

UDC 616-089.844

**Use of Automyelotherapy in the Treatment of Insufficiency of the Anal Sphincter  
(Experimental and Clinical Research)**<sup>1</sup>Alexander E. Mashkov<sup>2</sup>Vyacheslav V. Slesarev<sup>3</sup>Dmitry A. Kulikov<sup>4</sup>Yury N. Filyushkin<sup>5</sup>Alexander V. Kulikov<sup>6</sup>Vera I. Scherbina

<sup>1</sup>Moscow regional scientific-research clinical Institute, Russia  
129110, Moscow, str. Shchepkina, 61/2

Dr. (Medical), Professor

<sup>2</sup>Moscow regional scientific-research clinical Institute, Russia  
129110, Moscow, str. Shchepkina, 61/2

PhD (Medical), Senior researcher

E-mail: vyach@inbox.ru

<sup>3</sup>Moscow regional scientific-research clinical Institute, Russia  
129110, Moscow, str. Shchepkina, 61/2

PhD (Medical), Senior researcher

<sup>4</sup>Moscow regional scientific-research clinical Institute, Russia  
129110, Moscow, str. Shchepkina, 61/2

Junior researcher

<sup>5</sup>Institute of theoretical and experimental Biophysics RAS, Russia  
142290, Moscow region, Pushchino, str. Institutskaya, 3

Dr. (biological)

E-mail: kulikov@iteb.ru

<sup>6</sup>Moscow regional scientific-research clinical Institute, Russia  
129110, Moscow, str. Shchepkina, 61/2

PhD (Medical), Senior researcher

**Abstract.** The contribution presents experience of experimental model of anal incontinence creation, method of its compensation in rats, as well as the results of automyelotherapy in anal insufficiency in 8 patients, who underwent clinic anorectoplasty in 2011–2012.

**Keywords:** children's surgery; anal insufficiency; mesenchymal stem cells; bone marrow.

**Введение.** В настоящее время одним из перспективных направлений развития медицины и биотехнологии является тканевая инженерия — создание из клеток композиций, предназначенных для восстановления тканей. В основе данного метода лежит использование стволовых клеток (СК). Предполагается, что в здоровом организме стволовые клетки обеспечивают естественное обновление тканей. Такие клетки являются универсальным строительным материалом, обладая чрезвычайно интересным и важным качеством, так называемым хоумингом, т.е. способностью при введении СК в организм, находить зону повреждения и фиксироваться там, исполняя утраченную функцию [1]. Известна роль микроокружения на дифференцировку СК, то есть трансплантация СК в разные органы приводит к формированию тканеспецифичных ростков.

Зарубежными исследователями доказано, что трансплантация мезенхимальных СК не приводит к злокачественному перерождению или формированию эктопических тканей, происходящих из донорских СК [2].

Одним из доступных источников мезенхимальных стволовых клеток является костный мозг. Современные биотехнологии позволяют создавать достаточную клеточную массу полученных из биоптатов костного мозга собственных мезенхимальных СК, корректировать процесс дифференцировки для получения нужных клеточных линий.

Мезенхимальные СК костного мозга обладают пластичной плюрипотентностью, которая сильно варьирует в контексте органа реципиента. Такие клетки обладают способностью к активной пролиферации, поддержанию кроветворного микроокружения в течение длительного времени и дифференцировке в различные типы клеток мезодермального ряда в ответ на действие соответствующих стимулов [3].

На наш взгляд, применение мезенхимальных СК имеет широкие возможности в детской клинической практике, в частности, в хирургии детского возраста. 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 [4]. Реабилитация таких больных одна из самых трудных задач в детской хирургии.

Целью исследования являлась разработка способа лечения анальной недостаточности с применением аутомиелотерапии (костномозговой трансплантации) в эксперименте и клинике.

