

С.В. ШАХРАЙ, Ю.М. ГАИН, М.Ю. ГАИН

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ПЕРВЫЙ
КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТУРЫ
АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ
ТКАНИ В КОМПЛЕКСНОМ ХИРУРГИЧЕСКОМ
ЛЕЧЕНИИ ЭКСТРА- И ЧРЕЗСФИНКТЕРНЫХ СВИЩЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ**

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск,
Республика Беларусь

Цель. Разработать технологию малоинвазивного лечения транс- и экстрасфинктерных свищей прямой кишки с использованием излучения полупроводникового лазера и трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

Материал и методы. В эксперименте разработан способ моделирования хронического парапроктита. Изучены морфологические изменения параректальных тканей при комплексном использовании для лечения ректальных свищей лазерного излучения с длиной волны 1560 нм и аутологичных стволовых клеток из жировой ткани. Разработанный малоинвазивный способ хирургического лечения высоких свищей прямой кишки применен у 10 пациентов.

Результаты. Разработанная технология включает предтрансплантационный этап (забор биологического материала, выделение, культивирование, пролиферацию и дифференцировку аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека в фибробластном направлении с селекцией культуры стволовых клеток до 500 тысяч единиц в 1 мл), и хирургический этап, включающий деконтаминацию свищевого хода лазерным излучением длиной волны 1560 нм, ушивание внутреннего отверстия свища прямой кишки и трансплантацию культуры мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в свищевой ход и парафистулярное пространство.

В эксперименте получены результаты, свидетельствующие о высокой эффективности предлагаемой технологии с быстрым фиброзным замещением просвета свища и редукцией воспалительного процесса в этой зоне и парафистулярных тканях, обусловленных дифференциацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в клеточные элементы соединительно-тканного ряда, продукцией ими биологически активных факторов, индуцирующих регенерацию и способствующих ускоренной организации внеклеточного матрикса.

Установлено, что использование у пациентов с высокими свищами прямой кишки технологии аутоотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани, дифференцированных в фибробластном направлении, является эффективным комплексным методом их лечения.

Заключение. Первый опыт клинического применения разработанной технологии показал, что ее использование способствует повышению эффективности хирургического лечения свищей прямой кишки и расширению сферы применения клеточных технологий в практическом здравоохранении.

Ключевые слова: хронический парапроктит, свищи прямой кишки, мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, клеточная трансплантация

Objectives. To develop the technology of minimally invasive treatment of trans- and extra-sphincter rectum fistulas with the use of semi-conductor laser radiation and transplantation of autological adipose tissue mesenchymal stem cells.

Methods. The way of chronic paraproctitis modeling has been developed in experiment. Morphological changes of pararectal tissue at complex use of the laser radiation with the length of a wave 1056 nanometers and autological adipose tissue mesenchymal stem cells to treat rectum fistulas have been studied. The worked out minimally invasive method of surgical treatment of high rectum fistulas has been applied in 10 patients.

Results. The designed technology includes the pretransplantation stage (biological material intake, extraction, cultivating, proliferation, differentiation of the autological adipose tissue mesenchymal stem cells in the fibroblast direction with the culture selection of stem cells up to 500 thousands units in 1 ml), and the surgical stage with decontamination of the fistulous channel by the laser radiation with wave length 1560 nm, with suturing the internal opening of rectum fistula and transplantation of mesenchymal stem cells culture from adipose tissue in the fistula channel and parafistula space.

In experiment the results have been obtained testifying to high efficacy of the suggested technology with quick fibrous replacement of the fistula lumen and reduction of the inflammatory process in this zone and in parafistula tissues caused by autological mesenchymal stem cells differentiation in the cellular elements of the connective-fibrous layer, their production of biologically active factors that induce regeneration and promote the accelerated organization of the extracellular matrix.

It has been established that technology application in patients with high rectum fistulas of autotransplantation

of adipose tissue mesenchymal stem cells differentiated in the fibroblast direction is an effective complex method of their treatment

Conclusions. The first experience of clinical application of the developed technology allows saying that its practical use promotes efficacy increase of surgical treatment as well as expansion of the application sphere of cellular technologies in practical public health services.

Keywords: chronic paraproctitis, rectum fistulas, adipose tissue mesenchymal stem cells, cellular transplantation

Novosti Khirurgii. 2012; Vol 20 (6): 60-69

Experimental justification and first clinical experience of transplantation of culture of autological adipose tissue mesenchymal stem cells in complex surgical treatment of extra- and trans-sphincter rectum fistulas

S.V. Shakhrai, Yu.M. Gain, M.Yu. Gain

Введение

Аноректальные свищи (хронический парапроктит) — одно из наиболее распространенных заболеваний прямой кишки доброкачественной этиологии. По литературным данным, они составляют от 12 до 31% от общего количества оперируемой в специализированных проктологических отделениях патологии [1, 2, 3].

Тактика лечения интрасфинктерных и низких чрезсфинктерных свищей проктологами разных стран в настоящее время является общепризнанной и сводится к иссечению свища в просвет кишки, что обеспечивает хорошие результаты с незначительным количеством осложнений и рецидивов. Более сложную тактическую задачу до сих пор представляет лечение высоких трансфинктерных и экстрасфинктерных свищей, которые встречаются в 7-26% случаев хронического парапроктита [1, 2, 4, 5, 6]. Частота послеоперационных рецидивов и осложнений после хирургического лечения высоких свищей прямой кишки продолжает оставаться достаточно высокой, достигая в отдельных случаях 46-52%. С учетом того, что более 70% пациентов с обозначенной проблемой являются лицами трудоспособного возраста, вопросы эффективного лечения хронического парапроктита несут на себе существенную социально-экономическую окраску.

