

С. В. Шахрай

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ АНАЛЬНОЙ ИНКОНТИНЕНЦИИ МЕТОДОМ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Внедрение в практическое здравоохранение новых малоинвазивных методов лечения хирургической патологии является актуальной задачей современной медицинской науки. Одним из направлений научных исследований, позволяющих разрабатывать стационарозамещающие методики в хирургии, является применение технологий клеточной трансплантации. Задачей настоящей работы являлась оценка возможности лечения анального недержания с помощью клеточной инъекционной трансплантации суспензии мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток. В результате экспериментальных исследований было установлено, что использование клеточной суспензии мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток при лечении анального недержания в эксперименте позволяет восстановить замыкательную функцию сфинктерного аппарата прямой кишки.

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

S. V. Shakhrai

EFFECTIVE TREATMENT OF ANAL INCONTINENCE BY CELL TRANSPLANTATION IN EXPERIMENTAL

Implementation in practical health care of new minimally invasive treatment of surgical pathology is an actual problem of modern medical science. One area is the use technology of cellular transplantation of research that allow to develop medical technology to outpatient surgery. The objective of this work was to evaluate the possibilities of treatment of anal incontinence using injections cell suspension of mesenchymal stem cells and smooth muscle cells. The experimental results showed that the use of a cell suspension of mesenchymal stem cells and smooth muscle cells can restore function of the rectum in the case of fecal incontinence.

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

Недостаточность анального сфинктера – это нарушение запирающей функции сфинктерного аппарата прямой кишки с полным или частичным недержанием прямокишечного содержимого (инконтиненцией). Недостаточность сфинктера прямой кишки по происхождению может быть органической, функциональной или смешанной. Данное патологическое состояние существенно влияет на качество жизни пациента и является одним из самых проблемных в проктологии (в плане лечебного эффекта) [7]. Для коррекции анального недержания используют консервативные и хирургические методики. Консервативные мероприятия применяют у пациентов с первой степенью инконтиненции при отсутствии морфологического дефекта сфинктера не более четверти окружности и деформации анального канала [1]. Консервативные мероприятия включают соблюдение диеты, приём антидиарейных препаратов, лечение по принципу «биологической обратной связи», анальную и сакральную электростимуляцию, тиббиальную нейромодуляцию, использование комплекса лечебных упражнений и другие. При этом эффективность мероприятий варьирует в пределах 18–85% [10]. Применение хирургических методов лечения недостаточности анального сфинктера показано при отсутствии эффекта от консервативных мероприятий, при инконтиненции второй и третьей степени, наличии у пациента дефекта сфинктера более четверти окружности и рубцовых деформаций анального канала, нарушении анатомических взаимоотношений сфинктерного аппарата [1]. Выбор методики оперативного лечения зависит от степени анального недержания и объёма дефекта мышечного жома. В проктологической практике применяют ряд операций, направленных на реконструкцию мышечного каркаса сфинктерного аппарата за счёт собственных тканей: сфинктеропластику, сфинктеролеваторопластику, сфинктероглютеопластику, глютеопластику, грацилопластику и другие [10]. Используют методы реконструкции функции анального жома за счёт трансплантации протезов из синтетических материалов или инъекционного введения биоматериалов [3, 9]. Эффективность восстановления функции анального сфинктера в различных исследованиях, посвященных анализу результатов хирургической коррекции

инконтиненции, имеет значительные колебания – от 12 до 80% положительных результатов. При этом авторы отмечают, что при долгосрочном наблюдении положительный результат лечения наблюдается менее чем у пятой части оперированных пациентов, независимо от способа коррекции недостаточности [10].