#### **Материалы и методы.**

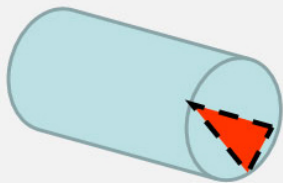
Для достижения поставленной цели была создана экспериментальная модель недостаточности анального сфинктера у животных, а также разработана методика восстановления и улучшения функции анального сфинктера у животных после его повреждения путем применения клеточной технологии (аллотрансплантация костного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

В доступной нам литературе с использованием расширенного поиска по различным базам данных 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 в сравнении с крысами, которым трансплантацию не проводили. Обе группы животных получали диету, исключающую полностью или в значительной степени 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. Для гистологических исследований использовали 30 животных. В основной группе крыс после трансплантации клеток костного мозга отмечалось полное восстановление функции сфинктерного аппарата практически без образования рубцовой ткани (рис).

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. Максимальное время наблюдения – 22 месяца после операции. Все элементы акта дефекации и эффект удержания каловых масс полностью восстановлены. 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.

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ И МЕТОДИКИ ЛЕЧЕНИЯ ЭНКОПРЕЗА

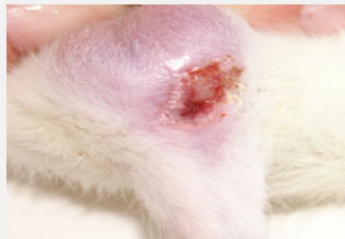
### Модель энкопреза



Контроль, без трансплантации.

Опыт, после трансплантации аллогенного костного мозга.

### Макроскопическая картина на 6 сутки



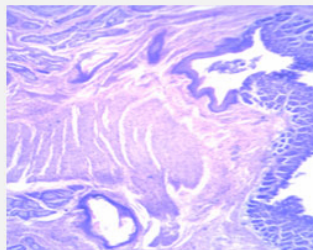
Хорошо видна раневая поверхность и воспалительный процесс.



Следы травматизации слабо заметны, следов воспаления нет.

### Гистологическая картина на 21 сутки

Периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация. Дезорганизация тканей.



Патологических изменений мышечной ткани не наблюдается.

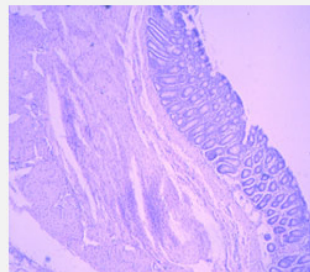


Рис. Модель и методика лечения энкопреза

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 2011 по 2012 гг. аутотрансплантация костного мозга в параанальную область выполнена у 8 больных, перенесших ранее аноректопластику по поводу высоких форм атрезии ануса и прямой кишки. Мальчиков было 7, девочек — 1. Средний возраст составил 12 лет. У всех пациентов отмечалась недостаточность анального сфинктера, клинически выражающаяся 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 (ЭМГ). Во всех случаях анальное недержание соответствовало III степени недостаточности сфинктера (недержание газов, жидкого и плотного содержимого прямой кишки).

При электромиографии показатели средней амплитуды миографического паттерна в покое регистрировались сниженными в среднем на 65 %, при волевом сокращении анального жома более, чем на 67 %. У 2-х детей отмечалось зияние ануса.

Методом лазерной спектроскопии тканей параанальной области выявлена высокая степень склерозирования тканей, что не позволяло надеяться на эффективность консервативной реабилитации и послужило основанием для применения трансплантации аутологичного костного мозга.

Аутомиелотерапия проводилась на фоне соматического благополучия. В клинических анализах крови и мочи, а также в биохимическом анализе крови сдвигов не наблюдалось.

Забор костного мозга производился путем пункции крыла подвздошной или пяточной костей.

Костный мозг подвергается центрифугированию *ex tempore*. Сыворотка пунктата отделялась от клеточной массы. Количество клеточной массы, предназначенной для трансплантации, составляло от 10,0 до 40,0 мл в зависимости от возраста пациента. Производилась трансплантация аутологичного костного мозга в мягкие ткани параанальной области путем инфильтрации костномозгового пунктата циркулярно вокруг ануса. Количество таких пересадок было в пределах от 2 до 6.