Хирургическое вмешательство в том или ином объеме является сегодня самым радикальным способом лечения пациентов с парааноректальными свищами. К настоящему времени предложено около 100 методик оперативного лечения хронического парапроктита. Значимая часть научных исследований и публикаций посвящена проблеме лечения именно высоких ректальных свищей, при этом большое количество известных и новых методик хирургической коррекции аноректальных свищей свидетельствует о неудовлетворенности большинства хирургов результатами их лечения [1, 2, 4, 5, 6].

При высоких трансфинктерных и экстрасфинктерных ректальных свищах наиболее часто используются следующие виды вмешательств: иссечение свища с ушиванием его

культы в промежностной ране с задней дозированной сфинктеротомией; иссечение свища с ушиванием сфинктера; иссечение свища с проведением лигатуры; иссечение свища с пластическим перемещением слизистой оболочки или слизисто-мышечного лоскута; закрытие obturatorом внутреннего отверстия свища; введение в свищевой ход клеевых композитов.

Среди всех способов наиболее древним считается лигатурный метод. К его преимуществам относят низкую частоту рецидивов (12-17%) и техническую простоту исполнения. Вместе с тем, при этом сохраняется высокий риск развития послеоперационной инконтиненции (до 45%), а уровень послеоперационных гнойных осложнений достигает 10-12%. Немаловажным негативным фактором использования этой методики являются длительная реабилитация пациента с продолжительной потерей трудоспособности [1, 2, 6, 7]. Иссечение свища в сочетании с ушиванием сфинктера или пластикой анального канала обеспечивают не очень высокую частоту рецидивов (8-15%), однако несет в себе высокий риск формирования недостаточности анального сфинктера (до 35-40%). Частота гнойно-воспалительных осложнений при вмешательствах такого рода составляет 9-11% [1, 2, 6, 8, 9].

Несомненно, к перспективным методикам лечения следует отнести различные способы «пломбировки» свищевой ходы. Неоспоримыми преимуществами такого подхода являются: отсутствие травматического повреждения сфинктерного аппарата (и как следствие такого осложнения — развитие анальной инконтиненции), низкий уровень гнойно-воспалительных осложнений (1-2%), малая травматичность, простота выполнения, отсутствие необходимости стационарного лечения и короткие сроки временной нетрудоспособности. Однако анализ результатов практического использования существующих методик «пломбировки» свищевой ходы с использованием аллогенных и даже отдельных аутологичных материалов показывает, что их применение приводит к достаточно высокому уровню рецидивов заболевания — 45-60% [1, 2, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

В этой связи разработка и практическое внедрение в колопроктологическую практику новых эффективных малоинвазивных технологий лечения высоких ректальных свищей с низким уровнем возврата заболевания является актуальной медико-социальной задачей.

Цель работы: разработать технологию малоинвазивного лечения транс- и экстрасфинктерных свищей прямой кишки с использованием излучения полупроводникового лазера и трансплантации аутологических мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, в эксперименте оценить ее эффективность и внедрить в клиническую практику.

Материал и методы

Для моделирования хронического парапроктита использовали разработанную авторами методику (приоритетная справка на изобретение, выданная Национальным центром интеллектуальной собственности Республики Беларусь, № а20120733 от 12 мая 2012 года). После взвешивания лабораторных животных (белых рандомизированных крыс обоего пола массой $215,7 \pm 17,7$ г; $n=31$) под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчета 0,35 мл на 100 г веса) в пахово-бедренную область (отступив от анального отверстия 1-1,5 см) подкожно шприцем ввели микробно-каловую суспензию (из расчета 0,5 мл на 200 г веса животного). Последнюю готовили накануне эксперимента из содержимого прямой кишки животного (кала) путем разведения его в соотношении 1:4 физиологическим раствором поваренной соли и фильтрации через 5 слоев медицинской марли. При введении микробно-каловой взвеси в подкожную клетчатку вначале нагнетали воздух в объеме 1,0 мл и в сформированный воздушный пузырек медленно вводили инфекционный агент. Через 3-е суток в области введения формировался воспалительный инфильтрат $3,2 \pm 1,1$ см в диаметре, к 7-м суткам отмечалось его центральное размягчение с образованием в этой зоне подкожного гнойника со средними размерами $1,8 \pm 0,5$ см. Через 7 суток после начала эксперимента (после формирования подкожного абсцесса) под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчета 0,35 мл на 100 г веса) через просвет прямой кишки выше верхней границы анального жома хирургической иглой с протетой в нее синтетической плетеной нитью с высокой

фитильностью (капрон № 6) производили прокол стенки прямой кишки по направлению к околопрямокишечному гнойнику. Иглу проводили через просвет гнойника и выводили через кожу наружу. Вслед за иглой проводили и толстую хирургическую нить. Лигатуру нетуго завязывали над областью промежности хирургическим узлом, избыток ее иссекали. После этого животные находились в индивидуальных клетках для предотвращения выгрызания лигатур и нанесения дополнительных травм друг другу со свободным доступом к пище и воде. Через 2 недели после манипуляции у всех животных формировался точечный свищ на коже вблизи заднепроходного отверстия с умеренным гнойным отделяемым, который сообщался с гнойной полостью в околопрямокишечной клетчатке и просветом прямой кишки выше анального жома.

