

ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ АНАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОСТНОМОЗГОВОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ

**А.Е. Машков¹, А.В. Куликов², В.И. Шумский¹, Ю.Н. Филюшкин¹, Д.А. Куликов², В.В. Слесарев¹, Д.А. Пыхтеев¹,
З.И. Полянская¹, Е.А. Ермилова¹, Д.А. Рогаткин¹, К.С. Литвинова¹**

¹ГУ Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ)

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

В статье представлен экспериментальный опыт создания модели анальной инконтиненции и способа ее компенсации на крысах. Описан также опыт лечения восьми больных с анальной недостаточностью путем костномозговой трансплантации. Метод осуществлялся путем ауто трансплантации костного мозга в параанальную область. В послеоперационном периоде на фоне проводимой реабилитации у семи больных отмечен положительный эффект, заключающийся в исчезновении зияния ануса, уменьшении выраженности или устранении каломазания, подтвержденный методами электромиографии, лазерной спектрофотометрии, УЗИ. Положительные результаты у наблюдавшихся пациентов говорят о перспективности метода.

Ключевые слова: детская хирургия, анальная недостаточность, мезенхимальные стволовые клетки.

EXPERIENCE OF ANAL INSUFFICIENCY TREATMENT USING MEDULLARY TRANSPLANTATION IN EXPERIMENT AND CLINIC

**A.E. Mashkov¹, A.V. Kulikov², V.I. Shumsky¹, Yu.N. Filyushkin¹, D.A. Kulikov², V.V. Slesarev¹, D.A. Pychtyev¹,
Z.I. Polyanskaya¹, E.A. Ermilova¹, D.A. Rogatkin¹, K.S. Litvinova¹**

¹M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI)

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino

The current study presents our experience in creating experimental rat model of anal incontinence and the mode of its compensation as well as in treatment of 8 patients with anal insufficiency using medullary grafts. This technique consisted of medullary autotransplantation into paraanal area. In postoperative period, against the background of rehabilitation carried out, a positive effect was noted in 7 patients including closing of anal hiatus, decreasing of pronouncement or complete elimination of fecal staining confirmed by electromyography, laser spectrometry, and ultrasonography. Positive outcome obtained in the patients observed is indicative of the method used as a very promising technique.

Key words: child surgery, anal insufficiency, mesenchymal stem cells.

В настоящее время стремительно развивается тканевая инженерия – создание из клеток композиций, предназначенных для восстановления тканей. Можно с уверенностью сказать, что будущее медицины невозможно представить без использования стволовой клетки.

Под понятием «стволовая клетка» (СК) понимают отдельные клетки или группы клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению и дифференцировке в специализированные ткани. Предполагается, что в здоровом организме стволо-

вые клетки обеспечивают естественное обновление тканей. Они являются универсальным строительным материалом, т.к. обладают чрезвычайно интересным и важным качеством – хоумингом, т.е. способностью при введении в организм находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию [2]. Известно, что трансплантация СК в разные органы приводит к формированию тканеспецифичных ростков.

Одним из доступных источников стволовых клеток является костный мозг. Современные биотехно-

логии позволяют создавать достаточную клеточную массу полученных из биоптатов костного мозга собственных мезенхимальных СК, корректировать процесс дифференцировки для формирования нужных клеточных линий, закреплять полученную массу специализированных клеток на биополимерной основе.

Мезенхимальные СК костного мозга обладают пластичной плюрипотентностью, которая сильно варьирует в зависимости от тканевого окружения органа реципиента. Такие клетки обладают способностью в ответ на действие соответствующих стимулов активно пролиферировать, поддерживать кроветворное микроокружение в течение длительного времени и дифференцировку в различные типы клеток мезодермального ряда [2].

Применение мезенхимальных СК имеет, на наш взгляд, широкие возможности в детской клинической практике, в частности, в хирургии детского возраста. Весьма целесообразно использование мезенхимальных СК для восстановления функции анатомически неполноценных или поврежденных мышечных структур после операций по поводу аноректальных пороков. У 30-40% детей после хирургических вмешательств по поводу врожденных пороков развития аноректальной области выявляется сфинктерная недостаточность различной степени выраженности [1]. Реабилитация таких больных – одна из самых трудных задач детской хирургии. Анальной инконтиненцией страдают от 1 до 13,3 на 1000 населения [3]. Целью нашего исследования явилась разработка способа лечения анальной недостаточности с применением костномозговой трансплантации в эксперименте и клинике.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Была создана экспериментальная модель недостаточности анального сфинктера у животных, а также разработана методика восстановления и улучшения его функции после повреждения путем применения клеточной технологии (аллотрансплантация костного мозга). Эксперимент проводился на базе Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

