

УДК 616.345-006.5-056.7-089

Семейный аденоматоз толстой кишки: хирургическое лечение с применением клеточной трансплантации

Ю.А. Шелыгин¹, А.М. Кузьминов¹, Д.В. Вышегородцев¹,
Л.Л. Капуллер¹, Г.Т. Сухих²

¹ ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии» Минздравсоцразвития РФ

² ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздравсоцразвития РФ

Familial adenomatosis coli: surgical treatment with cellular transplantation

Yu.A. Shelygin¹, A.M. Kuzminov¹, D.V. Vyshegorodtsev¹, L.L. Kapuller¹, G.T. Sukhikh²

¹ Federal State government-financed institution «State Scientific Center of Coloproctology» Ministry of Health and Social Development the Russian Federation

² Federal State government-financed institution «Kulakov Science Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology» Ministry of Health and Social Development the Russian Federation

Цель исследования. Создание реконструированной слизистой оболочки прямой кишки с целью улучшения результатов хирургического лечения семейного аденоматоза толстой кишки (САТК).

Материал и методы. 27 больным САТК проведено хирургическое лечение, включающее колэктомию, демукозацию прямой кишки и аллогенную клеточную трансплантацию фетальными клетками кишечного эпителия и мезенхимы различного происхождения с целью создания реконструированной слизистой оболочки. У 5 больных сформирован илеоректальный анастомоз, у 22 – тонкокишечные резервуары.

Результаты. За период от 4 до 12 нед у всех пациентов отмечено формирование слизистой оболочки в прямой кишке. При наблюдении от 1 года до 5 лет роста полипов не выявлено у 26 (96,3%) пациентов.

Выводы. Для создания реконструированной слизистой оболочки прямой кишки может успешно применяться клеточная трансплантация. Сохранение части прямой кишки после колэктомии и формиро-

Aim of investigation. To develop reconstructed mucosa of the rectum for improvement results of surgical treatment of *familial adenomatosis polyposis coli* (FAP).

Material and methods. Overall 27 patients with FAP underwent surgical treatment including colectomy, demucosation of rectum and allogenic transplantation of fetal intestinal epithelium cells and mesenchyma of various origin to develop reconstructed mucosa. In 5 patients the ileorectal anastomosis, in 22 – small-intestinal reservoirs were created.

Results. During period from 4 to 12 wks development of rectal mucosa was observed in all patients. At follow-up from 1 year to 5 years no proliferation of polyps was revealed in 26 (96,3%) patients.

Conclusions. Cell transplantation can successfully be applied for development of reconstructed rectal mucosa. Keeping part of rectum after colectomy and formation of smallintestinal reservoir allows to keep natural intestinal passage with good functional results.

Key words: familial adenomatosis polyposis coli, cell transplantation, mesenchyma, intestinal epithelium.

Вышегородцев Дмитрий Вячеславович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения общей колопроктологии ФГБУ «ГНЦ колопроктологии» Минздравсоцразвития РФ. Контактная информация: vyshegorodtsev@mail.ru; 123423, Москва, ул. Салыма-Адила, д. 2, ФГБУ «ГНЦ колопроктологии» Минздравсоцразвития РФ

Vyshegorodtsev Dmitry V. — MD, senior research associate, department of general coloproctology Federal State government-financed institution «State Scientific Center of Coloproctology» Ministry of Health and Social Development the Russian Federation. Contact information: vyshegorodtsev@mail.ru; 123423, Moscow, Salyam Adyla str., 2, Federal State government-financed institution «State Scientific Center of Coloproctology» Ministry of Health and Social Development the Russian Federation.

вание тонкокишечного резервуара позволяет сохранить естественный кишечный пассаж с хорошими функциональными результатами.

Ключевые слова: семейный аденоматоз толстой кишки, клеточная трансплантация, мезенхима, кишечный эпителий.

