ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.352.018.6-001-089.844:602.9]-035-036.8
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-3-229-241

Поступила в редакцию 22.06.2026
Received 22.06.2026

С. С. Кулинич, С. В. Шахрай, М. М. Зафранская, Ю. М. Гаин

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ЦЕЛОСТНОСТИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СФИНКТЕРНОГО АППАРАТА ПРЯМОЙ КИШКИ

Аннотация. В статье представлены результаты экспериментальных исследований эффективности клеточной терапии структурно-функциональных нарушений целостности мышечной ткани на хирургически индуцированной модели энкопреза. По результатам морфологических и морфометрических исследований установлено, что локальное (интрасфинктерное) введение гладкомышечных клеток (ГМК), мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани (ЖТ) и костного мозга (КМ), а также лейомиоцитоподобных клеток (дифференцированных в миогенном направлении ММСК ЖТ) способствует усилению регенеративных процессов гладкомышечного компонента стенки прямой кишки. В зоне повреждения отмечается пролиферация ГМК с формированием гиперплазированного мышечного слоя. Наиболее выраженные изменения толщины гладкомышечного слоя наблюдаются при использовании клеточных продуктов на основе ГМК и ММСК ЖТ. Дальнейшие исследования регенеративного потенциала ММСК расширят представления о возможностях участия клеток в восстановлении не только висцеральной, но и поперечнополосатой мышечной ткани и будут способствовать научно обоснованному применению клеточных технологий в клинической практике.

Ключевые слова: экспериментальная модель энкопреза, клеточная терапия, гладкомышечные клетки, мезенхимальные стромальные клетки, миогенная дифференцировка

Для цитирования: Доклиническая оценка эффективности использования клеточных технологий в восстановлении целостности мышечной ткани сфинктерного аппарата прямой кишки / С. С. Кулинич, С. В. Шахрай, М. М. Зафранская, Ю. М. Гаин // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2026. – Т. 23, № 3. – С. 229–241. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-3-229-241

Svetlana S. Kulinich, Siarhei V. Shakhrai, Marina M. Zafranskaya, Yury M. Gain

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

PRECLINICAL EVALUATION OF THE EFFICACY OF CELL TECHNOLOGIES IN RESTORING THE INTEGRITY OF THE RECTAL SPHINCTER APPARATUS MUSCLE TISSUE

Abstract. The article presents the results of experimental studies on the efficacy in addressing cell therapy for structural and functional impairments of muscular tissue integrity in a surgically induced model of encopresis. Based on morphological and morphometric studies, it was established that local (intersphincteric) administration of smooth muscle cells (SMCs), multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) from adipose tissue (AT) and bone marrow (BM), as well as leiomyocyte-like cells (myogenically differentiated AT-MMSCs), enhances the regenerative processes of the smooth muscle component of the rectal wall. In the injury zone, SMC proliferation is observed, leading to the formation of a hyperplastic muscle layer (both circular and longitudinal). The most pronounced changes in the thickness of the smooth muscle layer are noted when using cell products based on SMCs and AT-MMSCs. Further research into the regenerative potential of MMSCs will expand our understanding of the cells' potential to participate in the restoration of not only visceral but also striated muscle tissue, and will facilitate the scientifically grounded application of cell technologies in clinical practice.

Keywords: experimental model of encopresis, cell therapy, smooth muscle cells, mesenchymal stromal cells, myogenic differentiation

For citation: Kulinich S. S., Shakhrai S. V., Zafranskaya M. M., Gain Y. M. Preclinical evaluation of the efficacy of cell technologies in restoring the integrity of the rectal sphincter apparatus muscle tissue. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2026, vol. 23, no. 3, pp. 229–241 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2026-23-3-229-241

Введение. Несмотря на существование внутренних механизмов регенерации, гистотипическое восстановление структуры мышечной ткани после обширных повреждений может быть существенно ограничено из-за дефицита резидентных стволовых клеток, повреждения внеклеточного матрикса (физического каркаса, направляющего рост клеток), нарушения васкуляризации и иннервации. В этой связи разработка подходов клеточной терапии и тканевой инженерии представляет собой перспективное направление для полноценного восстановления анатомо-

функциональной целостности мышц. Ключевым аспектом при разработке методов клеточной трансплантации является выбор типа и источника клеток, а также аргументация целесообразности и преимущества их практического применения. В современных исследованиях, посвященных проблемам репаративного миогистогенеза, обсуждается терапевтический потенциал широкого спектра клеточных линий [1, 2]. В частности, рассматривается применение стволовых (миосателлиты, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)), прогениторных (миобласты), дифференцированных (гладкомышечные клетки (ГМК)) и модифицированных клеток.

В настоящее время изучаются возможности получения клеточных продуктов на основе миоцитов гладких мышц, которые не являются терминально дифференцированными и сохраняют способность к митотическому делению и в постнатальный период развития [3]. ГМК способны обратимо менять свой функциональный статус в ответ на сигналы микроокружения (*phenotypic switching*) *in vivo* – при повреждении гладкомышечной ткани, окислительном стрессе, гемодинамических сдвигах и *in vitro* – при выделении ГМК из ткани и культивировании [3–5]. В ответ на активирующие молекулярные и механические стимулы происходит смещение сократительного фенотипа клеток в сторону секреторного (дедифференцировка), что сопровождается морфологической перестройкой (веретеновидные клетки сменяются фибробластоподобными, образующими плотные многослойные структуры типа “hills and valleys”), гиперпродукцией компонентов экстрацеллюлярного матрикса и снижением сократительной активности [4, 5]. Высокий пролиферативный потенциал секреторных миоцитов обеспечивает эффективное наращивание клеточной биомассы *in vitro*. Однако потеря контрактильных свойств клеток при экспансии препятствует клиническому применению ГМК, обосновывая поиск эффективных индукторов обратной редифференцировки.

С учетом фенотипической и функциональной пластичности ГМК, а также высокой инвазивности процедуры забора биоматериала для выделения клеток актуален поиск более доступных альтернативных клеточных источников. Перспективным пулом клеток с доказанным миогенным потенциалом являются ММСК. Относительная доступность аутологичного материала и мультипотентность, а также конститутивная экспрессия в клетках ряда гладкомышечных маркеров делают ММСК привлекательным объектом для разработки инновационных клеточных технологий, базирующихся на использовании преддифференцированных в миогенном направлении клеток [6]. Индукция миогенного потенциала ММСК химическими факторами позволяет получить лейомиоцитоподобные клетки с активированной экспрессией генов-маркеров, кодирующих миоспецифические белки [6–8]. Однако вопрос завершенности дифференцировки и возможности приобретения стимулированными ММСК функциональных (сократительных) свойств лейомиоцитов остается дискуссионным.

Современные научные данные показывают, что терапевтический эффект ММСК в регенеративной медицине обусловлен главным образом их паракринными свойствами, а не способностью напрямую дифференцироваться в новые клеточные элементы. Попадая в очаг воспаления, клетки выделяют комплекс биологически активных молекул (цитокины, факторы роста, экзосомы и микроРНК), реализуя свой антиапоптотический, ангиогенный, иммуномодулирующий и трофический потенциал в поврежденных тканях [9, 10]. Профиль секретома ММСК демонстрирует тканеспецифичную вариабельность в зависимости от гистологического происхождения стромальных клеток [11]. Костный мозг (КМ) и жировая ткань (ЖТ) остаются доминирующими источниками биоматериала для клеточной терапии. Активно изучается вопрос об их сравнительной терапевтической эффективности. Несмотря на фенотипическое сходство (морфология и профиль поверхностных антигенов), многие исследователи отмечают особенности в миграционных свойствах, пролиферативном потенциале, дифференцировочных и иммуномодулирующих свойствах у этих клеточных популяций [9, 12, 13].

