated microbeads anal injection in outpatient treatment of minor fecal incontinence* / D. F. Altomare [et al.] // *Dis. Colon. Rectum.* – 2008.- Vol. 51, № 4. – p. 432–435.
4. *Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula : a Phase II clinical trial* / D. Garcia-Olmo [et al.] // *Dis. Colon Rectum.* – 2009. – Vol. 52. – P. 79–86.
5. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells* / P. A. Zuk [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – Vol. 13. – P. 4279–4295.
6. *Kajbafzadeh, A. M. Functional external anal sphincter reconstruction for treatment of anal incontinence using muscle progenitor cell auto grafting* / A. M. Kajbafzadeh, A. Elmi, S. S. Talab // *Dis Colon Rectum.* – 2010. – Vol. 53. – № 10. – P. 1415–1421.
7. *Rao, S. S. Pathophysiology of adult fecal incontinence* / S. S. Rao // *Gastroenterology.* – 2004. - Vol. 126, № 1. – P. 14–22.
8. *The expansion and biological characteristics of human mesenchymal stem cells* / D. H. Zhou [et al.] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* – 2003. – Vol. 41, № 8. – P. 607 – 610.
9. *Tjandra, J. J. Injectable silicone biomaterial for fecal incontinence caused by internal anal sphincter dysfunction is effective* / J. J. Tjandra , J. F. Lim, R. Hiscock // *Dis. Colon. Rectum.* – 2004. - Vol. 47, № 12. – p. 2138–2146.
10. *Treatment of fecal incontinence* / W. E. Whitehead [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 110, № 1. – p. 138–146.