

Ю.М. Гаин, С.В. Шахрай, М.Ю. Гаин., Е.П.Киселева, С.Н. Рябцева

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТЕНКИ ПРЯМОЙ КИШКИ И ПАРАРЕКТАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИОННОГО ВВЕДЕНИЯ КУЛЬТУРЫ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

*В эксперименте на лабораторных животных оценены морфологические изменения со стороны различных слоев стенки прямой кишки и параректальных тканей при инфильтрационном введении в них культуры аутологичных мезенхимальных клеток из жировой ткани. Наибольший научный интерес представляли изменения в подслизистом слое прямой кишки, где введение стволовых клеток способствовало формированию «островков» миоцитов и клеток мышечного типа, гиперплазии мышечной пластины подслизистого слоя и всего мышечного слоя кишки. Предположительными механизмами миогенной трансформации в слоях прямой кишки могут быть как транскрипционная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток, выращенных *in vitro* и введенных извне, в миогенном направлении, так и паракринная стимуляция «экзогенными» клетками миогенной пролиферации и гиперплазии. Отмечено, что выявленные морфологические особенности тканевой реакции требуют дальнейшего научного изучения и обоснования практического применения в комплексе лечебных мероприятий при патологии аноректальной области.*

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани, морфологические изменения, фибробластоподобные клетки, миоциты.

J.M. Gain, S.V. Shachrai, M.J. Gain, E.P. Kiseleva, S.N. Riabtseva
MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE RECTUM WALL AND PARARECTAL TISSUES AFTER INJECTION INTRODUCTIONS OF CULTURE OF AUTOLOGICAL MESENCHYMAL STEM CELLS OF ADIPOSE TISSUE

The morphological changes of various wall layers of rectum and pararectal tissues after injection of cultures of autological mesenchymal stem cells of adipose tissue are estimated in experiment on laboratory animals. Changes in submucosa, where stem-cells injection contributes to formation of «islets» of myocytes and muscular type of cells and hyperplasia of muscular plate of submucosa and sum total muscular layer of a rectum, were the greatest scientific interest. Hypothetical mechanisms of myogenic transformation in rectal layers can be myogenic transdifferentiation of mesenchymal stem-cells, grown up «in vitro» and injected from the outside, and paracrine stimulation of myogenic proliferation and hyperplasia by «exogenic» cells. It is noticed, that revealed morphological features of tissue reaction demand the further scientific studying and substantiation of practical using in complex therapy of anorectal pathology.

Key words: mesenchymal stem-cells of adipose tissue, morphological changes, fibroblast-like cells, myocytes.

В настоящее время развитие клеточных биотехнологий является неотъемлемой частью VI технологического уклада цивилизации, формируя инновационную направленность выполняемых в этом ключе научных исследований. Продукты биотехнологий получают широкое применение в фундаментальных и прикладных научных исследованиях, в частности, в биологии и медицине.

К настоящему времени предложено и широко используется для восстановления дефектов мягких тканей различного происхождения огромное количество реконструктивно-восстановительных методик хирургического лечения с использованием аутологичных, алло- и ксеногенных тканевых трансплантаций [1, 2, 7].

Вместе с тем, сохраняющийся дефицит донорского материала для лечения пациентов методами органной и клеточной трансплантации, ограничение использования ксеногенных источников тканей по причине их более высокой антигенности, а также опасности заражения прионами и другими инфекциями, побуждают учёных всего мира разрабатывать и искать другие подходы для решения перечисленных проблем. В последние годы начало активно развиваться новое направление тканевой инженерии, предусматривающее применение технологий клеточной трансплантации [1, 6, 12, 13].

Одним из перспективных и широко обсуждаемых в доступной литературе направлений в разработке клеточных технологий является изучение и оценка возможности практического приме-

ния для лечения разнообразной патологии стволовых клеток (СК). Результаты экспериментальных исследований по их использованию показали, что эти клетки могут участвовать в восстановлении органов и тканей при различных вариантах их поражения. Таким образом, подходы к восстановлению тканей с использованием сил и средств регенеративной медицины могут стать существенным научным прорывом, эквивалентным по своей значимости открытию антибиотиков в двадцатом веке [8].