Последнее десятилетие в экспериментальной и клинической медицине большое внимание уделяется разработке лечебных методик с применением клеточной трансплантации и технологий регенеративной медицины для восстановления как функциональных, так и структурных нарушений в организме, что фактически сформировало новое направление в реконструктивно-восстановительной хирургии [4, 6]. Основная задача большинства разработанных методов сводится к моделированию регенераторного тканевого потенциала с целью восстановления структуры и функции тканей, утраченных в результате заболевания или травмы. Целевым стимулом такого воздействия фактически является восстановление клеточной структуры и внеклеточного матрикса как единой гистологической составляющей тканей и органов. В этом плане наиболее перспективным направлением признано применение мезенхимальных стволовых клеток, выделяемых из костного мозга, жировой, мышечной и костной тканей. Они представляют собой популяцию мультипотентных стволовых (стромальных) клеток, обладающих высокой пластичностью, широким потенциалом дифференцировки, а также выраженной паракринной активностью (продуцируют цитокины, ферменты и факторы роста). Мультипотентные стромальные клетки помимо значительного регенераторного потенциала обладают иммунорегуляторным воздействием. Они могут модулировать иммунный ответ за счёт подавления пролиферации Т-лимфоцитов, а также стимуляции регуляторных супрессорных Т-клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) жировой ткани (ЖТ) обладают значительным противовоспалительным потенциалом и хорошо адаптируются в контаминированной среде. Помимо того, что МСК являются камбиальным резервом для восполнения специализированных клеток различных органов и тканей, они участвуют в регулировании течения воспалительного процесса, ангиогенеза и фиброза в зоне повреждения [8]. С практиче-

ской точки зрения для клинического использования имеют значение ткани, которые содержат достаточное количество МСК для селекции. Сегодня оптимальным источником их получения считается ЖТ [5]. Относительная доступность и безопасность получения, высокая пролиферативная активность, позволяющая увеличить численность клеток *ex vivo*, а также миогенный потенциал дифференцировки МСК делают данную клеточную популяцию привлекательным объектом клеточной терапии целого ряда заболеваний, в том числе ассоциированных с дисфункцией мышечной ткани.

Регенерация гладкой мышечной ткани осуществляется на двух уровнях – клеточном и внутриклеточном. Источниками клеточной регенерации являются субпопуляция малодифференцированных миоцитов и дифференцированные контракильные миоциты, подвергшиеся фенотипической трансформации. Внутриклеточная регенерация происходит за счёт структурной реорганизации и гипертрофии лейомиоцитов, расположенных в околораневой зоне [2]. Несмотря на наличие ряда механизмов регенерации мышечной ткани, гистотипическое восстановление целостности мышц после значительных повреждений ограничено [2].

Имеющиеся в литературе данные о возможностях лечения хирургической патологии с использованием технологий клеточной трансплантации позволяют целенаправленно вести поиск новых малоинвазивных методик лечения анальной инконтиненции.

Цель исследования – оценить в эксперименте возможности лечения анальной инконтиненции с применением технологии клеточной трансплантации.

Материал и методы

В эксперименте использовали 3 группы животных (белые крысы). В первой группе (А, $n = 32$) создавали модель органической формы анального недержания. С этой целью животным под внутримышечным наркозом производили механический разрыв сфинктера прямой кишки путём насильственной дивульсии ануса браншами кровоостанавливающего зажима, введенного в просвет прямой кишки. Разрыв сфинктера проводили симметрично в шести секторах окружности анального канала.

Во второй группе (В, $n = 32$) животных формировали модель функциональной инконтиненции. Для этого производили инъекционное введение в область сфинктера прямой кишки на 3 часах условного циферблата препарата «Диспорт» (ботулинический токсин типа А – гемагглютинин комплекс) в дозе 10 Ед на одного животного при этом «Диспорт» разводили физиологическим раствором хлорида натрия).

Третья группа (С, $n = 8$) была контрольной (этим животным никаких манипуляций не проводили).

Перед началом эксперимента и на 7-е сутки после создания модели выполняли оценку удерживающего объема прямой кишки, для чего через катетер, поставленный трансанально, шприцем в прямую киш-

ку животного вводили окрашенный в зелёный цвет гель высокой вязкости для ультразвуковых исследований («Медиагель», вязкость 23,0–31,0 Па·с). Гель вводили с помощью секционного медицинского дозатора для внутривенных инфузий со скоростью 0,1 мл/сек, что позволяло регулировать его объем. Введение геля осуществляли до появления следов выделения субстанции мимо катетера из прямой кишки (при этом регистрировали объем введенного геля в прямую кишку). За сутки до измерений животных прекращали кормить.

На 7-е сутки после моделирования сфинктерной недостаточности с целью изучения возможности её коррекции путём клеточной трансплантации животные 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 МСК ЖТ, МСК костного мозга (КМ) и гладкомышечные клетки (ГМК). В условиях обезболивания 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 животным всех групп выполняли исследование удерживающего объема прямой кишки с помощью геля для ультразвуковых исследований, после чего выводили животных из эксперимента с изъятием прямой кишки для морфологической оценки изменений в тканях прямой кишки и параректальной клетчатке.