В доступной литературе с использованием расширенного поиска по различным базам данных нам не удалось найти подобной модели. Суть разработанной модели энкопреза состоит в том, что экспериментальным животным под наркозом проводили хирургическое удаление части прямой кишки (около 20%) вместе с мышцами сфинктерного аппарата. Через 24 часа крысам вводили аллогенные клетки, полученные из костного мозга животных той же линии «Wistar», что приводило к значительно более быстрой регенерации поврежденных тканей и восстановлению сфинктерной функции прямой кишки у оперированных животных по сравнению с крысами, которым трансплантацию

не проводили. Обе группы животных получали диету, полностью или в значительной степени исключающую дефекацию в течение 2 дней после операции, что значительно снижало риск инфицирования.

В экспериментах использовано 200 крыс линии «Wistar» разного возраста. Во всех группах животных проведены фотографические съемки места операции после нанесения травмы и на разных сроках после трансплантации (опыт, контроль), что позволяет отследить как количественные, так и качественные показатели заживления (рис. 1).

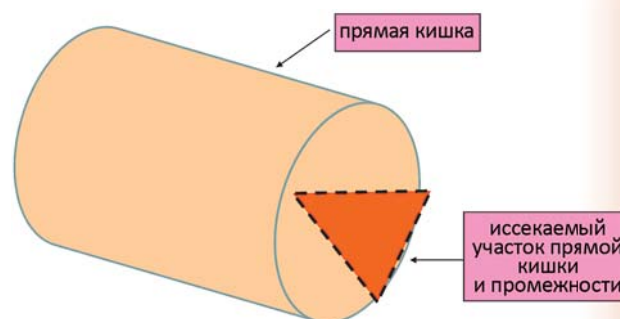


Рис. 1. Экспериментальная модель энкопреза

В гистологических исследованиях использовали 30 животных. В основной группе крыс после трансплантации клеток костного мозга отмечалось полное восстановление функции сфинктерного аппарата, практически без образования рубцовой ткани (рис. 2). По нашим данным, проведенным на большой выборке животных (более 100 особей), средняя продолжительность жизни крыс «Wistar» в нашем виварии составляет 31 месяц. Животные, у которых был хирургически инициирован энкопрез, а затем проведена его трансплантологическая компенсация, ни в одном из 20 случаев (группа, оставленная на выживание) не дали рецидива. На сегодня максимальное время наблюдение – 22 месяца после операции. Все элементы акта дефекации и эффект удержания каловых масс полностью восстановлены (рис. 3). С учетом того, что на начало эксперимента возраст крыс составил 3 месяца, можно сказать, что животные живут без рецидива на сроках, соизмеримых с естественной продолжительностью жизни.

Таким образом, разработана адекватная экспериментальная модель энкопреза и способ компенсации данного патологического состояния путем трансплантации клеток костного мозга в область сфинктерного аппарата.

В отделении детской хирургии МОНИКИ с 2008 по 2010 г. аутоотрансплантация костного мозга в параанальную область выполнена восьми больным (семи мальчикам и одной девочке), которые ранее перенесли аноректопластику по поводу высоких форм атрезии ануса и прямой кишки. Средний возраст детей составил 12 лет. У всех пациентов отмечалась недо-