В экспериментальных условиях 21 животному под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-го раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-го раствора фентанила из расчета 0,35 мл на 100 г веса) после моделирования хронического парапроктита по описанной выше методике производили забор жировой ткани объемом 3,5-4 мл и в течение 14-20 дней осуществляли процесс сепарации и предтрансплантационной подготовки суспензии мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани (МСК ЖТ). Перед трансплантацией клеточной культуры производили однократную санацию свищевого хода лазерным излучением длиной волны 1560 нм. При этом, в просвет свища до внутреннего его отверстия проводили гибкий стекловолоконный лазерный световод с дистанционно-радиальным излучением толщиной оптической жилы 100 мкм. Под контролем пилотного лазера с красной индикацией производили наложение П-образного шва на внутреннее отверстие свищевого хода. Затем излучением мощностью 1 Вт в постоянном режиме эмиссии осуществляли обработку просвета свищевого хода при извлечении световода со скоростью 0,3 мм/сек, при этом контролировали прогрев ткани, который находился в диапазоне 45-49°C. В просвет свища и парафистулярную клетчатку инъекционно вводили подготовленную суспензию аутологических МСК ЖТ объемом до 0,7 мл ($1,5-2 \times 10^6$ МСК ЖТ в 1 мл). На одни сутки накладывали провизорный шов на кожу, герметизирующий ход свища.

В контрольную группу включены 10 животных с аналогичными исходными параметрами, которым в те же сроки моделировали высокий параректальный свищ, но санацию

его осуществляли путем трехкратного промывания полости свища 2–5 мл 0,05%-го раствора хлоргексидина биглюконата с помощью однограммового шприца и тонкой канюли из инъекционной иглы. Всех животных выводили из эксперимента на 7-е сутки после начала лечебных мероприятий однократным введением 3%-го тиопентала натрия (трехкратная разовая передозировка барбитурата).

Все экспериментальные исследования проводили в полном соответствии с современными принципами биоэтики, в том числе, «Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных» (принятой в г. Страсбурге 18 марта 1986 года) и «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).

Для оценки морфологических характеристики биоптаты области свища (тканевые блоки, включающие стенку прямой кишки с внутренним отверстием свища, параректальную клетчатку и участок кожи с наружным отверстием свища) экспериментальных животных фиксировали в формалине в течение 24 часов. После промывки в проточной воде биоптаты помещали в кассеты для приготовления парафиновых блоков. Методика заключения материала в парафин включала: проводку в спиртах возрастающей концентрации в течение 24 часов (четыре смены), помещение в ксилол на 1,5 часа (3 смены по 30 минут), ксилол-парафин на 40 минут, на заключительном этапе — помещение в парафин (первый — на 1 час 20 минут, второй — на 2 часа) и формирование парафиновых блоков. Далее из парафиновых блоков, содержащих фрагменты ткани, делали срезы толщиной 3–4 мкм, которые с целью депарафинизации и обезвоживания помещали в две смены ксилола, затем проводили по спиртам возрастающей концентрации, после чего промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином в течение 1 часа и 30 минут. Затем проводили промывку в проточной воде (2–3 минуты) и помещали срезы в эозин на 40 секунд. После промывки в спиртах и проведения в ксилолах (две смены по 20 минут, третья — в течение 1 часа) срезы заключали под покровное стекло с помощью бальзама. На светооптическом уровне при изучении гистологических препаратов с помощью микроскопа фирмы “Zeiss” (увеличение $\times 5$, $\times 10$, $\times 100$, $\times 200$) производили анализ морфологических изменений.

В клинический раздел исследования вклю-

чено 10 пациентов, оперированных в Минском городском центре амбулаторной и малоинвазивной хирургии на базе УЗ «11-я клиническая больница» в 2011–2012 гг.

Всем пациентам в период клинического отбора выполняли фистулографию и трансректальную эхолокацию с целью выявления параректальных гнойных затеков и уточнения характера фистулярного хода. На первом этапе клинических исследований отобраны пациенты с высокими ректальными свищами с простым (прямым, неразветвленным) ходом. Все пациенты выразили свое письменное информированное согласие на проведение лечения с использованием клеточной терапии. Пациентам в условиях операционной под местной инфльтрационной анестезией 0,5%-м раствором лидокаина объемом до 10 мл выполняли забор жировой подкожной ткани острым путем объемом около 10 мл по модифицированной нами методике (удостоверение на рационализаторское предложение «Способ забора тканевого материала для получения культуры мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани» № 12 от 25.11.2011 г., выданное Белорусской медицинской академией последиplomного образования). Жировую ткань (как в условиях эксперимента, так и в клинических наблюдениях) помещали в стерильную пробирку с транспортной средой. В лабораторных условиях ткань дважды промывали в фосфатном буферном растворе (ФБР), содержащем 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Затем ткань измельчали острым путем и инкубировали в течение 40–50 минут в 0,075%-м растворе коллагеназы I типа (“Sigma”, Германия) при 37°C и постоянном помешивании. Нейтрализацию активности фермента проводили равным объемом среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Образовавшуюся пленку из адипоцитов и супернатанта удаляли, а клеточный осадок, содержащий мезенхимальные стволовые клетки, ресуспензировали и дважды отмывали центрифугированием в ФБР/5% ФБС (1200 об./мин в течение 10 минут). Количественный выход жизнеспособных клеток определяли в камере Горяева. Осадок ресуспензировали в питательной среде DMEM (“Sigma”, США) с добавлением 10% ФБС, 2 mM L-глутамин, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и засевали в культуральные чашки диаметром 60 мм в концентрации 4×10^4 ядродержащих клеток на 1 см² поверхности культурального пластика. Для удаления неприкрепившихся клеток через 24 часа проводили замену питательной среды. Дальнейшую смену среды про-

изводили каждые четвертые сутки до получения концентрации мезенхимальных стволовых клеток 10^5 в 1 мл культуры.