В настоящее время установлено, что в геноме человека различные мутации, возникающие в APC (Adenomatous Polyposis Coli)-гене, в большинстве случаев приводят к развитию *семейного аденоматоза толстой кишки* – САТК [3, 10, 13–15, 21, 22]. Данная патология характеризуется поражением толстой кишки множеством полипов с неизбежным развитием рака. Поэтому радикальное хирургическое лечение при этом заболевании предусматривает удаление всей толстой кишки [1, 4, 5].

Нередко оперативное вмешательство завершается формированием постоянной илеостомы на передней брюшной стенке и приводит больного к стойкой инвалидизации. Очевидно, операции, направленные только на спасение жизни больного без учета восстановления его социального статуса, не могут приносить полного удовлетворения хирургам и пациентам.

На сегодняшний день основным хирургическим методом сохранения естественного кишечного пассажа после удаления всей толстой кишки является создание тазовых тонкокишечных резервуаров с формированием илеоанального анастомоза. Мировой опыт выполнения подобных операций свидетельствует о том, что наряду с хорошими непосредственными и отдаленными результатами лечения сообщается и о значительном числе послеоперационных осложнений – до 48%. В отдаленные сроки наблюдения нередко развиваются такие поздние осложнения, как дилатация резервуара, резервуют и недостаточность анального сфинктера [2, 6, 12, 16–18, 20].

В связи с этим требуется разработка новых методов хирургического лечения больных САТК, позволяющих предотвратить развитие рака толстой кишки, сохранить естественный кишечный пассаж и добиться хороших функциональных результатов.

Материал и методы исследования

В ГНЦ колопроктологии разработан способ сохранения естественного кишечного пассажа при хирургическом лечении САТК. Проводится удаление толстой кишки с сохранением дистальной части прямой кишки. Частичная мобилизация прямой кишки позволяет исключить повреждение правого и левого подчревных сплетений, которые в полости таза связаны с тазовым сплетением.

Именно поэтому сохранение дистальной части прямой кишки вместе с указанными структурами является важным фактором для достижения хороших функциональных результатов. Кроме того, оставшийся отрезок кишки делает возможным анастомозирование тонкокишечного резервуара с прямой кишкой, а не с анальным каналом.

Для предотвращения роста полипов выполняется удаление *слизистой оболочки* (СО) прямой кишки (демукозация). Осуществляется клеточная трансплантация с целью формирования реконструированной СО, после чего восстанавливается непрерывность желудочно-кишечного тракта. При анализе данных научной литературы нам не встретилось аналогичных работ, хотя в последние годы опубликованы результаты ряда экспериментальных исследований, показывающих возможность получения полноценного кишечного сегмента методом тканевой инженерии [7–9, 11, 19].

Методика выполнения клеточной трансплантации с целью создания реконструированной слизистой оболочки прямой кишки разработана совместно с Научным центром акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова.

Для формирования реконструированной СО проводится аллотрансплантация в демукозированную прямую кишку фетальных клеток эпителиального происхождения и мезенхимы различного происхождения.

Суммарную культуру фетальных аллогенных соматических клеток кишечного эпителия и мезенхимы печеночного и костномозгового происхождения, обогащенную стволовыми и прогениторными предшественниками, получали от плодов человека 8–12 недель гестации. В качестве донорского использовался абортный материал, который поступал из лицензированных учреждений. Проводилось кариотипирование исходного биологического материала. В работе применялся только материал, прошедший тщательное тестирование на наличие различных вирусов и антител.

Для получения первичной культуры использовали ферментативную дезагрегацию ткани (0,025% раствор коллагеназы 1-го типа). Клетки культивировали на полной питательной среде DMEM/F12 (Gibco) – в соотношении 1:1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hy Clone, США), пенициллина/стрептомицина (Gibco) – 20 нг/мл, L-глутамин. Подсчет клеток в исходной суспензии и при последующих диссоциациях

клеточных агрегатов проводили в камере Горяева, а их жизнеспособность определяли стандартным тестом с трипановым синим. Срок культивирования составил 10–12 сут (3–4 пассажа) с последующей трансплантацией в демукозировавшую прямую кишку. Общее количество трансплантированных клеток $400\text{--}450 \times 10^6$. Жизнеспособность культур 85–90%.