Весьма обнадеживающим исследователей и клиницистов направлением клеточной терапии стало использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые впервые были определены в 1970 году как колониеобразующие единицы фибробластоподобных клеток [9]. Позднее было установлено, что костный мозг, жировая ткань, кожа, пульпа зуба, печень, мозг и некоторые другие ткани содержат субпопуляцию клеток, которая способна не только к саморепликации во многих пассажах, но и обладает возможностью дифференцироваться в адипоциты, остеобласты, фибробласты, хондроциты и миоциты [4]. При этом МСК идентифицированы у большинства позвоночных животных, включая человека [10]. К настоящему времени определён полный список их поверхностных маркеров [11]. Несмотря на то, что МСК относятся к одним из наиболее изученных СК, дальнейшая их характеристика и изучение биологических свойств очень важны из-за возможности быстрого выделения из различных взрослых тканей с помощью малоинвазивных процедур, значимых лечебных свойств, потенциальной возможности использования в качестве пластического материала для регенерации различных органов и тканей [5, 7]. Одним из наименее изученных прикладных направлений применения МСК является их использование для лечения аноректальной патологии. Успешный первый клинический опыт применения МСК из жировой ткани (МСК ЖТ) для лечения свищей прямой кишки позволяет с оптимизмом смотреть на перспективы их лечебного применения в данной анатомической области [3].

Вместе с тем, требуют уточнения и дополнительного изучения морфологические изменения со стороны прямой кишки и параректальных тканей при инфильтрационном введении в них культуры аутологичных МСК ЖТ. Получение информации по данному вопросу позволяет оценить возможность и перспективы использования МСК в лечении заболеваний аноректальной области.

Цель исследования: в экспериментальных условиях оценить морфологические изменения со стороны различных слоёв стенки прямой кишки и параректальных тканей при инфильтрационном введении в них культуры аутологичных мезенхимальных клеток из жировой ткани и определить их значимость в плане разработки направлений лечения различных форм доброкачественной аноректальной патологии.

Материал и методы

Исследование проведено на 32 белых рандомизированных крысах мужского пола массой $223,4 \pm 19,1$ г. (основная группа). После взвешивания лабораторных животных под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчёта 0,35 мл на 100 г веса) производили эксцизионный забор жировой ткани объёмом 3,5-4 мл и в течение 14-20 дней осуществляли процесс сепарации и предтрансплантационной подготовки суспензии МСК ЖТ. При этом, после забора жировую ткань помещали в стерильную пробирку с транспортной средой. В лабораторных условиях её дважды промывали в фосфатном буферном растворе (ФБР), содержащем 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Затем ткань измельчали острым путём 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 объёмом среды DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Образовавшуюся плёнку из адипоцитов и супернатанта удаляли, а клеточный осадок, содержащий МСК, 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-глутамина, 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и засевали в культуральные чашки диаметром 60 мм в концентрации 4×10^4 ядросодержащих клеток на 1 см^2 поверхности культурального пластика. Для удаления неприкрепившихся клеток через 24 часа проводили замену питательной среды. Дальнейшую смену среды производили каждые четвёртые сутки до получения концентрации МСК 10^5 в 1 мл культуры. Для отделения клеток от субстрата после образования в монослое (10-12 дней) использовали 0,25%-ной 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 подсчёте в камере Горяева. Дозу клеток для трансплантации доводили до $1,5-2,0 \times 10^6$ /мл.

Всем животным основной группы под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчёта 0,35 мл на 100 г веса) на 3 часа по условному лимбу прямой кишки (по аналогии с человеком), отступая от ануса на 1,5 см, инъекционной иглой производили вкол со стороны кожи. Иглу проводили через параректальную ткань и стенку прямой кишки до подслизистого слоя. Присоединив шприц с культурой МСК ЖТ к канюле иглы, последнюю медленно извлекали в обратном направлении. При этом ткани инфильтрировали культурой МСК (на 2 мм обратной трассы вводили 0,1 мл культуры).