Для отделения клеток от субстрата после образования в монослое (10-12 дней) использовали 0,25%-й раствор трипсина — ЭДТА. После разъединения клеток, их переводили в суспензию добавлением ростовой среды. Затем клетки осаждали центрифугированием при 1200 об./мин в течение 10 минут. Количественный выход жизнеспособных клеток определяли при их окраске 0,5%-м раствором трипанового синего и подсчете в камере Горяева. Дозу клеток для трансплантации доводили до 500 тыс./мл. Процесс сепарации и подготовки клеточной массы для трансплантации занимал от 14 до 20 дней.

В этот период за сутки до интрафистулярного введения клеточной суспензии пациентам производили однократную деконтаминацию свищевого хода лазерным излучением длиной волны 1560 нм. Процедуру выполняли под инфльтрационной парафистулярной анестезией раствором в следующей лекарственной комбинации: 100 мл готового раствора содержал 5 мл 0,5%-го раствора бупивакаина, 2 мл 4% раствора натрия бикарбоната, 93 мл 0,25%-го раствора лидокаина. К данной лекарственной комбинации добавляли 0,1%-й раствор адреналина в отношении 1:200000 (удостоверение на рационализаторское предложение «Лекарственная комбинация для местной анестезии при проведении малоинвазивных проктологических вмешательств» № 18 от 02.10.2012 г., выданное Белорусской медицинской академией последипломного образования). Под эхоскопическим трансректальным контролем в просвет свища до внутреннего его отверстия проводили гибкий стекловолоконный лазерный световод с дистанционно — радиальным излучением. Под контролем пилотного лазера с красной индикацией производили наложение кيسетного или П-образного шва на внутреннее отверстие свищевого хода. Затем излучением мощности 8 Вт в постоянном режиме эмиссии обрабатывали просвет свищевого хода при извлечении световода со скоростью 2 мм/сек. Через сутки при готовности клеточной культуры выполняли хирургическое вмешательство. За один час до операции с целью профилактики гнойных послеоперационных осложнений пациентам вводили цефатоксим 1 г в ретроректальное клетчаточное пространство совместно с лекарственной комбинацией, состоящей из 2 мл иммуномодулирующего препарата эрбисола и 10 мл 0,5% раствора лидокаина (Патент Республики Беларусь на

изобретение № 16223 «Способ профилактики гнойного послеоперационного раневого осложнения при выполнении проктологической операции»). Во время операции производили иссечение наружного отверстия и подкожной порции свища, а затем в просвет свища и парафистулярную клетчатку инъекционно вводили подготовленную суспензию аутологичных МСК ЖТ общим объемом суспензии до 3 мл. На одни сутки накладывали провизорный шов на кожу, герметизирующий ход свища.

Результаты лечения оценивали ежедневно в течение первой недели послеоперационного периода, затем еженедельно на протяжении шести месяцев после операции и ежемесячно в оставшиеся полгода. При этом основное внимание уделялось субъективной оценке пациентом болевых ощущений в покое и при дефекации. Оценивали также скорость заживления раневого дефекта, наличие местных гнойно-воспалительных изменений, кровотечений, развитие дизурических расстройств и нарушений функции замыкательного аппарата прямой кишки в послеоперационном периоде.

Степень интенсивности болевых ощущений оценивали по визуальной аналоговой шкале, которая представляет собой прямую линию длиной 10 см (100 мм). Начальная точка линии обозначает отсутствие боли — 0, затем идет слабая боль — 1-3 балла, умеренная — 4-6 баллов и интенсивная — 7-10 баллов. Пациенты самостоятельно отмечали на шкале уровень местной болевой реакции, давая ей субъективную оценку. Течение местного процесса в зоне воздействия оценивали визуально и пальпаторно.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением прикладного программного пакета “STATISTICA 6,0”. Были применены методы описательной статистики, данные представлены в формате «среднее значение (M) ± ошибка среднего (m)»

Результаты и обсуждение

В экспериментальных условиях через 72 часа после введения каловой суспензии у всех лабораторных животных в области введения формировался воспалительный инфильтрат $3,1 \pm 0,7$ см в диаметре, а еще через 4 суток — подкожный гнойник в центре инфильтрата. Только в 1 случае (4,5%) развился нелокализованный гнойно-некротический процесс (гнилостная флегмона) в области инвазии с быстрой гибелью животного от септического шока. Через 14 дней после второго этапа моделирования патологического процесса (про-

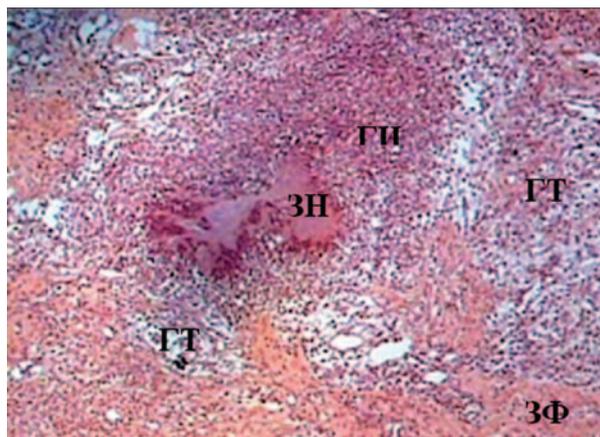


Рис. 1. Зональное разделение стенки свищевого хода подкожно-жировой клетчатки крысы через 17 суток после начала моделирования хронического парапроктита (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 100$). ЗН – зона некроза в области свищевого хода; ГИ – perifокальная гнойная инфильтрация; ГТ – грануляционная ткань с полиморфноядерно-клеточной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, макрофагами и фибробластами с примесью сегментоядерных нейтрофилов; ЗФ – зона фибрирования

ведения лигатуры через зону параректального гнойника) в области ее выхождения на кожу у всех животных однотипно формировался гнойный точечный свищ с умеренным отделяемым, проходящий через гнойную полость в подкожной клетчатке и сообщающийся с просветом прямой кишки выше анального жома.