Техника операции заключается в следующем. Мобилизация ободочной кишки и пересечение брыжейки осуществляются по общепринятым принципам. Тонкую кишку пересекают непосредственно у места перехода в слепую кишку. Затем с помощью сшивающего аппарата формируется J-образный тонкокишечный резервуар.

Со стороны промежности выполняется демукозация прямой кишки. Разработаны два варианта вмешательства. При первом варианте демукозацию проводят одновременно с удалением толстой кишки. Над зубчатой линией производят циркулярный разрез слизистой прямой кишки и при помощи электрокоагуляции осуществляют ее отделение на протяжении 3–4 см в проксимальном направлении. Далее через анальный канал в прямую кишку вводят булавовидный инструмент, на котором ее завязывают тесьмой и эвагинируют через анальный канал на промежность. При помощи электрокоагуляции, начиная от границы уже частично демукозированной кишки, выполняют дальнейшее отделение слизистой оболочки вместе с подслизистой основой (патент на изобретение № 2402983 «Способ лечения семейного аденоматоза толстой кишки»).

После того как слизистая отделена полностью, в мышечный слой прямой кишки инъекционным методом, начиная непосредственно от зубчатой линии, вводится клеточный трансплантат. Инъекции осуществляются в шахматном порядке таким образом, чтобы площадь участка инфильтрации демукозированной прямой кишки составляла около 2 см^2 . Затем прямую кишку отсекают у проксимальной границы введения клеточного материала на расстоянии 8–10 см от зубчатой линии. Культю кишки прошивают линейным сшивающим аппаратом и инвагинируют в полость таза. Со стороны промежности в культю вводят сшивающий аппарат и формируют резервуаро-ректальный анастомоз. Операция завершается формированием превентивной илеостомы (патент на изобретение № 2442543 «Способ сохранения естественного кишечного пассажа у больных семейным аденоматозом толстой кишки после колэктомии»).

Второй вариант вмешательства предусматривает демукозацию прямой кишки через 1,5–2 мес после первой операции — он выполняется только при отсутствии осложнений в зоне анастомоза. Трансанально производится циркулярный разрез СО прямой кишки сразу над зубчатой линией.

Дальнейшее отделение слизистой осуществляется с использованием технологий *трансанальной эндомикрохирургии* (ТЭМ). Через операционный ректоскоп при помощи аппарата «Ultracision Harmonic Scalpel» осуществляется отделение СО прямой кишки до линии анастомоза. После этого проводится этап клеточной трансплантации.

Спустя 14–15 дней после операции с целью стимуляции процессов формирования реконструированной слизистой демукозированной прямой кишки проводилось дополнительное эндоректальное введение фетальных клеток эпителиального происхождения (100 млн). Внутривенно вводили мезенхимальные клетки-предшественники гемопоэтического происхождения (100 млн). При помощи подкожных инъекций имплантировали комплекс биологически активных ростовых факторов фетального происхождения.

Результаты исследования и их обсуждение

Хирургические вмешательства с использованием технологий клеточной трансплантации выполнены у 27 больных САТК в возрасте от 17 до 40 лет. Мужчин было 12, женщин 15. У 22 пациентов после колэктомии, демукозации прямой кишки и клеточной трансплантации сформирован тазовый тонкокишечный резервуар, у 5 операция завершена формированием илеоректального анастомоза.

Все больные были детально информированы о характере своего заболевания, дали информированное согласие на участие в исследовании и применение у них клеточной трансплантации.

