

В. И. Кирпатовский^{1,2}, Д. М. Камалов¹, А. Ю. Ефименко¹, П. И. Макаревич^{1,3},
Г. Д. Сагарадзе^{1,4}, О. А. Макаревич⁴, П. П. Нимирицкий^{1,4}, Е. О. Осидак⁵, С. П. Домогатский⁶,
В. К. Карпов³, Ж. А. Акоюн^{1,3}, В. А. Ткачук^{1,3}, А. А. Камалов^{1,3}

ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ПЛАСТИКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНИРОВАННОЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ СЕКРЕЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И КОЛЛАГЕНА I ТИПА

¹ Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва; ² НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н. А. Лопаткина – филиала ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Москва; ³ факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва; ⁴ ООО «Генная и клеточная терапия», Москва; ⁵ ООО ИМТЭК, Москва; ⁶ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Автор для связи: А. Ю. Ефименко – к.м.н., старший научный сотрудник Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: efimenkoan@gmail.com

Цель исследования: проблема заместительной пластики мочевого пузыря по-прежнему остается актуальной, несмотря на широкое использование кишечной цистопластики, в связи со сложностью операции и потенциально высоким риском осложнений. Перспективной альтернативой считается использование биоинженерных конструкций на основе препаратов коллагена, включающих стволовые клетки или продукты их секреции.

Материалы и методы исследования: для оценки эффективности этого метода цистопластики проведено 14 хронических экспериментов на кроликах-самцах, которым выполнили резекцию мочевого пузыря с замещением образовавшегося дефекта мембраной из коллагена I типа (1-я серия, 5 кроликов) или мембраной того же состава, включающей кондиционированную среду, содержащую продукты секреции мезенхимных стволовых/стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) человека (2-я серия, 5 кроликов). В группе сравнения (4 кролика) была проведена резекция мочевого пузыря и ушивание дефекта без заместительной цистопластики (3-я серия).

Результаты: через 1 мес после операции во всех случаях выявляли полную эпителизацию внутренней поверхности имплантата с замещением коллагеновой основы имплантата тканями организма. При этом в 1-й серии коллагеновый имплантат замещался преимущественно соединительной тканью с вращением единичных гладкомышечных клеток, тогда как во 2-й серии новообразованная стенка мочевого пузыря содержала массу гладкомышечных клеток, вращающихся в коллагеновый матрикс и формирующих мышечную оболочку. В 3-й серии также выявлялась регенерация мышечной оболочки в области рубца, но с меньшей интенсивностью, что подтверждено данными морфометрии. Во 2-й серии происходила более активная васкуляризация коллагенового имплантата за счет неангиогенеза, интенсивность которой превышала активность этого процесса в 3-й и особенно в 1-й сериях. Функциональные исследования показали, что в 1-й и 3-й сериях функциональная емкость мочевого пузыря оказалась сниженной, тогда как во 2-й серии она приближалась к нормальным значениям. При выполнении цистометрии наполнения динамика роста внутрипузырного давления во 2-й серии была близка к норме, а в 1-й и 3-й сериях уже после инфузии небольшого объема физиологического раствора отмечался выраженный подъем внутрипузырного давления, что свидетельствовало о сниженной комплаентности реконструированного мочевого пузыря.

Обсуждение: полученные результаты свидетельствуют, что имплантаты на основе коллагена I-го типа можно эффективно использовать для замещения части стенки мочевого пузыря, но более перспективно использование биоинженерных конструкций на коллагеновой основе, содержащих стимуляторы клеточной регенерации, секретируемые стволовыми клетками в среду их культивирования.

Ключевые слова: заместительная пластика мочевого пузыря, коллаген I типа, мезенхимные стволовые/стромальные клетки жировой ткани человека, продукты секреции стволовых клеток, биоинженерные конструкции

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Для цитирования: Кирпатовский В.И., Камалов Д.М., Ефименко А.Ю., Макаревич П.И., Сагарадзе Г.Д., Макаревич О.А., Нимирицкий П.П., Осидак Е.О., Домогатский С.П., Карпов В.К., Акоюн Ж.А., Ткачук В.А., Камалов А.А. Заместительная пластика мочевого пузыря с использованием комбинированной мембраны на основе продуктов секреции мезенхимных стволовых клеток человека и коллагена I типа. Урология. 2016;6:00–00

Введение. В урологической практике нередки ситуации, когда необратимо повреждается один из участков мочевых путей и возникает необходимость замещения поврежденного сегмента другим материалом. Эта ситуация возникает у больных с заболеваниями

мочевого пузыря при его злокачественном поражении или при доброкачественных заболеваниях, в лечении которых используется обширная резекция мочевого пузыря (интерстициальный цистит, нейрогенный мочевой пузырь, рефрактерный гиперак-

тивный мочевой пузырь и др.). Для замещения всего органа или его части обычно используются сегменты тонкой, толстой или прямой кишки, илеоцекального угла, большой кривизны желудка на сосудистой ножке [1–6].