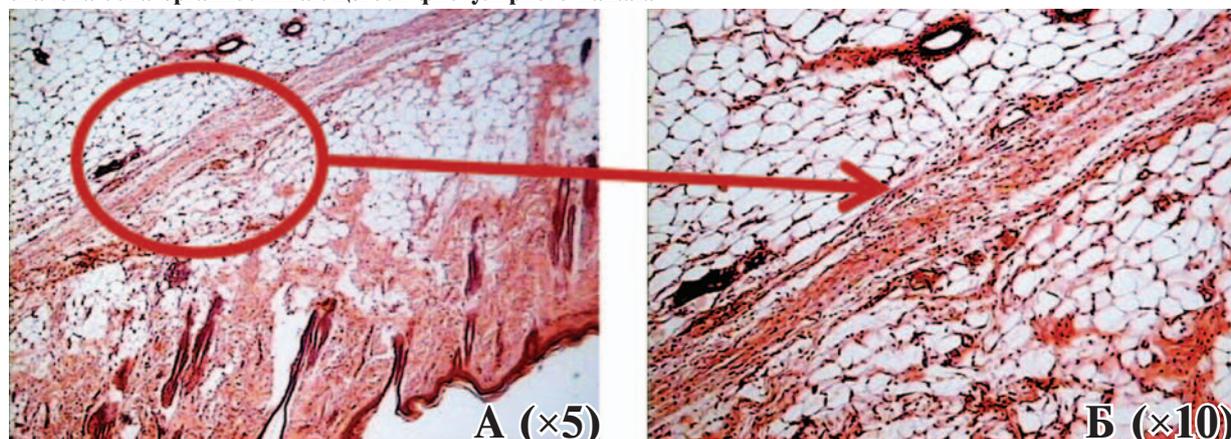
Проведенные гистологические исследования подтвердили наличие морфологических признаков экстрасфинктерного свища прямой кишки с формированием очага хронического гнойного воспаления в параректальной клетчатке (рис. 1). При этом во всех случаях центральная зона свищевого хода была представлена бесструктурными гомогенными не-

кротическими массами, окрашенными в голубовато-розовый цвет. Некротические массы были окружены зоной выраженной гнойной инфильтрацией, сформированной сегментоядерными нейтрофилами. Плотность гнойной инфильтрации уменьшалась по мере удаления от зоны свищевого хода и парафистулярного некроза.

По периферии некроза и перифокальной инфильтрации в наружных слоях свищевого хода было отмечено формирование грануляционной ткани, представленной отечной, густо васкуляризированной тканью с полиморфноядерно-клеточной инфильтрацией, среди которой, наряду с единичными нейтрофилами, определялись лимфоциты и макрофаги, отмечалась пролиферация фибробластов. В наружных отделах свищевого хода определялось уменьшение количества сосудов, снижение отека, уменьшение плотности воспалительной инфильтрации с отсутствием среди клеток воспаления сегментоядерных нейтрофилов и формирование фиброзной ткани. Обозначенные морфологические признаки указывали на развитие у всех животных хронического гнойного парапроктита с формированием экстрасфинктерного гнойного свища прямой кишки.

После комплексного использования лазерной деконтаминации свища и введения в его просвет МСК ЖТ отмечена достаточно быстрая инволюция местных воспалительных изменений в параректальной области. При этом отделяемое из области свища у большинства животных отмечено только на 2-е сутки (в виде выделения капелек мутного гнойно-геморрагического экссудата после снятия провизорного шва на коже). Только у 1-го животного (4,8%) данное отделяемое отмечалось до 3-х суток после трансплантации МСК ЖТ. У всех

Рис. 2. Морфологические изменения в области фистулярного канала вблизи кожных покровов после трансплантации МСК ЖТ (окраска – гематоксилином и эозином; увеличение $\times 5$ и $\times 10$). Кружком и стрелкой обозначена зона организовывающегося фистулярного канала