Из 27 пациентов послеоперационные осложнения отмечены у 4 (14,8%). У 2 из них в ближайшем послеоперационном периоде возникло кровотечение из демукозированной прямой кишки, что потребовало проведения только консервативных мероприятий (достигнут положительный эффект). У одной пациентки развилась перфорация острой язвы тощей кишки (выполнена релапаротомия). И еще в одном случае обнаружена недостаточность анастомоза между тонкокишечным резервуаром и демукозированной прямой кишкой, по поводу чего проводилось консервативное противовоспалительное лечение.

В сроки от 2 мес до 2,5 года петлевые илеостомы были закрыты и восстановлен естественный кишечный пассаж у 20 пациентов: у 4 сформирован илеоректальный анастомоз, у 16 — тонкокишечный резервуар. После закрытия илеостомы и включения тонкокишечного резервуара в кишечный пассаж ни у одного больного не отмечено поздних осложнений при наблюдении от 3 мес до 5 лет.

Прослежены 19 пациентов из 20. Как удалось установить, частота стула стабилизировалась в первые 6 мес после закрытия илеостомы. Если в



Рис. 1. Биоптат реконструированной слизистой оболочки прямой кишки. Через 4 нед после операции. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$



Рис. 2. Рентгенограмма прямой кишки и резервуара через 4 нед после операции (тугое наполнение контрастным веществом)

течение первых 3 мес она варьировала в широких пределах — от 4 до 15 раз в сутки, то к 6-му месяцу после операции у подавляющего числа больных с резервуарами составляла от 2 до 6 раз. Только у одного пациента с тонкокишечным резервуаром стул был до 15 раз в сутки. Несколько худшие результаты отмечены у 3 прослеженных больных с илеоректальным анастомозом: у 2 стул до 12 раз и у одного 6–8 раз в сутки. Необходимость в ночной дефекации в первые 3 мес отмечалась у 15 человек. Однако через 6 мес она наблюдалась только у 2 больных. Следует сказать, что этот показатель зависит от времени последнего приема



Рис. 3. Рентгенограмма прямой кишки и резервуара через 4 нед после операции (после удаления контрастного вещества)

пищи, и через 6 мес все пациенты вырабатывают свой индивидуальный режим питания, позволяющий избежать ночной дефекации. Спустя 6 мес после закрытия илеостомы никто не отмечал признаков недержания кишечного содержимого. Все пациенты социально адаптированы.

Для оценки процессов формирования реконструированной слизистой оболочки прямой кишки проводились эндоскопические и морфологические исследования.

Через 4 нед после операции при эндоскопии установлено: у 20 пациентов поверхность прямой кишки розовая, блестящая, без контактной ранимости и наложений фибрина. Местами уже прослеживается деформированный сосудистый рисунок. Эндоскопическая картина соответствует неизменной слизистой оболочке кишки.

При исследовании биоптатов определяется участок слизистой толстой кишки с деформированными расширенными криптами, содержащими избыточное количество крупных бокаловидных клеток, распространяющихся на поверхность слизистой. В собственной пластинке отек и небольшое количество лимфоцитов и плазмочитов. Капилляры и вены расширены (рис. 1).

У 7 больных островки слизистой оболочки чередовались с участками грануляционной ткани. Это потребовало дополнительного введения клеточного материала от 1 до 3 раз. Формирование реконструированной слизистой у этих пациентов отмечено спустя 8–12 нед после операции.