В контрольную группу включены 10 животных с аналогичными исходными параметрами, которым в день введения суспензии МСК ЖТ в основную группу в условиях аналогичного обезболивания производили идентичную пункцию параректальных тканей и стенки прямой кишки до подслизистого слоя. При выведении иглы (идентично, как и в основной группе) ткани инфильтрировали 0,9%-ным раствором поваренной соли в том же соотношении, как и в основной группе.

Всех животных выводили из эксперимента на 23-е сутки после операции однократным введением 3%-го тиопентала натрия (трёхкратная разовая передозировка барбитурата).

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 характеристик биоптаты (клиновидные тканевые блоки, включающие стенку прямой кишки, параректальную клетчатку и участок кожи в зоне введения культуры или физиологического раствора, а также тканевые блоки с контралатеральной стороны) 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 препара-

тов с помощью микроскопа фирмы «Zeiss» (увеличение $\times 5$, $\times 10$, $\times 100$, $\times 200$) производили анализ морфологических изменений.

Результаты и обсуждение

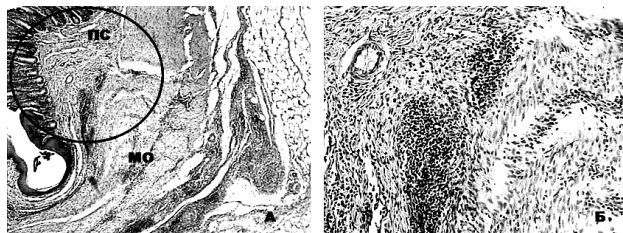
Гистологическое изучение тканей выявило различные варианты морфологических изменений в зоне введения клеточной суспензии. При этом отмечено достоверное морфологическое различие этих изменений в зоне имплантации (по сравнению с контралатеральной стороной) и группой контроля.

Определено два основных типа морфологических изменений слоёв прямой кишки и параректальных тканей в ответ на инъекционную имплантацию МСК ЖТ.

Первый тип изменений отмечен у доминирующего числа лабораторных животных (26 крыс или 81,3%). Он характеризовался специфическими изменениями тканей со стороны всех слоёв кишечной стенки. Так, в подслизистом слое дистальной части прямой кишки (ближе к анусу) в местах введения МСК ЖТ, наряду с воспалительной инфильтрацией, отмечался выраженный фиброз, в котором соотношение фибробластоподобных клеток и зрелых фиброцитов было приблизительно равным (рисунок 1).

В мышечном слое отмечено разделение его прослойками фиброзной ткани на «островки» и «полоски», которые были представлены гиперплазированными гладкомышечными клетками (рисунок 2). По сравнению с контралатеральной стороной гиперплазия гладкомышечных клеток достигала 10-25% их объёма. В отдельных участках мышечной ткани отмечены умеренные признаки воспалительной инфильтрации.

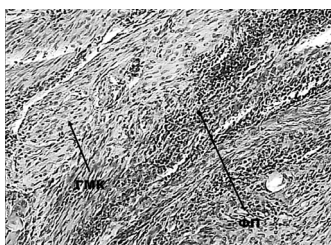
В проксимальных отделах прямой кишки в зоне подслизистого слоя морфологические изменения отличались от описанных выше. Соединительно-тканная прослойка подслизистого слоя была



ПС – подслизистый слой прямой кишки; МС – мышечный слой.

Рисунок 1 – Изменения в подслизистом слое дистальной части прямой кишки. А – увеличение $\times 50$, кружком обведена зона фиброза; Б – эта же зона при увеличении $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином.

представлена рыхло-волокнистой фиброзной тканью с тонкими волокнами. Отмечались оптически «пустые» участки между волокнами самой фиброзной ткани и мышечными клетками. В структуре клеточного состава подслизистого слоя преобладали фиброциты с веретеновидными, вытянутыми, гиперхромными ядрами. В зонах предшествующего введения МСК отмечалось более плотное соединение фиброзных волокон между собой и мышечными клетками подлежащего слоя. При этом большая часть клеток подслизистого слоя имела округлые или овальные гипохромные ядра и обильную эозинофильную цитоплазму. Данные клетки на светооптическом уровне не имели различий с расположенными рядом миоцитами мышечного слоя прямой кишки (рисунок 3). Также в подслизистом слое в зоне введения МСК отмечены островки гладкомышечных клеток (преимущественно, на границе подслизистого и мышечного слоёв) [рисунок 4]. В этих же зонах выявлена гиперплазия собственно мышечной пластинки подслизистого слоя кишки (рисунок



ГМК – гипертрофия мышечных клеток; ФП – фиброзная прослойка.