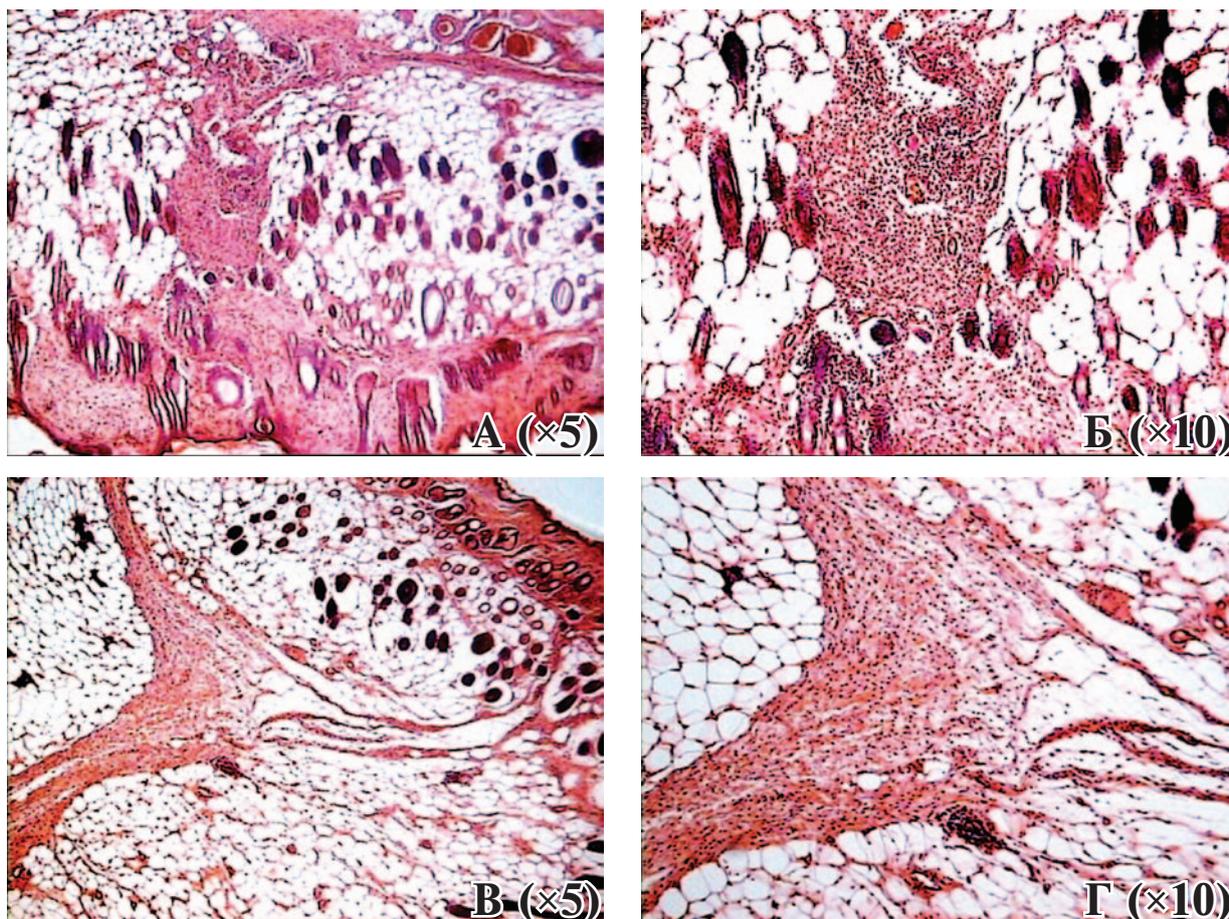


Рис. 3. Морфологические изменения в области фистулярного канала вблизи слизистой прямой кишки после трансплантации МСК ЖТ (окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 5$ и $\times 10$)

животных к 5-м суткам послеоперационного периода в области наружного свища определялся ограниченный струп, после отторжения которого на 6-7-е сутки четко визуализировалось закрытие свищевого хода.

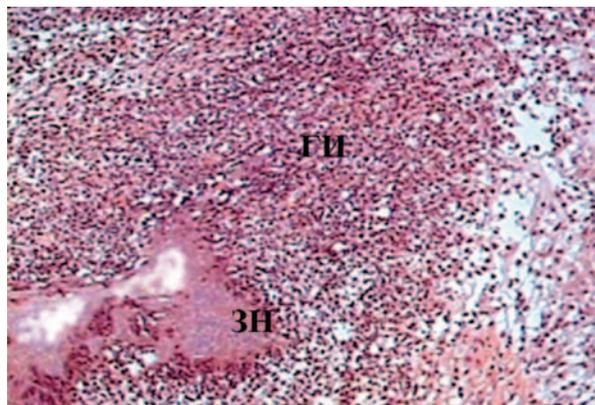
Морфологически в области кожи и подкожно-жировой клетчатки у всех животных отмечено полное закрытие просвета свищевого хода с очаговым фиброзом и скудной круглоклеточной инфильтрацией тканей, представленной лимфоцитами и единичными нейтрофилами (рис. 2).

В средних отделах свищевого хода в области подкожно-жировой клетчатки у всех животных выявлено очаговое формирование фиброзной ткани с воспалительной инфильтрацией различной степени выраженности. При этом, в большинстве наблюдений отмечена инволюция воспалительной инфильтрации. Только в 2 наблюдениях (9,6%) отмечена диффузная и очаговая парафистулярная гнойная инфильтрация без абсцедирования, в 4 наблюдениях (19,2%) имела место очаговая гнойная инфильтрация с формированием единичных микроабсцессов. Во всех случаях отмечена ор-

ганизация свищевого хода с формированием на его месте фиброзной или зрелой грануляционной ткани (рис. 3).

В контрольной серии у всех животных сохранялся просвет свищевого хода в подкожной клетчатке. У 90,5% животных в зоне свища

Рис. 4. Зона свищевого хода с выраженной парафистулярной гнойной инфильтрацией с сохранением просвета свища и некротических масс в его просвете (окраска – гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$). ЗН – зона некроза в области свищевого хода; ГИ – перифокальная гнойная инфильтрация