При рентгенологическом исследовании через 4 нед оставшиеся отделы прямой кишки имели

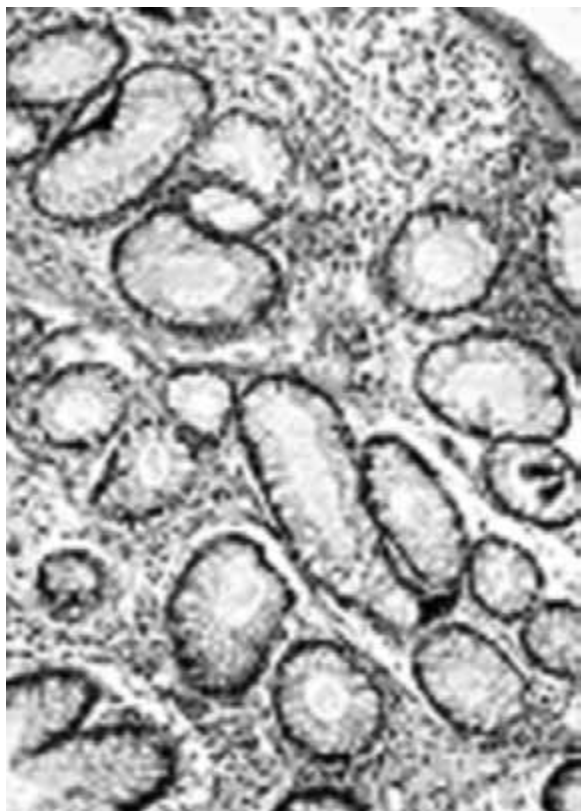


Рис. 4. Биоптат реконструированной слизистой оболочки прямой кишки. Через 4 года после операции. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

близкую к привычной форму, сохранена ампулярность. Отчетливо прослеживается ее резервуарная функция, эластичность стенок сохранена в полном объеме. Хорошо видны складки слизистой, характерные для прямой кишки. Эвакуаторная функция также сохранена (рис. 2 и 3).

Таким образом, у всех пациентов в достаточно короткие сроки обнаружено формирование реконструированной слизистой оболочки прямой кишки.

Большой интерес представляет состояние реконструированной слизистой прямой кишки в отдаленные сроки после клеточной трансплан-

тации. В период от 3 мес до 5 лет эндоскопический контроль осуществлен у всех 27 больных. Реконструкция СО отмечена во всех наблюдениях. При этом отчетливо прослеживается сосудистый рисунок, слизистая гладкая, блестящая, без контактной ранимости. При исследовании биоптатов в слизистой оболочке толстой кишки определяется деформация крипт и гиперплазия бокаловидных клеток. В собственной пластинке умеренная лимфоидная инфильтрация. Участков дисплазии эпителия не найдено (рис. 4). Роста полипов не выявлено у 26 (96,3%) человек. У одного пациента после выполнения отсроченной демукозациии при помощи технологий ТЭМ через 6 мес обнаружена тубулярная аденома в области резервуароректального анастомоза, что обусловлено неполным удалением слизистой в зоне скрепок анастомоза.

Выводы

Приведенные данные позволяют утверждать, что в хирургическом лечении больных САТК может успешно применяться клеточная трансплантация. Использование фетальных клеток кишечного эпителия и мезенхимы различного происхождения приводит к формированию реконструированной слизистой оболочки в демукозированной прямой кишке и устранению роста полипов. Это дает возможность сохранить дистальную часть прямой кишки и восстановить естественный кишечный пассаж по желудочно-кишечному тракту с сохранением эвакуаторной функции и функции анального держания.

По нашему мнению, предпочтительным является новый метод операции, включающий колэктомию, демукозацию прямой кишки, формирование J-образного тонкокишечного резервуара и наложение резервуароректального анастомоза. При отсутствии злокачественных новообразований прямой и ободочной кишки данный метод может стать операцией выбора в хирургическом лечении рассматриваемой категории больных.