Таким образом, на сегодняшний день при разработке технологий клеточной терапии структурно-функциональных нарушений мышечной ткани различной этиологии нерешенными остаются фундаментальные вопросы, касающиеся оптимального выбора клеточных источников и определения необходимого уровня их коммитированности в миогенном направлении.

Цель исследования – оценить эффективность использования клеточных культур мезенхимального происхождения различной степени коммитированности в миогенном направлении в восстановлении структуры мышечной ткани сфинктерного аппарата прямой кишки в эксперименте.

Объекты и методы исследования. *Выделение и культивирование ГМК аорты крыс.* ГМК выделяли путем ферментативного расщепления тканей нисходящего грудного и брюшного отделов аорты крыс (n = 7), миоциты которых, по литературным данным, в отличие от мышечных клеток восходящего отдела и дуги аорты, имеют мезодермальное происхождение [14]. После ферментативной обработки ткани раствором 0,5%-й коллагеназы I типа (Sigma, Германия) и 0,3%-й проназы (Sigma) в течение 25 мин при температуре 37 °С наружную соединительнотканную оболочку удаляли, а оставшийся мышечный слой повторно инкубировали в 0,5%-й коллагеназе I типа (30 мин, 37 °С). Полученные ГМК культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ L-глутамина, 50 ед/мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 100 мкг/мл неомицина сульфата (Gibco, Великобритания) в термостате в атмосфере увлажненного воздуха при 5 % CO_2. Замену среды проводили каждые 72–96 ч.

Выделение и культивирование ММСК из КМ крыс. КМ вымывали из диафизов бедренных костей средой DMEM (Gibco). Полученную суспензию клеток наслаивали на градиент плотности Histopaque-1077 (p = 1,077 г/см^3 (Sigma)) и центрифугировали в течение 30 мин при 1 500 об/мин. Мононуклеары интерфазного кольца, включающие и фракцию ММСК, дважды промывали центрифугированием в фосфатно-солевом буфере с добавлением 5 % ЭТС, и высевали на культуральный пластик в полной питательной среде DMEM, содержащей 10 % ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 50 ед/мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 100 мкг/мл неомицина сульфата, с плотностью посева клеток 2–4 × 10^5 клеток/см^2. Через 48 ч проводили замену питательной среды и удаление неприкрепившихся клеток. Оставшиеся на пластике адгезивные клетки продолжали культивировать до образования в первичной культуре монослоя.

Выделение и культивирование ММСК из ЖТ крыс. ММСК крыс выделяли из ЖТ внутрибрюшинного пространства методом энзиматического расщепления в растворе 0,075%-й коллагеназы I типа в течение 45 мин при температуре 37 °С. Полученную в результате ферментативной обработки суспензию клеток дважды отмывали центрифугированием в фосфатно-солевом буфере с добавлением 5 % ЭТС и высевали на культуральный пластик в полной питательной среде DMEM с плотностью посева клеток 2–4 × 10^5 клеток/см^2.

При субкультивировании ММСК ЖТ и КМ снимали с поверхности культурального пластика обработкой 0,25%-м раствором трипсина (Gibco). Для полной дезагрегации гиперконфлюэнтных культур ГМК использовали комбинацию ферментов: 0,25 % трипсина (в комплексе с ЭДТА) и 0,05 % эластазы (Sigma).

Адипогенная и остеогенная дифференцировка ММСК ЖТ и КМ. Для характеристики мультипотентности ММСК оценивали их способность дифференцироваться в остео- и адипогенном направлениях в дифференцировочных средах, приготовленных на основе полной культуральной среды DMEM с добавлением индукторов адипогенеза (50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10^{-7} М дексаметазона, 50 мкг/мл индометацина) или остеогенеза (10^{-8} М дексаметазона, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мМ глицерол-2-фосфата) (Sigma). В контрольных культурах клетки культивировали в стандартной полной питательной среде. По истечении 4 недель культивирования их окрашивали красителями: масляным красным О (Oil Red O) и ализариновым красным (Alizarin Red) (Sigma).

Направленная дифференцировка ММСК ЖТ в лейомиоцитоподобные клетки. Для активации миогенного потенциала ММСК ЖТ высаживали на культуральный пластик, дополнительно покрытый 0,1%-м коллагеном I типа (Sigma). Культивирование проводили в течение 6 дней в среде DMEM, содержащей 5 нг/мл трансформирующего фактора роста β1 (*TGF*-β1), 1 % ЭТС, 1 % L-глутамина, а также антибиотики: 50 ед/мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 100 мкг/мл неомицина сульфата. Интактные культуры ММСК (контрольная проба) инкубировали в полной питательной среде DMEM, содержащей 10 % ЭТС.

Предтрансплантационная подготовка клеток. Мониторинг клеточного роста и дифференцировки клеточных культур осуществляли методом инвертированной микроскопии (Axiovert 200, Carl Zeiss, Германия). Регистрацию изображений выполняли в режимах светлого поля, фазового и Varel-контраста, а также с использованием техники бокового освещения.

Для оценки жизнеспособности клеток на разных этапах культивирования использовали 0,2%-й раствор трипанового синего (Serva).

Внутриклеточную экспрессию гладкомышечного α-актина (α-SMA) и виментина в культурах оценивали методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой PE (Rat alpha-Smooth Muscle Actin Antibody, mouse IgG2a-PE, clone 1A4 (R&D Systems, Канада) и PE-Anti-Vimentin antibody, rabbit IgG, clone EPR3776 (Abcam, США)), а также дополнительно применяли набор реагентов для фиксации и пермеабилизации клеток (Abcam) согласно инструкции производителя. Контрольный образец (изотипический контроль) окрашивали неспецифическими моноклональными антителами (mouse IgG2a-PE, clone 1A4 (R&D Systems) и rabbit IgG-PE, clone EPR25A (Abcam). Учет результатов внутриклеточного окрашивания выполняли с использованием проточного цитофлуориметра FC500 (Beckman Coulter, США). Для количественной оценки динамики экспрессии маркеров использовали показатель медианы интенсивности флуоресценции (Median Fluorescence Intensity – MFI). Для учета неспецифического окрашивания антителами из итоговых значений MFI маркеров вычитали соответствующие показатели изотипического контроля.

Экспериментальное моделирование энкопреза. Энкопрез моделировали у самок белых беспородных крыс (n = 80) массой 300–350 г. согласно разработанной ранее методике (С. В. Шахрай и др., 2016) путем латеральной сфинктеротомии (рис. 1) [15]. Валидность модели подтверждалась клинически и морфологически [15]. На 7-е сутки после моделирования энкопреза у всех крыс отмечалась функциональная недостаточность терминального сфинктера пищеварительного тракта (дефекация неоформленными каловыми массами).

Все манипуляции проводились с учетом международных правил и принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью (Страсбург, 18.03.1986), в соответствии с Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете (Минск, 2006), а также при согласовании протокола доклинических исследований с локальным этическим комитетом. За 24 ч до моделирования животных переводили со стандартного рациона питания на полное голодание. Инвазивные манипуляции проводили под внутримышечным наркозом (введение комбинации 0,25%-го раствора дроперидола и 0,005%-го раствора фентанила).

На 7-е сутки эксперимента методом рандомизации было сформировано 6 групп животных (рис. 1). Четыре опытные группы составили крысы с моделью энкопреза, которым проводили клеточную терапию с использованием различных культур клеток (n = 16 в каждой). В группу сравнения вошли животные с моделированной патологией без лечения (n = 16). Контрольную группу составили интактные (здоровые) особи (n = 6).

В опытных группах проведена трансплантация ММСК КМ (группа 1) и ЖТ (группа 2), лейомиоцитоподобных клеток (группа 3) и ГМК (группа 4). В условиях обезболивания клетки вводились интрасфинктерно (в левую полуокружность терминального сфинктера на 3 часах по условному лимбу прямой кишки) путем инъекции в виде суспензии в физиологическом растворе в количестве 1×10^6/кг массы животного. Животным группы сравнения проводили инъекцию физиологического раствора.