Однако помимо высокой травматичности кишечной пластики мочевого пузыря, а также высокого риска развития хирургических осложнений имеется существенная проблема развития мочевой инфекции, камней мочевого резервуара, рака в пересаженном отделе кишки, а также метаболических нарушений, связанных с различной функцией слизистой оболочки пересаженного сегмента кишки или желудка и слизистой оболочки мочевых путей [7–10].

В связи с этим изучается вопрос об альтернативных вариантах заместительной пластики мочевых путей с использованием как специально обработанных аллогенных и ксеногенных тканей, так и искусственно созданных заменителей стенки органа. Одним из перспективных материалов является коллаген, выделенный из тканей животных, к достоинствам которого относятся отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, устойчивость к тканевым ферментам, регулируемая скорость лизиса в организме, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами, стимуляция собственных тканей организма [11–12]. Особенностью белков данного класса является их филогенетическое родство у разных видов животных и человека, что позволяет использовать ксеногенный коллаген для разработки биоматриц [13]. Коллаген считается одним из наиболее перспективных материалов временного направляющего каркаса для регенерации за счет постепенного замещения прилегающими собственными тканями организма, что выгодно отличает его от синтетических полимерных материалов, используемых в реконструктивной хирургии [14].

Проведенное нами ранее экспериментальное исследование показало, что заместительная пластика мочевого пузыря после его резекции мембраной из свиного коллагена I типа приводит к хорошим результатам, обеспечивая герметичность реконструированного органа и постепенное замещение коллагенового имплантата собственными тканями организма [15]. Однако полученные нами результаты и данные литературы свидетельствуют, что наряду с хорошей приживляемостью коллагеновые мембраны не обеспечивали ожидаемого увеличения объема мочевого пузыря и уменьшения его ригидности, что было связано с замещением коллагенового каркаса преимущественно соединительной тканью при слабой регенерации мышечной ткани [11, 16–18].

В связи с этим актуален вопрос о стимуляции васкуляризации и врастания клеток из окружающих тканей в имплантированный коллагеновый каркас для формирования полноценной стенки мочевого пузыря. С этой целью используют его покрытие стволовыми клетками различного происхождения (аутологичными или аллогенными мезенхимальными клетками костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови, амниотической жидкости и др.) [19–24]. Поскольку стимуляция регенерации при терапии стволовыми и прогениторными клетками осу-

ществляется преимущественно за счет секреции ими комплекса сигнальных молекул [25–27], ряд авторов предлагают включать в состав мембран компонентов этого комплекса (факторы роста тромбоцитов ВВ и СС, основной фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста эпидермиса, инсулиноподобный фактор роста-1, трансформирующий фактор роста β), также получая положительные функциональные результаты [28–34].

По нашему мнению, использование сбалансированного комплекса секреторных компонентов, продуцируемых стволовыми и прогениторными клетками и стимулирующих регенерацию органа, может оказать более выраженный эффект, чем использование отдельных его компонентов.

Целью настоящего исследования было изучить эффективность заместительной пластики мочевого пузыря мембраной из коллагена I типа, содержащей концентрированную кондиционированную среду (КС) мезенхимных стволовых/стромальных клеток, выделенных из жировой ткани человека (МСК ЖТ), по сравнению с использованием стандартной коллагеновой мембраны, не содержащей этого компонента.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены в хронических опытах на 14 новозеландских кроликах-самцах массой 3–3,5 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария на рационе из специального комбикорма с неограниченным доступом к воде. Все эксперименты проводили с соблюдением принципов Европейской конвенции о гуманном отношении к животным. Опыты обязательно проводились в условиях общего обезболивания. Эвтаназия животных произведена избыточным введением наркотического вещества (тиопентала натрия).

Методика операций. Всем животным выполнена резекция мочевого пузыря с удалением части стенки размером 2x2 см, что уменьшило его емкость примерно на 40%. У 5 кроликов дефект замещали стандартной мембраной, изготовленной из свиного коллагена I типа (коллагеновая мембрана «Matritek» производства ООО фирмы «Имтек») (1-я серия), у 5 кроликов – мембраной того же состава, включающей КС МСК ЖТ (2-я серия). Четырём животным (3-я серия) произвели ушивание образовавшегося дефекта.

Все операции проведены в условиях общего наркоза с использованием смеси препаратов золетил 100 («Virbac S.A.») и XylaVET professional (Pharmmagist Kft) в соотношении 2:1 с доведением концентрации золетила до 30 мг/мл физиологическим раствором. Полученный раствор введен в концентрации 1 мл/кг внутримышечно. Для профилактики инфекционных осложнений внутримышечно введен антибиотик (гентамицин 40 мг внутримышечно или амоксицилин 200 мг внутривенно однократно).

После введения в наркоз катетеризировали мочевой пузырь по уретре для выведения мочи и определения исходной функциональной емкости мочевого пузыря. Производили нижнесрединную лапаротомию и выводили в рану мочевого пузыря. В бессосудистой зоне иссекали участок стенки органа размером примерно 2x2 см. Дефект стенки или ушивали или замещали коллагеновой мембраной с



Рис. 1. Внешний вид стерильной упакованной коллагеновой мембраны

ее анастомозированием со стенкой мочевого пузыря непрерывным обвивным швом атравматической нитью «Vicryl» 4/0. Затем мочевой пузырь погружали в брюшную полость и ушивали лапаротомную рану, используя непрерывный обвивной шов для ушивания мышечной стенки и отдельные узловые швы на кожу атравматической нитью Vicryl 2/0.