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. Объем и характер экспериментальных исследований согласован с комитетом по биоэтике БелМАПО.

Результаты и обсуждение

Исследование удерживающего объема прямой кишки через неделю и три недели от начала эксперимента по моделированию анальной инконтинен-

Оригинальные научные публикации

Таблица 1. Показатели удерживающего объема прямой кишки в группах сравнения

Показатели сравнения	Группа С (контроль), n = 8	Группа А (органическая форма инконтиненции), n = 32	Группа В (функциональная форма инконтиненции), n = 32	p*
Объем геля (мл) (до создания модели), (Ме [25÷75%])	0,72 [0,6÷0,8]	0,71 [0,6÷0,8]	0,69 [0,6÷0,8]	p > 0,05
Объем геля (мл) на 7-е сутки после создания модели, (Ме [25÷75%])	0,70 [0,6÷0,8]	0,3 [0,2÷0,3]	0,3 [0,2÷0,3]	p _{с-А,В} < 0,001
Объем геля (мл) на 21-е сутки после создания модели, (Ме [25÷75%])	0,72 [0,64÷0,78]	0,3 [0,2÷0,3]	0,3 [0,2÷0,3]	p _{с-А,В} < 0,001

Примечание: * – Манн-Уитни U-тест в сравнении с контрольной группой.

ции выявило достоверные различия между контрольной группой и группами животных с моделированием состояния анального недержания (табл. 1). По результатам измерения видно, что животные в группах с моделированием анальной инконтиненции не удерживают стартовый объем геля в прямой кишке, что свидетельствует о развитии у них искомой патологии.

При оценке удерживающего объема прямой кишки через 3 недели после клеточной аутотрансплантации выявлены достоверные различия (p < 0,005, Манн-Уитни U-тест) между группами, где проводилось лечение анального недержания (группы А₁, А₂, А₃, В₁, В₂, В₃) с контрольными группами (А₄, В₄), где лечение методом клеточной аутотрансплантации не выполнялось (табл. 2).

При этом межгрупповых достоверных различий при оценке объема удерживания геля в прямой кишке среди пролеченных животных (независимо от вида клеточного материала) не наблюдалось (p > 0,005, Манн-Уитни U-тест).

Таблица 2. Показатели удерживающего объема прямой кишки в группах сравнения

Подгруппы сравнения	Объем геля (мл) (Ме [25÷75%])	p (Манн-Уитни Uтест)
А ₁ , n = 8	0,68 [0,62÷0,70]	p _{А₄-А₁, А₂, А₃} < 0,005
А ₂ , n = 8	0,60 [0,58÷0,64]	p _{В₄-В₁, В₂, В₃} < 0,005
А ₃ , n = 8	0,62 [0,60÷0,64]	p _{А₁-А₂} > 0,005
А ₄ , n = 8	0,35 [0,2÷0,4]	p _{А₁-А₃} > 0,005
В ₁ , n = 8	0,64 [0,62÷0,66]	p _{А₂-А₃} > 0,005
В ₂ , n = 8	0,58 [0,54÷0,62]	p _{В₁-В₂} > 0,005
В ₃ , n = 8	0,60 [0,56÷0,64]	p _{В₁-В₃} > 0,005
В ₄ , n = 8	0,3 [0,2÷0,3]	p _{В₂-В₃} > 0,005

Таким образом, можно отметить, что использование стволовых и гладкомышечных клеток при лечении анальной инконтиненции путём инъекционной аутотрансплантации в стенку прямой кишки сопровождается восстановлением функции сфинктерного аппарата прямой кишки.

Выводы

1. Техническим результатом проведенных исследований является создание приближенной к клини-

ческим условиям экспериментальной модели анальной инконтиненции.

2. Применение клеточной суспензии мезенхимальных стволовых клеток и гладкомышечных клеток при лечении анального недержания в эксперименте позволяет восстановить замыкательную функцию сфинктерного аппарата прямой кишки.

3. Результаты лечения калового недержания путем инъекционной трансплантации клеточной суспензии у экспериментальных животных не зависят от вида используемого клеточного материала.

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.

Поступила 12.05.2016 г.