Морфологические и морфометрические исследования. На 21-е сутки лабораторных животных выводили из эксперимента. Фрагменты прямой кишки из области анального сфинктера фиксировали в формалине в течение 24 ч. После проводки материала и приготовления парафиновых блоков нарезали серийные срезы в каждой группе исследования. На светооптическом уровне оценили изменения в зоне разрушения сфинктера: наличие или отсутствие слоя поперечнополосатой мускулатуры, толщину гладкомышечного слоя. Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 5 полях зрения (увеличение ×50) с разрешением 2048 × 1536 пикселей при помощи микроскопа фирмы Zeiss и цифровой камеры Canon PowerShot G3. Площадь одного поля зрения составила 3 145 728 пкс^2. С использованием морфометрической программы Bioscan и ее приложения Line measurements выполнили анализ толщины гладкомышечного слоя стенки кишки в зоне сфинктеротомии (30 измерений).

Окрашивание ММСК ЖТ крыс красителем PKH26. Окрашивание витальным липофильным красителем PKH26 (Sigma) проводили согласно протоколу производителя. Образец ММСК (2×10^7 клеток второго пассажа) и 4×10^{-6} М PKH26 разводили в реагенте Diluent C, смешивали в равных объемах и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавли-

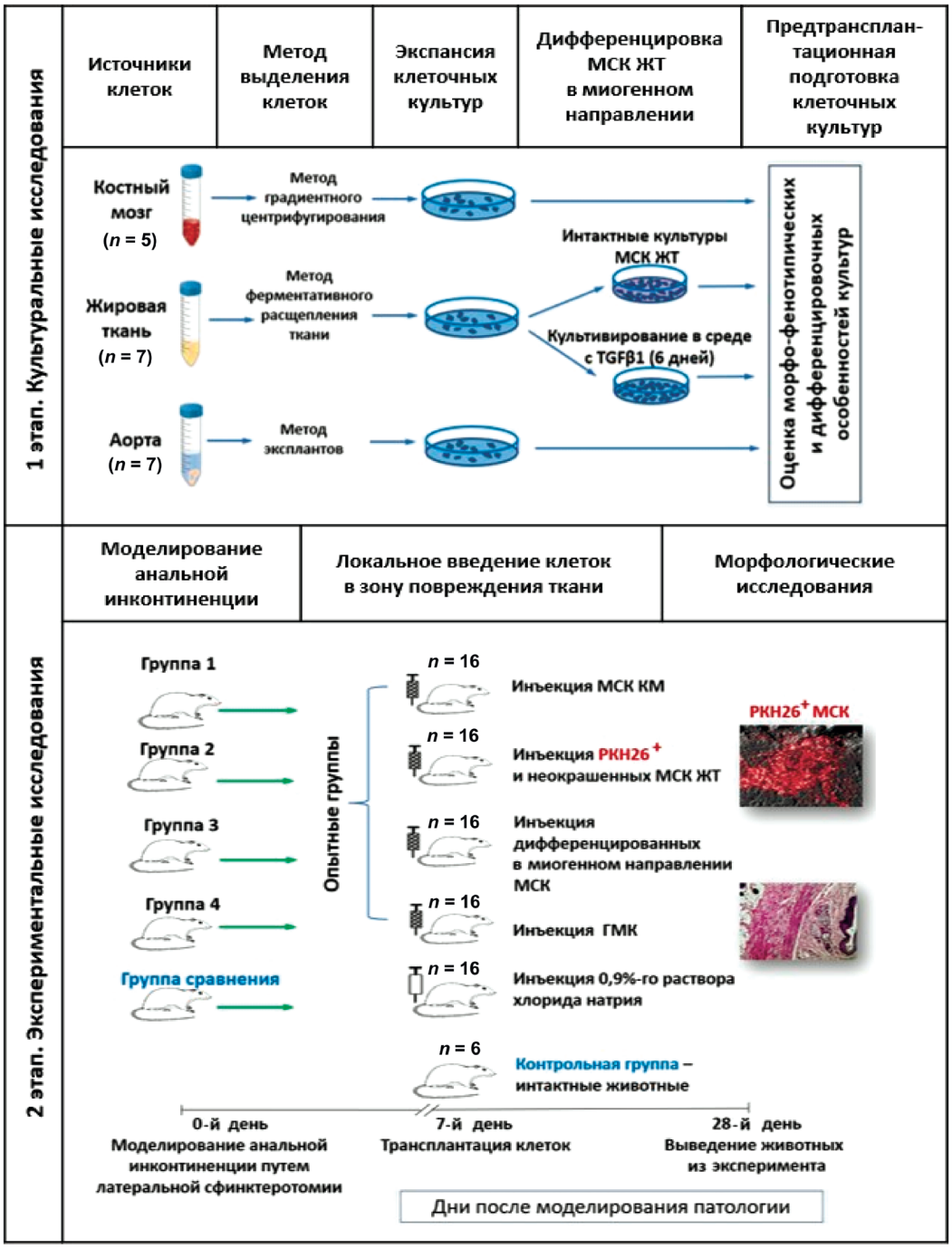


Рис. 1. Дизайн исследования

Fig. 1. Design of the experiment

вали добавлением эквивалентного объема сыворотки и инкубированием в течение 1 мин. После трехкратной процедуры промывания центрифугированием (10 мин, 1 500 об/мин) в фосфатном буферном растворе меченные ММСК ЖТ разводили в физиологическом растворе для последующей трансплантации животным с экспериментальной моделью энкопреза. Интенсивность окрашивания оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии (Axiovert 200, Carl Zeiss) и проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter).

Детекцию трансплантированных ММСК, меченных флуорохромом PKH26, проводили в гистологических препаратах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостатном микротоме Leica CM 1850 (Leica, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 13.0. Полученные значения исследуемых показателей представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей (Me (25; 75)). Для сравнительного анализа количественных данных использовали непараметрические методы: *U*-критерия Манна – Уитни и критерий Вилкоксона. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. ***Морфо-фенотипические особенности клеточных культур.*** Для сравнительного анализа эффективности применения клеточных технологий в репарации мышечной ткани сфинктерных структур получены культуры клеток мезенхимального происхождения различной степени коммитированности в миогенном направлении: ГМК аорты, интактные ММСК ЖТ и КМ, а также ММСК ЖТ, дифференцированные в лейомиоцитоподобные клетки. На первом этапе исследования проводилась оценка стабильности морфо-фенотипических свойств культур, их потенциала к экспансии и дифференцировке.

Культуры ГМК аорты. Первые признаки модуляции ГМК из сократительного типа в секреторный выявлены в первые дни культивирования. На 2–5-е сутки инкубации наблюдалась активация пролиферативного потенциала и изменение фузиформной морфологии, характерной для клеток сразу после ферментативного изолирования из ткани, на фибробластоподобную, сохраняющуюся на протяжении всего последующего периода клеточного роста (рис. 2). По мере уве-