Рисунок 2 – Фиброзные прослойки в мышечном слое прямой кишки с гиперплазией гладкомышечных клеток (изменения обозначены стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

5). В тканях контралатеральной стороны выявленные изменения отсутствовали.

Второй тип изменений отмечен у 6 лабораторных животных (18,7%). Он характеризовался разрастанием в области анального сфинктера фиброзной ткани с умеренно выраженной воспалительной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, макрофагами и единичными сегментоядерными нейтрофилами. Наиболее выраженный фиброз отмечен в области дермы и подкожно-жировой клетчатки. При этом в фиброзной ткани преимущественно преобладали фибробластоподобные клетки с округлым или овальным гипохромным ядром и бледно-эозинофильной цитоплазмой. Фиброциты также были представлены в фиброзной ткани, но в меньшем количестве. Анатомическая структура сфинктера прямой кишки была нарушена – отмечалось разрушение целостности мышечного слоя сфинктера за счёт разрастания тонких фиброзных прослоек среди мышечных клеток в виде диффузной сети, что сопровождалось сдавлением и атрофией последних. В мышечной оболочке стенки кишки отмечалось расслоение мышечного слоя на «островки» или «полоски» за счёт разрастания фиброзной ткани между единичными клетками, а между группой мышечных клеток, что сопровождалось гиперплазией последних (рисунок 6). В подслизистом слое выявлены формирование желез апокринного типа, гиперплазия фиброзного слоя с преобладанием фибробластоподобных клеток над фиброцитами с наличием единичных мышечных клеток среди фиброзной основы подслизистого слоя кишки, которые были представлены вытянутыми клетками с гипохромным, овальным ядром и более эозинофильной цитоплазмой по сравнению с клетками фиброзной ткани. Во всех случаях в параректальной клетчатке и коже в зоне введения МСК ЖТ отмечались умеренно выраженные фиброзные изменения с утолщением дермы и локальная пролиферация адипоцитов.

Таким образом, в зоне введения аутологичных МСК ЖТ в стенке прямой кишки выявлены различные морфологические изменения. Наибольший научный интерес представляют изменения, происходящие в подслизистом слое прямой кишки, где введение СК способствует формированию «островков» миоцитов и клеток мышечного типа, а также феномен индуцированной гиперплазии мышечной пластинки подслизистого слоя и всего мышечного слоя кишки.

Выводы

1. Инъекционное введение культуры аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в стенку прямой кишки и параректальную клетчатку лабораторных животных способствует развитию в них разнонаправленных тканеспецифических изменений.



МЦ – миоциты.

Рисунок 3 – Фибробластоподобные клетки подслизистого слоя, схожие с миоцитами (обозначены стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

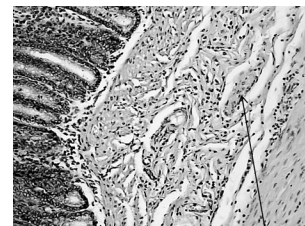


Рисунок 4 – «Островки» миоцитов в подслизистом слое прямой кишки на границе с мышечным слоем (обозначены стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$.

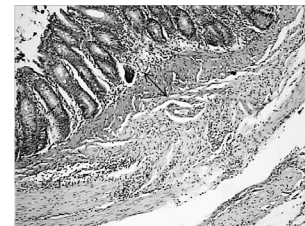


Рисунок 5 – Утолщение мышечной пластинки подслизистого слоя прямой кишки в зоне введения стволовых клеток (обозначено стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

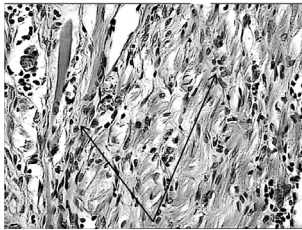


Рисунок 6 – Изменения мышечного слоя прямой кишки в зоне введения МСК ЖТ. Стелками обозначены островки фибробластоподобных клеток на фоне гиперплазированных гладкомышечных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 200.