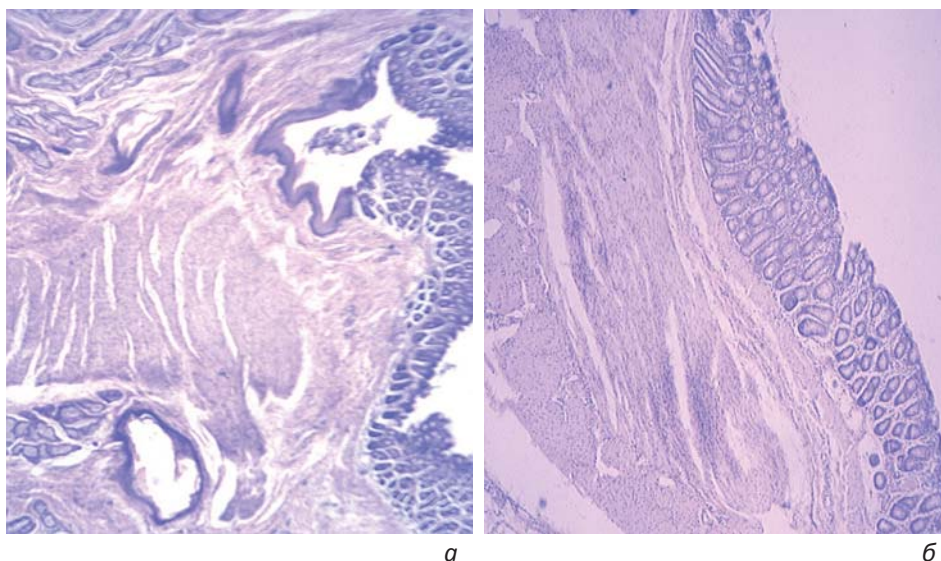


Рис. 2. Гистологическая картина: а – до трансплантации: периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация, дезорганизация тканей; б – на 21-е сутки после трансплантации аллогенного костного мозга: патологических изменений мышечной ткани не наблюдается

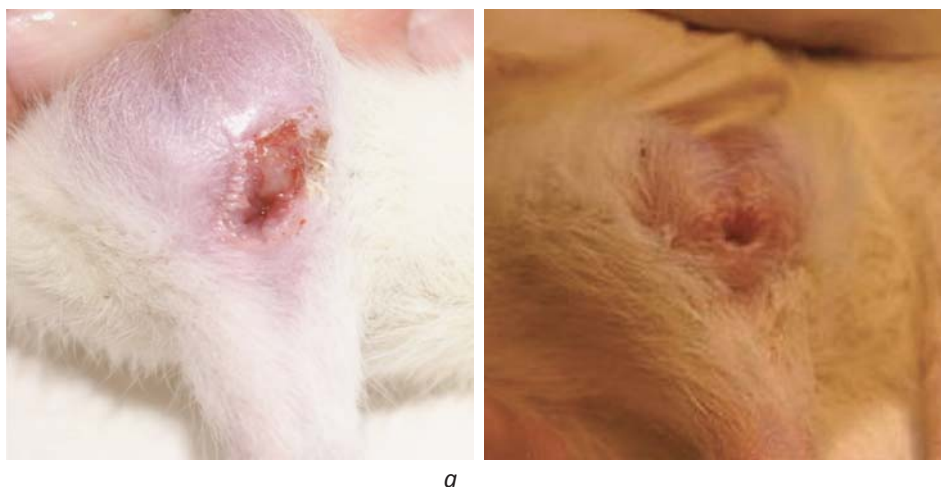


Рис. 3. Макроскопическая картина: а – до трансплантации: хорошо видны раневая поверхность и воспалительный процесс; б – на 6-е сутки после трансплантации аллогенного костного мозга: следы травматизации слабо заметны, следов воспаления нет

статочность анального сфинктера, клинически выражавшаяся недержанием кала, отсутствием позывов на дефекацию. Определение функционального состояния запирающего аппарата прямой кишки проводили с помощью визуального осмотра, пальцевой пробы (для исключения стеноза), компьютерной электромиографии. Во всех случаях анальное недержание соответствовало III степени (недержание газов, жидкого и плотного содержимого прямой кишки). Качество мышечных структур ануса выявляли с помощью компьютерной электромиографии. Показатели средней амплитуды миографического паттерна в покое регистрировались сниженными в среднем на 65% при волевом сокращении анального жома более чем на 67%. У двух детей отмечалось зияние ануса.

Методом лазерной спектрофотометрии тканей параанальной области выявлена высокая степень склерозирования тканей, что не позволяло надеяться на эффективность консервативной реабилитации и послужило основанием для трансплантации аутологичного костного мозга. Ауто трансплантация проводилась на фоне соматического благополучия. В клинических анализах крови и мочи и в биохимическом анализе крови сдвигов не наблюдалось.

Забор костного мозга выполняли путем пункции крыла подвздошной или пяточной костей. Костный мозг подвергался центрифугированию *ex tempore*. Сыворотка пунктата отделялась от клеточной массы. Количество клеточной массы, предназначенное для трансплантации, составляло от 10 до 40 мл в зависи-

мости от возраста пациента. Производилась трансплантация аутологичного костного мозга в мягкие ткани параанальной области путем инфильтрации костномозгового пунктата циркулярно вокруг ануса. Пересадок было от 2 до 6.