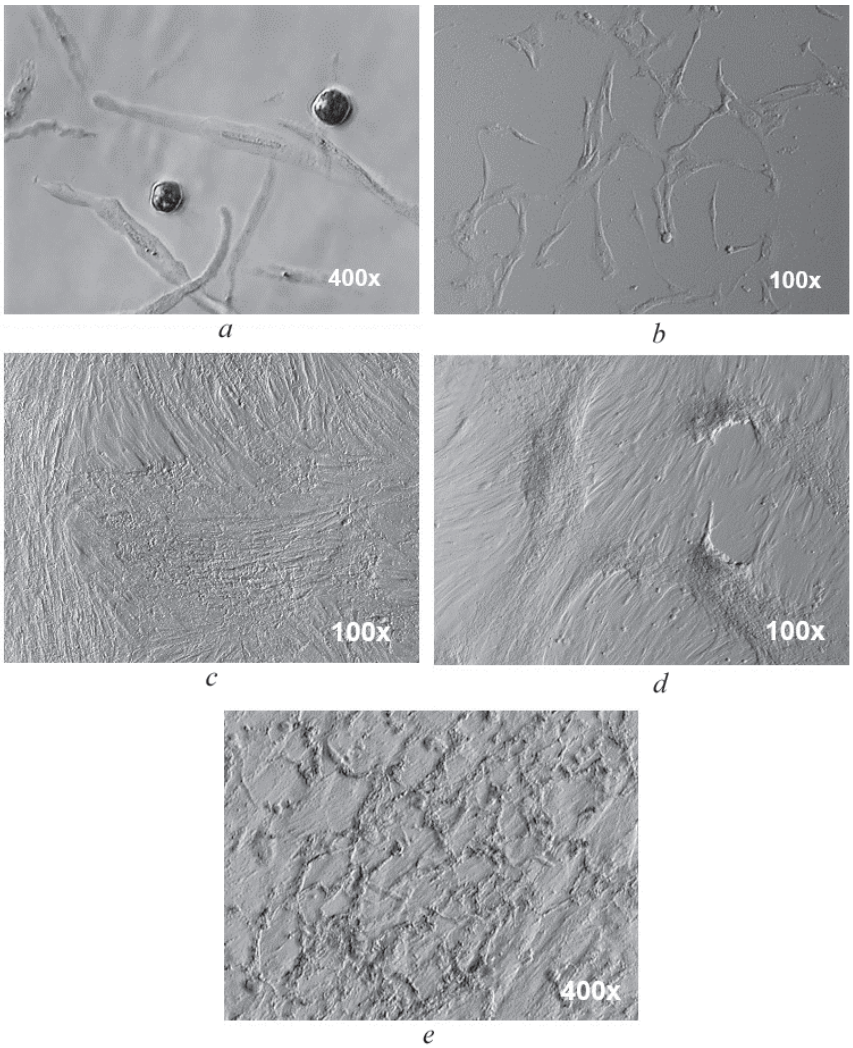


Рис. 2. Морфология первичных культур ГМК аорты крысы на 1 (*a*), 3 (*b*), 9 (*c*, *e*) и 12-е (*d*) сутки культивирования; фазово-контрастная микроскопия

Fig. 2. Morphology of primary cultures of rat aortic SMCs on day 1 (*a*), day 3 (*b*), day 9 (*c*, *e*), and day 12 (*d*) of cultivation; phase-contrast microscopy

личения конфлюэнтности культуры происходило формирование плотных многослойных участков (hills and valleys морфология) (рис. 2, *d*), на поверхности которых при микроскопическом исследовании отмечалось накопление синтезируемых клетками компонентов экстрацеллюлярного матрикса (волокнистая сеть), что также подтверждает трансформацию ГМК в секреторные миоциты (рис. 2, *e*).

Для фенотипической характеристики миоцитов, выделенных из гладкомышечной ткани аорты, проводилась оценка экспрессии внутриклеточных цитоскелетных белков: α-SMA (ключевой белок сократительного аппарата ГМК) и виментина (фенотипический маркер миоцитов синтетического типа). По результатам проточной цитометрии в первичных культурах ГМК процент α-актин-позитивных клеток составлял 93 (89; 96) % и оставался стабильным на протяжении первых трех пассажей. Динамика экспрессии маркера регистрировалась уже на ранних этапах клеточной экспансии. После 25 сут культивирования медиана интенсивности флуоресценции α-SMA в клетках первичной культуры статистически значимо снижалась в 5,1 раза ($p = 0{,}01$) по сравнению с уровнем, характерным для интактных ГМК непосредственно после их выделения из ткани (рис. 3, *a*).

В процессе монослойного культивирования доля виментин-положительных клеток увеличивалась с 53 (42; 61) %, выявляемых перед посевом первичной культуры ГМК, до 92 (85; 96) %, регистрируемых на 25-е сутки *in vitro* ($p < 0{,}05$). В указанный временной промежуток также наблюдался трехкратный прирост степени экспрессии белка в клетках, оцениваемый по изменению медианы интенсивности флуоресценции виментина ($p = 0{,}01$) (рис. 3, *b*).

Таким образом, изоляция из ткани и культивирование ГМК *ex vivo* способствовали их модуляции в клетки секреторного фенотипа, характеризующиеся высоким пролиферативным потенциалом, активной миграцией по поверхности культурального субстрата, секрецией компонентов внеклеточного матрикса и сниженным уровнем синтеза внутриклеточных сократительных белков (α-SMA). При этом, согласно литературным данным, секреторные миоциты могут сохранять пластичность и способность к обратному переходу в сократительный фенотипа под действием сигналов микроокружения [7, 6].

Культуры ММСК ЖТ и КМ. Культуры ММСК ЖТ и КМ на протяжении всего периода культивирования (3 пассажа) характеризовались стабильной гомогенной фибробластоподобной морфологией и мультипотентным дифференцировочным потенциалом, который подтверждался *in vitro* направленной индукцией адипогенеза и остеогенеза (рис. 4).

Культуры лейомиоцитоподобных клеток. С целью повышения эффективности клеточной трансплантации для лечения аноректальной патологии у крыс проведена предварительная направленная дифференцировка ММСК ЖТ *in vitro* в лейомиоцитоподобные клетки под действием химического индуктора – TGF-β1. В ходе микроскопического анализа роста клеточных культур на 6-е сутки инкубирования в дифференцировочной среде выявлено снижение цитоплазматической перинуклеарной зернистости клеток и увеличение плотности волокон цитоскелета (рис. 5, *a*, *b*).

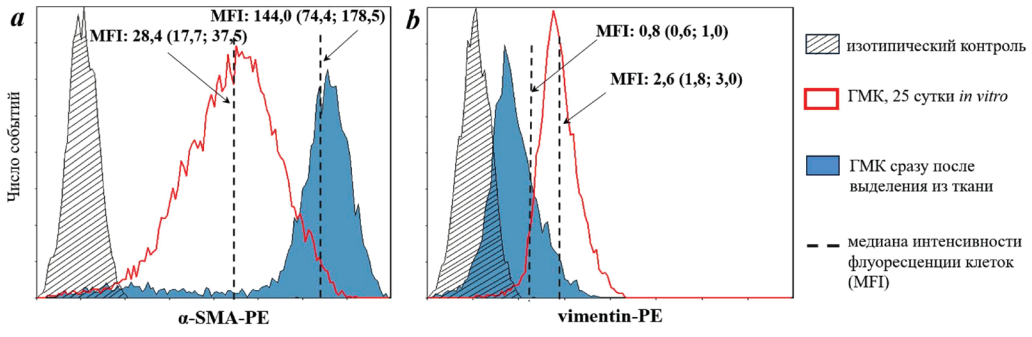


Рис. 3. Анализ изменения интенсивности экспрессии α-SMA (*a*) и виментина (*b*) в первичных культурах ГМК в процессе культивирования методом проточной цитометрии

Fig. 3. Analysis of changes in the expression intensity of α-SMA (*a*) and vimentin (*b*) in primary SMC cultures during cultivation, assessed by flow cytometry