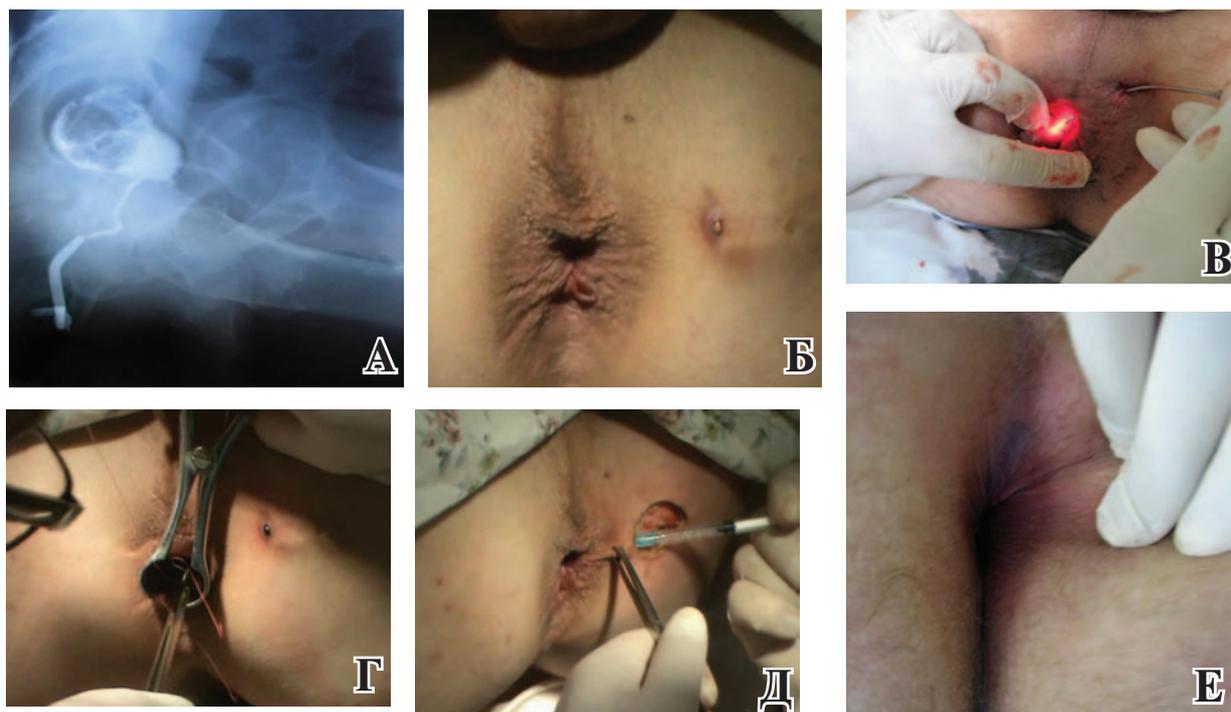


Рис. 5. Клиническое наблюдение – комплексное лечение пациента К. А – фистулограмма; Б – внешний вид экстрасфинктерного свища прямой кишки (гнойное отделяемое из наружного отверстия фистулярного канала); В – в свищ введен световод (подсвета внутреннего отверстия свища прямой кишки с помощью пилотного гелий-неонового лазера); Г – внутренне отверстие свища ушито П-образным швом после деконтаминации полости свища лазерным лучом с длиной волны 1560 нм; Д – полупроводниковым лазером с длиной волны 980 нм иссечена кожно-подкожная часть свища, в надсфинктерную часть свища вводится суспензия МСК ЖТ; Е – внешний вид перипанальной области через 1 год после операции (полное заживление свища)

выявлена некротическая ткань, у 81% – выраженная и умеренно диффузная и очаговая гнойная инфильтрация с формированием в 66,7% одиночных и множественных микроабсцессов (рис. 4).

В клинических условиях за период с начала 2011 года по июнь 2012 года по комплексной методике с использованием лазерной обработки свища и трансплантации аутологичных МСК ЖТ авторами настоящего сообщения оперировано 10 пациентов. Из них шесть мужчин и четыре женщины в возрастном промежутке от 26 до 55 лет. Лечение проводили в условиях хирургического отделения с краткосрочным пребыванием УЗ «11-я клиническая больница» г. Минска. Срок госпитализации у всех пациентов составил $2,0 \pm 0,4$ койко-дня. В послеоперационном периоде все пациенты получали одинаковую местную противовоспалительную терапию в виде ректальных свечей «Ультрапрокт» дважды в сутки в течение 10 дней, мазевые аппликации на зону раневого дефекта с мазью «Левомеколь», общую флеботропную терапию препаратом «Флебодиа 600» в течение 14 дней.

У каждого пролеченного пациента оцени-

вали длительность операции, продолжительность стационарного пребывания, амбулаторного периода лечения и общее время нетрудоспособности (таблица).

У всех без исключения пациентов уровень болевого синдрома в первые сутки находился в категории «слабые боли», что не требовало применения инъекционных анальгетиков. В период последующего наблюдения отмечена незначительная и кратковременная болевая реакция местного характера, которая была

Таблица
Результаты послеоперационного мониторинга ($M \pm m$)

Анализируемые показатели	Группа пациентов (n=10)
Длительность операции (мин.)	$15 \pm 2,7$
Продолжительность стационарного периода (койко/день)	$2,0 \pm 0,4$
Общая продолжительность нетрудоспособности (дни)	$10,2 \pm 1,7$
Интенсивность болевого синдрома первые сутки (баллы)	$1,5 \pm 0,5$

связана с наличием раневого дефекта кожи и клетчатки в зоне иссечения подкожной порции свища. При этом сроки полного заживления промежностной раны варьировали от 14 суток до 4 недель (в среднем $3,5 \pm 1,2$ недели). У всех пациентов в течение раннего послеоперационного периода и на протяжении всего времени наблюдения отсутствовала системная воспалительная реакция, не зарегистрировано ни одного гнойного осложнения местного характера, отсутствовали признаки нарушения функции замыкательного аппарата прямой кишки и дизурия. В период динамического интервального наблюдения через 3 и 6 месяцев в зоне вмешательства у всех пациентов отмечались пальпаторные признаки незначительных рубцовых изменений кожи и клетчатки, во всех случаях болевые ощущения отсутствовали. Контрольный осмотр через год не выявил рецидива заболевания в группе наблюдаемых пациентов (рис. 5).

Выводы

1. Впервые в Республике Беларусь и странах Восточной Европы разработана и внедрена в клиническую практику комплексная технология хирургического лечения экстра- и трансфинктерных свищей прямой кишки с использованием лазерного излучения длиной волны 1560 нм и клеточной аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани.

2. Разработанная технология включает предтрансплантационный этап (забор биологического материала, выделение, культивирование, пролиферацию и дифференцировку аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека в фибробластном направлении с селекцией культуры стволовых клеток до 500 тысяч единиц в 1 мл), и собственно хирургический этап, включающий деконтаминацию свищевого хода лазерным излучением длиной волны 1560 нм, ушивание внутреннего отверстия свища прямой кишки и трансплантацию культуры мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани в свищевой ход и парафистулярное пространство.