Метод рассчитан на способность стволовых, мезенхимальных и других незрелых клеток проявлять пролиферативную активность в направлении поврежденной ткани или ткани востребованной организмом (в данном случае поперечно-полосатой мышцы анального сфинктера), а также являются инициаторами регенеративных процессов со стороны местных тканей. Необходимым условием регенерации сфинктера и восстановления его функции является постоянная электростимуляция анальной области флюктуаризирующими токами и лечебная гимнастика. По данному методу получен патент на изобретение №2405573 «Способ восстановления запирающего аппарата прямой кишки» от 19.02.2010 г.

**Результаты и обсуждение.** У 7 детей после проведения пересадки аутологичного костного мозга в область мышечных структур ануса наблюдался положительный эффект, заключающийся в исчезновении зияния ануса, уменьшение выраженности или исчезновение каломазания. И только у одного ребенка после повторных операций и грубой рубцовой деформации промежности эффекта не было.

Первые результаты появлялись в среднем через 2 мес. При этом дети старшего возраста отмечали появление определенной чувствительности в области ануса, повышение его тонуса. Каломазание уменьшилось, появлялись несуществующие ранее, слабые позывы на дефекацию и возможность задержать дефекацию на короткое время. Эти признаки начала работы мышечного аппарата анальной области постепенно нарастали, что коррелировалось с постепенной положительной динамикой показателей ЭМГ неосфинктера. При электромиографии анального сфинктера регистрировалось увеличение как фоновой, так и произвольной биоэлектрической активности мышцы в 1,5–2,5 раза.

По данным УЗИ, через 3–4 недели после пересадки костного мозга в области аутоотрансплантации регистрировалось появление эхо-структур, близких по плотности к мышечной ткани.

Пациенты после пересадки костного мозга наблюдались в последующем в течение 2 лет. У всех детей отмечалось постепенная положительная динамика: увеличение времени удерживания, снижалась интенсивность каломазания, а в ряде случаев (у 3-х больных) исчезло совсем. Следует подчеркнуть, что у них прошел ряд психологических проблем, что мы считаем чрезвычайно важным. Больные находятся под наблюдением до настоящего времени.

**Выводы.** Метод лечения анальной недостаточности, основанный на аутоотрансплантации костного мозга, достаточно прост, эффективен, безопасен и перспективен. На основании проведенных исследований способ аутомиелотерапии для регенерации анального сфинктера может найти широкое применение в клинической практике. Необходимы дальнейшие исследования в этой области и совершенствование данного метода.

#### **Примечания:**

1. Fong E.L., Chan C.K., Goodman S.B. Stem cell homing in musculoskeletal injury. Division of Bioengineering, National University of Singapore, 9 // Engineering Drive 1, Block EA #03-12, Singapore, 2004.

2. Von Bahr L, Batsis I, Moll G et al. Analysis of Tissues Following Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Humans Indicate Limited Long-Term Engraftment and No Ectopic Tissue Formation. // Stem Cells. – 2012. - May 2. doi: 10.1002/stem.1118.

3. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. 1999. №284. P. 143–147.

4. Лёнюшкин А.И. Хирургическая колопроктология детского возраста. М., 1999.

УДК 616-089.844

**Применение аутомиелотерапии в лечении недостаточности анального сфинктера (экспериментальное и клиническое исследование)**<sup>1</sup> Александр Евгеньевич Машков<sup>2</sup> Вячеслав Викторович Слесарев<sup>3</sup> Дмитрий Александрович Куликов<sup>4</sup> Юрий Николаевич Филюшкин<sup>5</sup> Александр Владимирович Куликов<sup>6</sup> Вера Ильинична Щербина

<sup>1</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2

Доктор медицинских наук, профессор

<sup>2</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

E-mail: vyach@inbox.ru

<sup>3</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2

Кандидат медицинских наук, научный сотрудник

<sup>4</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2

Младший научный сотрудник

<sup>5</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3

доктор биологических наук

E-mail: kulikov@iteb.ru

<sup>6</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2

Кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник

**Аннотация.** Представлен опыт создания экспериментальной модели анальной инконтиненции, способа ее компенсации на крысах, а также результаты применения аутомиелотерапии при анальной недостаточности у 8 больных, перенесших аноректопластику, в клинике в 2011–2012 гг.

**Ключевые слова:** детская хирургия; анальная недостаточность; мезенхимальные стволовые клетки; костный мозг.