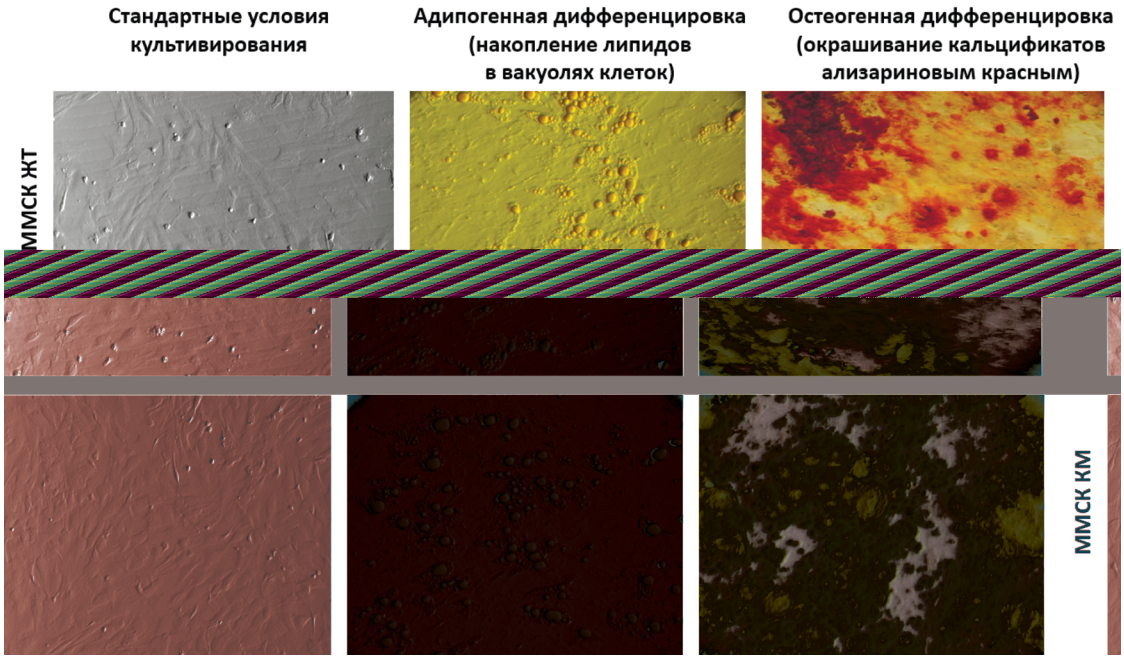


Рис. 4. Морфология интактных и дифференцированных в адипогенном и остеогенном направлении культур ММСК 1-го пассажа; фазово-контрастная микроскопия, увеличение – ×100

Fig. 4. Morphology of intact and differentiated (adipogenic and osteogenic) cultures of first-passage MMSCs, phase-contrast microscopy, magnification – ×100

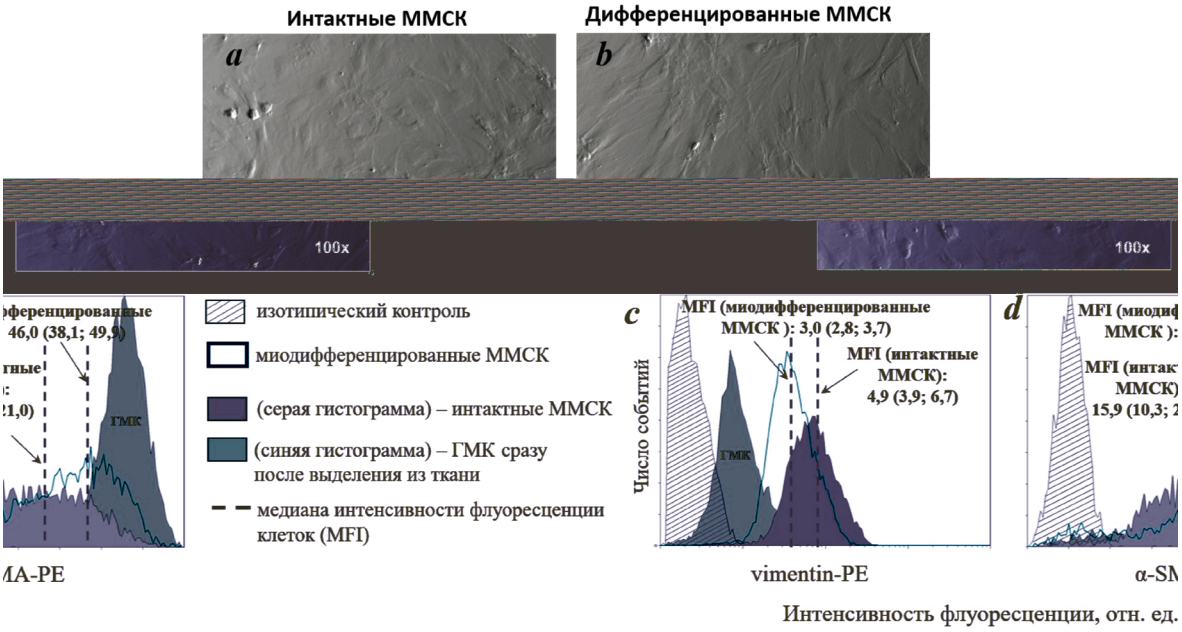


Рис. 5. Анализ морфо-фенотипических изменений ММСК, дифференцированных в лейомиоцитоподобные клетки (6-е сутки инкубирования), методами фазово-контрастной микроскопии (*a*, *b*) и проточной цитометрии (*c*, *d*)

Fig. 5. Analysis of morpho-phenotypic changes in MMSCs differentiated into leiomyocyte-like cells (day 6 of incubation) by phase-contrast microscopy (*a*, *b*) and flow cytometry (*c*, *d*)

По завершении процесса дифференцировки (6-е сутки) доля клеток, экспрессирующих α- SMA и виментин, в контрольных образцах с интактными ММСК (95,5 (94,2; 97,3) % и 92,9 (88,3; 96,2) % соответственно) и культурах дифференцированных клеток (93,6 (91,9; 97,2) % и 90,0 (86,9; 95,4) % соответственно) статистически значимо не отличалась. Вариабельность фенотипических

признаков регистрировалась на уровне экспрессии цитоскелетных белков в клетках. Анализ изменений медианы интенсивности флуоресценции маркеров в TGF-β1-стимулированных клетках показал, что дифференцировка ММСК сопровождалась увеличением экспрессии α-SMA в 2,9 раза и снижением виментина в 1,6 раза относительно интактных клеток ($p = 0{,}04$).

Дополнительно изучена функциональная активность TGF-β1-стимулированных ММСК в ответ на действие агониста ацетилхолиновых рецепторов – карбахола. При культивировании дифференцированных ММСК в присутствии 10^{-5} мМ карбахола сократительной активности не выявлено.

Согласно литературным данным для индукции миогенного потенциала в ММСК применяют природные и синтетические индукторы (гормоны, цитокины, активаторы и ингибиторы сигнальных путей, факторы эпигенетической регуляции, сыворотки, компоненты внеклеточного матрикса и др.), а также совместное культивирование со зрелыми мышечными клетками [6–8]. Несмотря на разнообразие путей миодифференцировки ММСК, конечной целью всех протоколов является изменение морфо-фенотипических особенностей клеток и их цитофизиологических функций. Выявленная стимуляция экспрессии сократительных белков (α-SMA) на фоне отсутствия функционального ответа при инкубации TGF-β1-индуцированных ММСК с карбахолом указывает на то, что полученные лейомиоцитоподобные клетки находятся на стадии незавершенной гладкомышечной дифференцировки.

Оценка регенераторных свойств ММСК КМ, интактных и дифференцированных в миогенном направлении ММСК ЖТ, а также зрелых ГМК при введении клеточных культур лабораторным животным с экспериментальной моделью энкопреза. Регенераторный потенциал различных популяций клеток мезенхимального происхождения в отношении восстановления повреждений мышечной ткани исследовали на экспериментальной модели энкопреза, воспроизводимой у крыс путем механической сфинктеротомии. Эффективность клеточной терапии оценивалась на 14-е сутки после интрасфинктерного введения клеток по результатам морфологических и морфометрических исследований. На рис. 6 представлена гистологическая структура стенки сфинктера прямой кишки лабораторных крыс с моделью энкопреза, прошедших клеточную терапию (группы 1–4), без терапии (группа сравнения) и здоровых животных (контрольная группа).