Список литературы

1. Воробьев Г.И. Основы колопроктологии: Учебное пособие. — Ростов н/Д: «Феникс», 2001. — С. 320–332.
1. Vorob'yev G.I. Basics of coloproctology: Manual. — Rostov-on-Don: «Phoenix», 2001. — P. 320–332.
2. Barton J.G., Paden M.A., Lane M., Postier R.G. Comparison of postoperative outcomes in ulcerative colitis and familial polyposis patients after ileoanal pouch operations // *Am. J. Surg.* — 2001. — Vol. 182. — P. 616–620.
3. Behrends J., Jerchow B.A., Wurtele M. et al. Functional interaction of an axon homolog, conductin, with b-catenin, APC, and GSK3 // *Science*. — 1998. — Vol. 280. — P. 596–599.
4. Bulow S. Familial polyposis // *Dan. Med. Bull.* — 1987. — Vol. 34. — P. 1–15.
5. Bussey H.J.R., Evers A.A., Ritchie S.M., Thomson J.P.S. The rectum in adenomatous polyposis: The St-Mark's policy // *Br. J. Surg.* — 1985. — Vol. 72 (suppl.). — P. 29–31.
6. Campos F.G., Perez R.O., Imperiale A.R. et al. Surgical treatment of familial adenomatous polyposis: ileorectal anastomosis or restorative proctocolectomy? // *Arq. Gastroenterol.* — Vol. 46, N 4. — P. 994–999.
7. Choi R.S., Reigler M., Pothoulakis C. et al. Studies of brush border enzymes, basement membrane components, and electrophysiology of tissue-engineered neointestine // *J. Pediatr. Surg.* — 1998. — Vol. 33. — P. 994–999.
8. Grikscheit T.C. et al. Tissue-engineered colon exhibits function in vivo // *Surgery*. — 2002. — Vol. 32. — P. 200–204.
9. Grikscheit T.C., Vacanti J.P. Tissue-engineered stomach

- from autologous and syngeneic tissue // J. Surg. Res. — 2002. — Vol. 107. — P. 277–288.
10. Groden J., Thliveris A., Samowitz W. et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene // Cell. — 1991. — Vol. 66. — P. 589–600.
11. Kaihara S. et al. Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel // Transplantation. — 2000. — Vol. 69. — P. 1927–1932.
12. Kasraoui M., Cohen R., Nicholls J. Results of surgical of the pouch after failed restorative proctocolectomy // Dis. Colon. Rectum. — 2004. — Vol. 47. — P. 869–675.
13. Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K. et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21 // Science. — 1991. — Vol. 253. — P. 661–665.
14. Miyoshi Y., Ando H., Nagase H. et al. Germline mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 4452–4456.
15. Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y. et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients // Science. — 1991. — Vol. 253. — P. 665–669.
16. Oded Zmora, Jonathan E. Efron, Juan J. Nogueras et al. Reoperative abdominal and perineal surgery in ileoanal pouch patients // Dis. Colon Rectum. — 2001. — Vol. 44, N 9. — P. 1310–1314.
17. Pars Y.R., Olschwang S., Desaint B. et al. Familial adenomatous: prevalence of adenomas in the ileal pouch after restorative proctocolectomy // Ann. Surg. — 2001. — Vol. 233. — P. 360–364.
18. Soravia C., Cohen Z. Familial adenomatous polyposis // Current therapy in colon and rectum surgery / Eds. Fazio V.N., Church J.M., Delaney C.P. — 2nd ed. — Philadelphia: Elsevier-Mosby, 2004. — P. 349–353.
19. Tavakkolizaden A. et al. Tissue-engineered neomucosa: morphology, enterocyte dynamics, and SGLT — 1 expression topography // Transplantation. — 2003. — Vol. 75. — P. 181–185.
20. Thompson-Fawcett M.W., Marcus V.A., Redston M. et al. Adenomatous polyps develop commonly in the ileal pouch of patients with familial adenomatous poliposis // Dis. Colon Rectum. — 2001. — Vol. 44, N 3. — P. 347–353.
21. Varesco L., Gismondi V., James R. et al. Identification of APC gene mutations in Italian adenomatous polyposis coli patients by PCR-SSCP analysis // Am. J. Hum. Genet. — 1993. — Vol. 52. — P. 280–285.
22. White R.L. Tumor suppressing pathways // Cell. — 1998. — Vol. 92. — P. 591–592.