3. В эксперименте на лабораторных животных получены результаты, свидетельствующие о высокой эффективности предлагаемой технологии с быстрым фиброзным замещением просвета свища и редукцией воспалительного процесса в этой зоне и парафистулярных тканях, обусловленных дифференциацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в клеточные элементы соединительно-тканного

ряда, продукцией ими биологически активных факторов, индуцирующих регенерацию и способствующих ускоренной организации внеклеточного матрикса.

4. Использование у пациентов с высокими свищами прямой кишки технологии ауто-трансплантации мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани, дифференцированных в фибробластном направлении, является эффективным комплексным методом их лечения. Первый опыт клинического применения разработанной технологии позволяет говорить о том, что ее практическое использование будет способствовать повышению эффективности хирургического лечения, расширению сферы применения клеточных технологий в практическом здравоохранении, поддержанию оптимального качества жизни пациентов в послеоперационном периоде.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bleier J. I. Current management of cryptoglandular fistula-in-ano / J. I. Bleier, H. Moloo // *World J Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, N 28. – P. 3286–91.
2. Dudukgian H. Why do we have so much trouble treating anal fistula? / H. Dudukgian, H. Abcarian // *World J Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, N 28. – P. 3292–96.
3. Воробьев Г. И. Основы колопроктологии / под ред. Г. И. Воробьева. – М. : Мединформ. агентство, 2006. – С. 135–52.
4. For many high anal fistulas, lay open is still a good option / G. K. Atkin [et al.] // *Tech Coloproctol.* – 2011. – Vol. 156 N 2. – P. 143–50.
5. El-Tawil A. Management of fistula-in-ano: an introduction / A. El-Tawil // *World J Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, N 28. – P. 3271.
6. Malik A. I. Surgical management of anal fistulae: a systematic review / A. I. Malik, R. L. Nelson // *Colorectal Dis.* – 2008. – Vol. 10, N 5. – P. 420–30.
7. A randomized, controlled trial of fibrin glue vs. conventional treatment for anal fistula / I. Lindsey [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2002. – Vol. 45, N 12. – P. 1608–15.
8. Jacob T. J. Surgical intervention for anorectal fistula / T. J. Jacob, B. Perakath, M. R. Keighley // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2010. – Vol. 12, N 5. – CD 006319.
9. Abbas M. A. Predictors of outcome for anal fistula surgery / M. A. Abbas, C. H. Jackson, P. I. Haigh // *Arch Surg.* – 2011. – Vol. 146, N 9. – P. 1011–16.
10. Efficacy of fibrin sealant in the management of complex anal fistula: a prospective trial / G. N. Buchanan [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2003. – Vol. 46. – P. 1167–74.
11. Treatment of complex anal fistulas with the collagen fistula plug / D. Christoforidis [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2008. – Vol. 51, N 10. – P. 1482–87.

12. Anal fistula plug and fibrin glue versus conventional treatment in repair of complex anal fistulas / W. Chung [et al.] // *Am J Surg.* – 2009. – Vol. 197, N 5. – P. 604–8.
13. Evaluation of a new synthetic plug in the treatment of anal fistulas: results of a pilot study / F. De la Portilla [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2011. – Vol. 54, N 11. – P. 1419–22.
14. Treatment of Transsphincteric Anal fistulas by Endorectal Advanceent Flap or Collagen Fistula Plug: A comparative study / D. Christoforidis [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2009. – Vol. 52, N 1. – P. 18–22.
15. Johnson E. K. Efficacy of anal fistula plug vs. fibrin glue in closure of anorectal fistulas / E. K. Johnson, J. U. Gaw, D. N. Armstrong // *Dis Colon Rectum.* – 2006. – Vol. 49, N 3. – P. 371–76.
16. Collagen fistula plug for the treatment of anal fistulas / A. J. Ky [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2008. – Vol. 51, N 6. – P. 838–43.
17. Anal fistula plug is a valid alternative option for the

- treatment of complex anal fistula in the long term / L. Lenisa [et al.] // *Int J Colorectal Dis.* – 2010. – Vol. 25, N 12. – P. 1487–93.
18. Anal fistula plug: initial experience and outcomes / B. Safar [et al.] // *Dis Colon Rectum.* – 2009. – Vol. 52, N 2. – P. 248–52.

Адрес для корреспонденции

220013, Республика Беларусь,
Г. Минск, ул. П. Бровки, д. 3, корп. 3,
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
кафедра неотложной хирургии
с курсом амбулаторной хирургии,
тел. раб.: +37517 225-88-10,
тел. моб.: +375 29 627-89-84,
e-mail: s.shakhrai@mail.ru,
Шахрай Сергей Владимирович

Сведения об авторах

Шахрай С.В., к.м.н., доцент кафедры неотложной хирургии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Гаин Ю.М., д.м.н., профессор, проректор по научной работе, профессор кафедры неотложной

хирургии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Гаин М.Ю., аспирант кафедры неотложной хирургии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Поступила 2.10.2012 г.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

22–24 мая 2013 г., в г. Москве планируется проведение XV МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА ПО АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ

Для участия в конференции приглашаются анестезиологи-реаниматологи, акушеры-гинекологи, бактериологи/микробиологи, врачи общей практики, дерматовенерологи, инфекционисты, клинические фармакологи, кардиологи, неонатологи, оториноларингологи, педиатры, провизоры, реаниматологи, стоматологи, пульмонологи, терапевты, хирурги, урологи, эпидемиологи.

Срок подачи тезисов — до 1 апреля 2013 г.

E-mail: conference@antibiotic.ru

Дополнительная информация на сайте: **www.antibiotic.ru**