В препаратах тканей животных группы сравнения отмечался дефект в области поперечнополосатой мускулатуры сфинктера, заполненный волокнистой соединительной тканью. В зоне сфинктеротомии выявлено истончение гладкомышечного слоя клеток за счет очагового фиброза, дистрофические изменения мышечных волокон (незначительное расслоение) и регенераторно-компенсаторные изменения – мелкоочаговая гиперплазия мышечной ткани.

Выявленные гистологические изменения характерны для репаративного гистогенеза мышечной ткани, при котором наблюдается замещение некротизированных и атрофичных волокон соединительной тканью в сочетании с процессами компенсаторной гиперпролиферации пула сохранившихся миоцитов.

Применение клеточной терапии на 7-е сутки моделирования аноректальной патологии не влияло на восстановление структуры поперечнополосатой мышечной ткани, но способствовало увеличению толщины гладкомышечного слоя сфинктера прямой кишки в месте дефекта. Через 14 сут после клеточной инъекции (группы 1–4) гладкомышечный компонент в области сфинктеротомии был гиперплазирован и представлен двумя слоями клеток: поперечным (циркуляторным) и продольным.

Следует отметить, что использование ГМК аорты (группа 4) или лейомиоцитоподобных клеток (группа 3) в коррекции энкопреза приводило к гиперплазии преимущественно циркулярного гладкомышечного слоя – главного структурного звена внутреннего сфинктера прямой кишки. По периферии зоны повреждения миоциты поперечнополосатых мышц, так же как и ГМК (в один слой), располагались в поперечном направлении по отношению к длиннику кишки (циркулярно).

Результаты морфометрических исследований размеров гладкомышечного слоя стенки прямой кишки лабораторных животных исследуемых групп представлены на рис. 7.

Таким образом, применение клеточной терапии независимо от типа локально вводимых культур приводило к статистически значимому увеличению толщины гладкомышечного компонента стенки прямой кишки экспериментальных животных с моделью энкопреза (группа 1–4) по сравнению с аналогичным показателем в группах сравнения и контроля. Наиболее выраженное

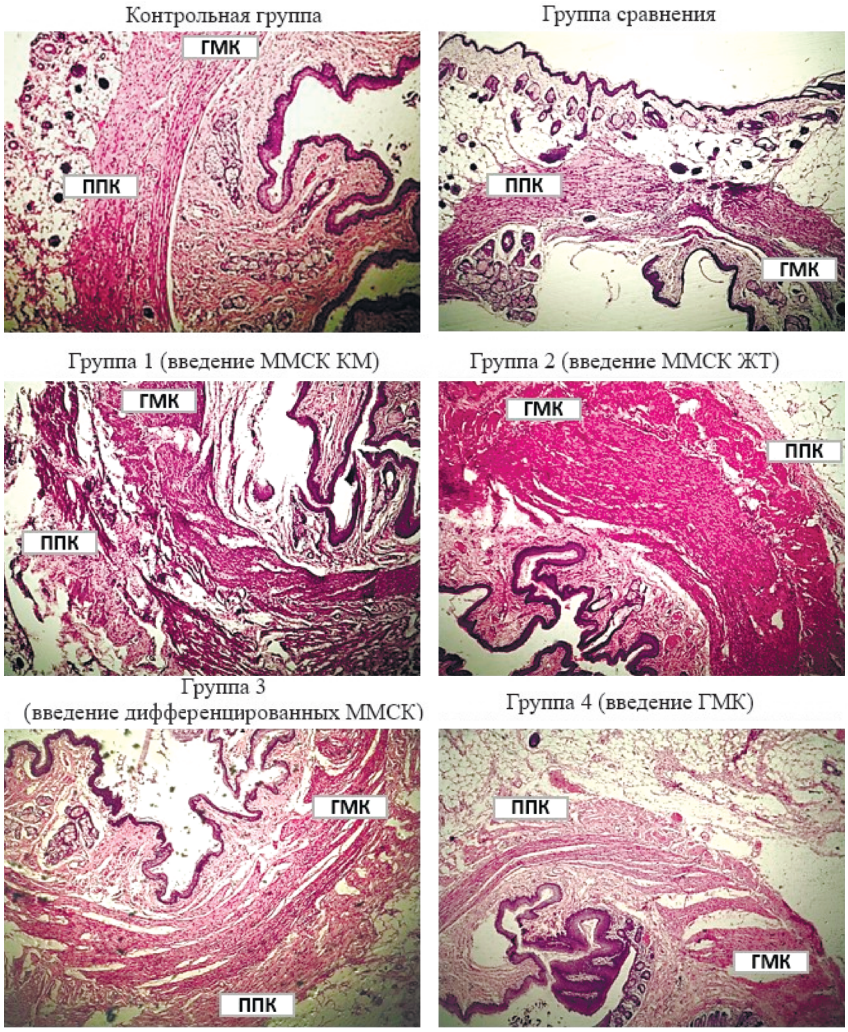


Рис. 6. Гистологическая структура стенки сфинктера прямой кишки лабораторных крыс исследуемых групп на 21-е сутки от начала эксперимента (окраска гематоксилином и эозином), увеличение – ×50

Fig. 6. Histological structure of the rectal sphincter wall in laboratory rats of the studied groups on day 21 of the experiment (hematoxylin and eosin staining), magnification – ×50

утолщение гладкомышечного слоя наблюдалось при использовании ГМК аорты (группа 4) и ММСК ЖТ (группа 2) в терапии энкопреза (рис. 7).

Оценка миграционных свойств ММСК ЖТ, трансплантированных животным с моделью энкопреза. Для оценки миграционной активности ММСК ЖТ после введения крысам с моделированной аноректальной патологией клетки предварительно метили флуоресцентным липофильным красителем PKH26 (рис. 8, *a*). Согласно литературным данным период полувыведения флуорохрома превышает 100 сут, что обеспечивает надежную визуализацию клеток. Анализ флуоресценции ММСК в процессе трехнедельного культивирования *in vitro* показал стабильное удержание липофильного зонда клеточными мембранами. При этом инкорпорация метки не оказывала цитотоксического действия и не подавляла пролиферативный потенциал клеток (рис. 8, *b*).

Локализацию PKH26^{+}-ММСК после интрасфинктерного введения крысам с экспериментальным энкопрезом оценивали в криосрезах тканей прямой кишки из области анального сфинктера на 7, 14 и 21-е сутки после инъекции окрашенных клеток (рис. 8, *c–f*).

Установлено, что ММСК ЖТ сохраняли свою жизнеспособность и преимущественно локализовались в месте введения в течение 3 недель после трансплантации. Лишь небольшая часть клеток мигрировала в прилежащие ткани (14-е сутки после введения). Несмотря на то что флуоресцентный сигнал мембранных структур ММСК четко фиксировался в тканях на протяжении

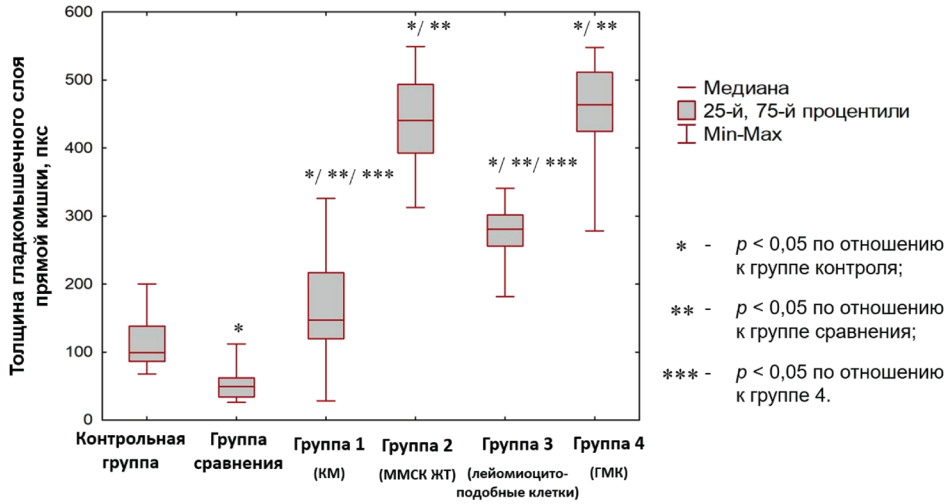


Рис. 7. Толщина гладкомышечного слоя стенки прямой кишки лабораторных животных исследуемых групп