Метод рассчитан на способность стволовых, мезенхимальных и других незрелых клеток проявлять пролиферативную активность, дифференцируясь в клетки поврежденной ткани или ткани, востребованной организмом (в данном случае поперечно-полосатой мышцы анального сфинктера), а также являться инициаторами регенеративных процессов со стороны местных тканей. Необходимым условием регенерации сфинктера и восстановления его функции является постоянная электростимуляция анальной области флюктуаризирующими токами и лечебная гимнастика¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У семи детей после проведения пересадки аутологичного костного мозга в область мышечных структур ануса наблюдался положительный эффект, заключавшийся в устранении зияния ануса, уменьшении выраженности или исчезновении каломазания. У одного ребенка после повторных операций и в связи с грубой рубцовой деформацией промежности эффекта не было.

Первые результаты появлялись в среднем через 2 месяца. Дети старшего возраста отмечали появление определенной чувствительности в области ануса, повышение его тонуса. Каломазание при этом уменьшалось, появлялись несуществовавшие ранее слабые

позывы на дефекацию и возможность задержать ее на короткое время. Эти признаки начала работы мышечного аппарата анальной области понемногу нарастали, что коррелировало с постепенной положительной динамикой показателей ЭМГ неосфинктера. При этом на электромиограмме регистрировалось увеличение фоновой активности мышцы в 1,5-2,5 раза. Отчетливо увеличивалась произвольная мышечная активность.

Проводилось УЗИ мышечных структур запирающего аппарата УЗ-устройством Филипс U22I методом полипозиционного сканирования конвексным датчиком с частотой 5-8 мГц. Через 3-4 недели после пересадки, по данным УЗИ, в области аутоотрансплантации костного мозга регистрировалось появление эхо-структур, близких по плотности к мышечной ткани (рис. 4).

После пересадки костного мозга пациенты наблюдались в течение 2 лет. У семи детей отмечалась постепенная положительная динамика: увеличение времени удерживания, снижение интенсивности каломазания, а в ряде случаев (в трех наблюдениях) его исчезновение совсем. Чрезвычайно важно, что у детей прошел ряд психологических проблем. Больные находятся под наблюдением по настоящее время.

Данные, представленные в настоящей работе, позволяют считать, что метод лечения анальной инконтиненции, основанный на трансплантации костного мозга, довольно прост, эффективен, безопасен и перспективен. Способ аутоотрансплантации костного мозга для регенерации анального жома может найти применение в широкой клинической практике. Необходимы дальнейшие исследования в этой области и совершенствование данного метода.

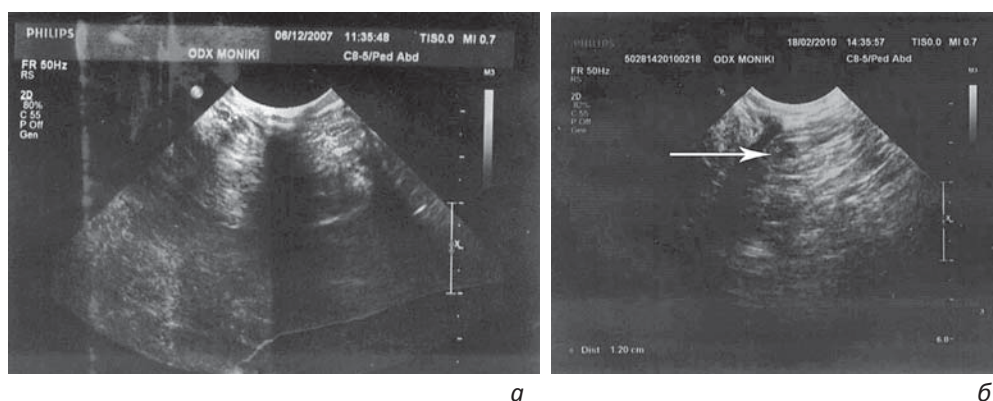


Рис. 4. Пример УЗ-картины анальной области до (а) и после (б) трансплантации мезенхимальных стволовых клеток

ЛИТЕРАТУРА

1. Лёнюшкин А.И. Хирургическая колопроктология детского возраста. М.: Медицина, 1999.
2. Fong E.L., Chan C.K., Goodman S.B. Stem cell homing in musculoskeletal injury. Division of Bioengineering, National

¹ Способ восстановления запирающего аппарата прямой кишки. Патент РФ № 2405573 от 19.02.2010 г.

- University of Singapore, 9 // Engineering Drive 1, Block EA. Singapore, 2004.
3. Johanson J.F., Lafferty J. Epidemiology of fecal incontinence: the silent affliction // Am. J. Gastroenterol. 1996. V.91, No.1. P.33-36.
4. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Mutilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. 1999. V.284. P.143-147.