2. Наибольший научный интерес представляют изменения, происходящие в подслизистом слое прямой кишки, где введение стволовых клеток способствует формированию «островков» миоцитов и клеток мышечного типа, а также феномен индуцированной гиперплазии мышечной пластины подслизистого слоя и всего мышечного слоя кишки.

3. Предположительными механизмами миогенной трансформации в слоях прямой кишки могут быть как трансдифференцировка мезенхимальных стволовых клеток,

выращенных *in vitro* и введенных *in vivo*, в миогенном направлении, так и паракринная стимуляция «экзогенными» клетками миогенной пролиферации и гиперплазии.

4. Выявленные морфологические особенности тканевой реакции требуют дальнейшего научного изучения и обоснования практического применения в комплексе лечебных мероприятий при патологии аноректальной области. Так, феномен пролиферации мышечных компонентов кишечной стенки и клеточной дифференциации в миогенном направлении может стать основой для создания клеточных технологий лечения нарушения функции замыкательного аппарата прямой кишки. А направление индуцирования фибропластической реакции в определенных слоях кишечной стенки и параректальных тканях может быть использовано для создания лечебных методик восстановления функции связочного аппарата прямой кишки, устранения патологической дислокации тканей (например, при ректоцеле или выпадении прямой кишки), стимуляции регенерации и восстановления целостности прямой кишки и параректальных тканей при обширных тканевых дефектах травматического, воспалительного и другого происхождения.

Литература

1. Лаврухин, Ю.Н. Методы лечения остаточных ран у обожженных / Ю.Н. Лаврухин, Е.В. Чеглаков, В.В. Арефьев // Вестн. неотлож. и восстановит. мед. – 2005. – Т. 6, № 2. – С.386-387.
2. Парамонов, Б.А. Ожоги: руководство для врачей / Б.А. Парамонов, Я.О. Порембский, В.Г. Яблонский. – СПб.: СпецЛит, 2000.- 480 с.
3. Шахрай, С.В. Экспериментальное обоснование и первый клинический опыт трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в комплексном хирургическом лечении экстра- и чрезфинктерных свищей прямой кишки / С.В. Шахрай, Ю.М. Гаин, М.Ю. Гаин // Новости хирургии.- 2012.- Том 20, № 6.- С.60-69.
4. Alhadlaq, A. Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics / A. Alhadlaq, J. Mao // Stem Cells Dev. – 2004. – Vol. 13. – P.436-448.
5. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow / Z. Guo [et al.] // Chin. Med. J. (Engl.). – 2001. – Vol. 114. – P.950-953.
6. Brey, E.M. Tissue engineering applied to reconstructive surgery / E.V. Brey, C. Patrick // Eng. Med. Biol. Mag. – 2000. – Vol. 19. – P.122.; Garfein, E.S. Clinical applications of tissue engineered constructs / E.S. Garfein, D. Orgill, J. Pribaz // Clin. Plast. Surg. – 2003. – Vol. 263. – P.485.
7. Craniofacial tissue engineering / J.J. Mao [et al.] // Dent. Res. Int. Press. – 2006. – Vol. 15. – P.499-526.
8. Davenport, R.J. What controls organ regeneration? / R.G. Davenport // Science. – 2005. – Vol. 309. – P.84.
9. Friedenstein, A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R. Chailakhjan, K. Lalykina // Cell Tissue Kinet. – 1970.- Vol. 3. – P.
10. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel / C.G. Willams [et al.] // Tissue Eng. – 2003. – Vol. 9. – P.679-688.
11. Pittenger, M.F. Mesenchymal stem cells and their potencial as cardiac therapeutics / M.F. Pittenger, B.J. Martin // Circ. Res. – 2004.- Vol. 95. – P.9-20.
12. The impact of biomolecular medicine and tissue engineering on plastic surgery in the 21st century / H.P. Lorenz [et al.] // Plast. Reconstr. Surg. – 2000. – Vol. 105. – P.24-67.
13. Use of breast reconstruction after mastectomy following the Women's health and Cancer Rights Act / A. Alderman [et al.] // JAMA.- 2006. – Vol. 295. – P.387-388.