Fig. 7. Thickness of the smooth muscle layer in the rectal wall of laboratory animals in the studied groups

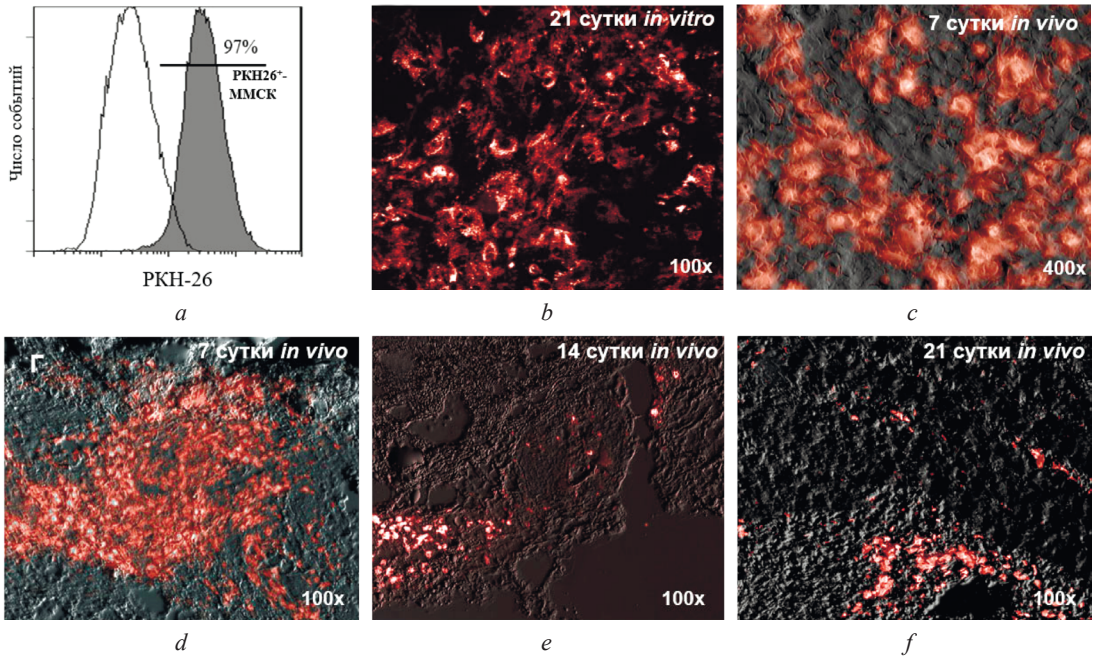


Рис. 8. Анализ флуоресценции PKH26-позитивных ММСК методом проточной цитометрии после процедуры окрашивания (*a*), флуоресцентной микроскопии в монослойной культуре (*b*) и в тканях прямой кишки крыс с экспериментальным энкопрезом (*c–f*). *a* – прозрачная гистограмма – неокрашенные клетки; закрашенная серым цветом гистограмма – процент PKH26-позитивных клеток

Fig. 8. Fluorescence analysis of PKH26-positive MMSCs by flow cytometry immediately after staining (*a*), fluorescence microscopy in monolayer culture (*b*) and in the rectal tissues of rats with experimental encopresis (*c–f*). *a* – transparent histogram – unstained cells; gray-shaded histogram – percentage of RKH26-positive cells

всего периода наблюдения (21 сут), отмечалось постепенное снижение количества и интенсивности свечения клеток, что может быть обусловлено высокой пролиферативной активностью клеток или элиминацией их из ткани макрофагами.

Заключение. Клеточная терапия является эффективным методом стимуляции регенерации поврежденных мышечных структур. На экспериментальной модели хирургически индуцированного энкопреза, требующей восстановления сфинктерного аппарата, представленного поперечнополосатой и гладкомышечной тканью, применение клеточных технологий приводит к статистически значимым морфологическим перестройкам гладкомышечного компонента кишечной

стенки. После интрасфинктерного введения культур клеток мезенхимального происхождения с миогенным потенциалом (ГМК, ММСК ЖТ и КМ, лейомиоцитоподобных клеток, полученных из ММСК ЖТ) в зоне повреждения зафиксирована выраженная гиперплазия гладкомышечных волокон относительно животных с аналогичной патологией из группы сравнения, не получавших клеточную терапию. Наиболее выраженные изменения толщины гладкомышечного слоя наблюдались при использовании клеточных продуктов на основе ГМК и ММСК ЖТ. Учитывая оптимальный профиль безопасности (низкая иммуногенность), выраженные иммуномодулирующие свойства и доступность аутологичного материала, ММСК ЖТ обладают преимуществом перед ГМК при выборе клеточного пула для регенеративной терапии структурных дефектов мышечной ткани. Необходимы дальнейшие исследования для более глубокого изучения репаративного потенциала ММСК ЖТ, а также возможности их участия в регенерации не только висцеральной, но и поперечнополосатой мышечной ткани. Полученные экспериментальные результаты могут быть использованы при разработке метода комплексного лечения энкопреза с использованием биомедицинского клеточного продукта на основе ММСК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Adult stem cell sources for skeletal and smooth muscle tissue engineering / S. Salemi, J. A. Prange, V. Baumgartner [et al.] // Stem Cell Research and Therapy. – 2022. – Vol. 13, N 1. – Art. 156. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02835-x

2. Novel directly reprogrammed smooth muscle cells promote vascular regeneration as microvascular mural cells / C. Jung, J. W. Han, S.-J. Lee [et al.] // Circulation. – 2025. – Vol. 151, N 15. – P. 1076–1094. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.124.070217

3. Особенности экспрессии виментина, десмина и фактора роста эндотелия сосудов в средней стенке аорты в норме и при аневризме брюшного отдела аорты / Н. А. Юзефович, О. А. Юдина, И. А. Мельников, Т. М. Студеникина // Медицинские новости. – 2017. – № 8. – С. 71– 76.

4. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease / G. Cao, X. Xuan, J. Hu [et al.] // Cell Communication and Signaling. – 2022. – Vol. 20, N 1. – Art. 180. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00993-2

5. Smooth muscle cells in atherosclerosis: essential but overlooked translational perspectives / P. Azar, K.-U. Jarr, D. Gomez [et al.] // European Heart Journal. – 2025. – Vol. 46, N 45. – P. 4862–4875. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaf337

6. Differentiation of adipose-derived stem cells into smooth muscle cells in an internal anal sphincter-targeting anal incontinence rat model / M. Kim, B.-Y. Oh, J.-S. Lee [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2023. – Vol. 12, N 4. – Art. 1632. https://doi.org/10.3390/jcm12041632

7. Generation and characterization of human mesenchymal stem cell-derived smooth muscle cells / S. Sivaraman, J. Hedrick, S. Ismail [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, N 19. – Art. 10335. https://doi.org/10.3390/ijms221910335

8. Smooth muscle cells differentiated from mesenchymal stem cells are regulated by microRNAs and suitable for vascular tissue grafts / X. Gu, X. Hong, A. Le Bras [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Vol. 293, N 21. – P. 8089–8102. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001739

9. Effect of allogenic mesenchymal stem cell injection on functional repair outcomes following skeletal muscle laceration injury / R. E. Ahmad, A. H. Mokhtar, M. Z. Mohamed Al-Fayyadh [et al.] // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13, N 11. – Art. 2810. https://doi.org/10.3390/biomedicines13112810

10. Bone marrow-versus adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for corneal failure in an experimental model of limbal stem cell deficiency / S. Galindo, M. López-Paniagua, A. de la Mata [et al.] // Experimental Eye Research. – 2026. – Vol. 262. – Art. 110737. –https://doi.org/10.1016/j.exer.2025.110737

11. *In vitro* assays for investigating the immunomodulatory properties of human mesenchymal stromal cells / L. L. Lethager, S. Bangsgaard, E. M. Johansen [et al.] // Stem Cell Research and Therapy. – 2026. – Vol. 17, N 1. – Art. 102. https://doi.org/10.1186/s13287-026-04920-x

12. Сравнительный анализ профиля экспрессии молекулярных маркеров мезенхимальных стволовых клеток, полученных из тканей плацентарно-пуповинного комплекса, жировой ткани и костного мозга / Е. Г. Юркина, С. И. Кривенко, В. В. Смольникова [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2025. – Т. 69, № 4. – С. 314–321.

13. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy / C.-Y. Li, X.-Y. Wu, J.-B. Tong [et al.] // Stem Cell Research and Therapy. – 2015. – Vol. 6, N 1. – Art. 55. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5

14. Левчук, К. А. Региональная функциональная гетерогенность гладкомышечных клеток аорты крысы / К. А. Левчук, А. Б. Малашичева // Онтогенез. – 2017. – Т. 48, № 3. – С. 257–262.

15. Моделирование анальной инконтиненции у крыс / С. С. Кулинич, Ю. М. Гаин, С. В. Шахрай, Т. Э. Владимирская // Научные исследования в медицине: от теории к практике: сб. науч. тр. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию БелМАПО, 25 нояб. 2016 г. / редкол.: М. А. Герасименко (пред.) [и др.]. – Мн., 2016. – С. 436–441.

References

1. Salemi S., Prange J. A., Baumgartner V., Mohr-Haralampieva D., Eberli D. Adult stem cell sources for skeletal and smooth muscle tissue engineering. *Stem Cell Research and Therapy*, 2022, vol. 13, no. 1, art. 156. https://doi.org/10.1186/s13287-022-02835-x

2. Jung C., Han J. W., Lee S.-J., Kim K. H., Oh J. E., Bae S. [et al.]. Novel directly reprogrammed smooth muscle cells promote vascular regeneration as microvascular mural cells. *Circulation*, 2025, vol. 151, no. 15, pp. 1076–1094. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.124.070217

3. Yuzefovich N. A., Yudina O. A., Mel'nikov I. A., Studenikina T. M. Feature of the expression of vimentin, desmin, vascular endothelial growth factor in an aortic media in normal and abdominal aortic aneurysm. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2017, no. 8, pp. 71–76 (in Russian).

4. Cao G., Xuan X., Hu J., Zhang R., Jin H., Dong H. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. *Cell Communication and Signaling*, 2022, vol. 20, no. 1, art. 180. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00993-2

5. Azar P., Jarr K.-U., Gomez D., Jørgensen H. F., Leeper N. J., Bochaton-Piallat M.-L. Smooth muscle cells in atherosclerosis: essential but overlooked translational perspectives. *European Heart Journal*, 2025, vol. 46, no. 45, pp. 4862–4875. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaf337

6. Kim M., Oh B.-Y., Lee J.-S., Yoon D., Kim Y.-R., Chun W., Kim J. W., Son I. T. Differentiation of adipose-derived stem cells into smooth muscle cells in an internal anal sphincter-targeting anal incontinence rat model. *Journal of Clinical Medicine*, 2023, vol. 12, no. 4, art. 1632. https://doi.org/10.3390/jcm12041632

7. Sivaraman S., Hedrick J., Ismail S., Slavin C., Rao R.R. Generation and characterization of human mesenchymal stem cell-derived smooth muscle cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no.19, art. 10335. https://doi.org/10.3390/ijms221910335

8. Gu X., Hong X., Bras A. Le, Nowak W. N., Bhaloo Sh. I., Deng J., Xie Y., Hu Y., Ruan X. Z., Xu Q. Smooth muscle cells differentiated from mesenchymal stem cells are regulated by microRNAs and suitable for vascular tissue grafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, vol. 293, no. 21, pp. 8089–8102. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001739

9. Ahmad R. E., Mokhtar A. H., Mohamed Al-Fayyadh M. Z., Nam H. Y., Aziz A., Mansor A., Kamarul T. Effect of allogenic mesenchymal stem cell injection on functional repair outcomes following skeletal muscle laceration injury. *Biomedicines*, 2025, vol. 13, no. 11, art. 2810. https://doi.org/10.3390/biomedicines13112810

10. Galindo S., López-Paniagua M, de la Mata A., Herreras J. M., García-Vázquez C., Marceñido B., Rey E., Higuera-Barón C., Calonge M., Nieto-Miguel T. Bone marrow-versus adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for corneal failure in an experimental model of limbal stem cell deficiency. *Experimental Eye Research*, 2026, vol. 262, art. 110737. https://doi.org/10.1016/j.exer.2025.110737

11. Lethager L. L., Bangsgaard S., Johansen E. M., Qayyum A. A., Christensen J. P., Ekblond A., Norgaard M. J., Hojgaard L. D. *In vitro* assays for investigating the immunomodulatory properties of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 2026, vol. 17, no. 1, art. 102. https://doi.org/10.1186/s13287-026-04920-x

12. Yurkina E. G., Krivenko S. I., Smol'nikova V. V., Primakova E. A., Nazarova E. A., Symanovich A. A., Dedyulya N. I., Romanova I. A., Efimov D. Yu., Shcherba A. E., Rummo O. O. Comparative analysis of the profile of expression of molecular markers of mesenchymal stem cells obtained from placental-umbilical cord complex tissues, adipose tissue and bone marrow. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2025, vol. 69, no. 4, pp. 314–321 (in Russian).

13. Li C.-Y., Wu X.-Y., Tong J.-B., Yang X.-X., Zhao J.-L., Zheng Q.-F., Zhao G.-B., Ma Z.-J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, art. 55. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5

14. Levchuk K. A., Malashicheva A. B. Regional functional heterogeneity of aortic smooth muscle cells in rats. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2017, vol. 48, no. 3, pp. 219–223. https://doi.org/10.1134/S1062360417030080

15. Kulinich S. S., Gain Yu. M., Shakhrai S. V., Vladimirskaya T. E. Animal model of anal incontinence in rats. *Nauchnye issledovaniya v meditsine: ot teorii k praktike: sbornik nauchnykh trudov nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu BelMAPO, 25 noyabrya 2016 goda* [Scientific research in medicine: from theory to practice: a collection of scientific papers from the scientific and practical conference dedicated to the 85th anniversary of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, November 25, 2016]. Minsk, 2016, pp. 436–441 (in Russian).

Информация об авторах

Кулинич Светлана Степановна – науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины БГМУ (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ksv010613@gmail.com. https://orcid.org/0009-0007-3387-941X

Шахрай Сергей Владимирович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: s.shakhrai@mail.ru

Зафранская Марина Михайловна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины БГМУ (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zafranskaya@gmail.com. https://orcid.org/0000-0002-8739-8300

Гаин Юрий Михайлович – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: juri.gain@yandex.by. https://orcid.org/0000-0001-7622-5642

Information about the authors

Svetlana S. Kulinich – Researcher. Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of the BSMU (83, Dzerzhinsky Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ksv010613@gmail.com. https://orcid.org/0009-0007-3387-941X

Siarhei V. Shakhrai – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s.shakhrai@mail.ru

Marina M. Zafranskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Chief Researcher. Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of the BSMU (83, Dzerzhinsky Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zafranskaya@gmail.com. https://orcid.org/0000-0002-8739-8300

Yury M. Gain – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: juri.gain@yandex.by. https://orcid.org/0000-0001-7622-5642