Методика изготовления коллагеновых мембран, содержащих или не содержащих КС МСК ЖТ. Стерильный прозрачный нейтральный раствор коллагена I типа, выделенного из тканей животных («ВИСКОЛЛ», кат. P C11-ND, производство ООО фирмы «ИМТЕК», Россия), в объеме 1 мл помещали в стерильную культуральную чашку с площадью поверхности 2 см². Затем чашку перемещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37°C до тех пор, пока не формировался гидрогель, который в дальнейшем подвергали сушке в асептических условиях при температуре 20–25°C в течение 7 дней. Процесс сушки считался полностью завершенным, когда гидрогель переходил в форму жесткого стеклоподобного материала. Полученные таким образом мембраны расфасовывали в индивидуальную стерильную упаковку с соответствующей маркировкой (рис. 1).

Для изготовления коллагеновых мембран, содержащих КС МСК ЖТ, предварительно культивировали МСК, выделенные из подкожной жировой ткани здоровых доноров обоих полов, полученной при проведении малого хирургического вмешательства под местной анестезией или в ходе плановых хирургических операций. Для выделения клеток биоматериал в стерильных условиях ламинарного бокса измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких (размером не более 2 мм³) кусочков и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (200 ЕД/мл, «Worthington Biochemical», США) и диспазы (40 ЕД/мл, «Sigma», Германия) при соотношении объема ткани (в мл) к объему ферментативного раствора (в мл) 1:2. Образец инкубировали при 37°C в течение 30–45 мин при постоянном встряхивании. По окончании инкубации добавляли равный объем среды роста МСК и центрифугировали при 200 g в течение 8 мин. Белесый поверхностный слой, состоящий из зрелых адипоцитов и кусочков ферментативно необработанной ткани, удаляли с помощью вакуумного насоса, а осадок, состоявший из клеток стромы жировой ткани, клеток сосудистой стенки и крови, суспендировали в стерильной деионизованной воде для лизирования эритроцитов.

Чтобы восстановить осмотическое давление, добавляли соответствующий объем 10-кратного фосфатного буфера, а затем фильтровали через нейлоновые фильтры размером пор 100 мкм («BD Falcon Cell Strainer», США) и центрифугировали при 200 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимных прогениторных клеток человека (Advance Stem Cell Basal Medium, далее — AdvanceSM, «HyClone», США), содержащей 10% смеси факторов роста (Advance Stem Cell Growth Supplement, «HyClone») и 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина («HyClone»). Выделенные клетки высаживали на чашки Петри («Corning», США) в концентрации 5x10⁴/см³ и инкубировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂; 95% воздуха) при 37°C. На следующий день в чашках меняли среду для удаления неприкрепившихся клеток. Смену среды проводили каждые 2–3 дня; при достижении 70–80% конfluence клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием раствора QTase («HyClone»). Жизнеспособность клеток оценивали путем окраски клеток раствором трипанового синего и подсчета количества живых и мертвых клеток с помощью счетчика клеток (Cell Counter, «Invitrogen», США).

Для получения кондиционированной среды МСК ЖТ 4–5 пассажа, достигших 80% конfluence, промывали трехкратно раствором Хэнкса («ПанЭко», Россия). К чашкам добавляли среду DMEM-LG. Клетки культивировали в течение 7 дней, после чего кондиционированную среду собирали, очищали от клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 10 мин при 300 g, затем концентрировали в 50 раз с помощью ультрафильтрации через мембраны из регенерированной целлюлозы с указанным отечением 10 кДа в центрифужных картриджах («Millipore», США).

Полученную концентрированную КС смешивали с 2,5%-ным свиным стерильным нейтральным коллагеновым гелем («ВИСКОЛЛ», кат. P C11-ND, производство ООО фирмы «ИМТЕК», Россия) в соотношении по объему 1:4. Затем инкубировали смесь при 4°C в течение 2 ч. Полученный раствор равномерно распределяли на дне лунки 24-луночного планшета с площадью поверхности около 2 см², помещали планшет в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, пока не сформируется гидрогель. Приготовленный гидрогель в планшете высушивали в асептических условиях при температуре 37°C до полного высыхания. Процесс сушки считали полностью завершенным, когда гидрогель переходил в форму жесткого стеклоподобного материала.

Методы оценки результатов исследования. Оценку результатов исследования проводили через 1 мес после операции. Сравнимые показатели: оценка степени интеграции коллагенового имплантата в окружающие ткани мочевого пузыря, степень регенерации слизистой оболочки и гладкомышечных клеток в новообразованной стенке, полноценность восстановления в ней кровообращения и состояние резервуарной функции реконструированного мочевого пузыря. Для функциональных исследований производили пункцию мочевого пузыря в области его верхушки внутривенным катетером G20, подсоеди-

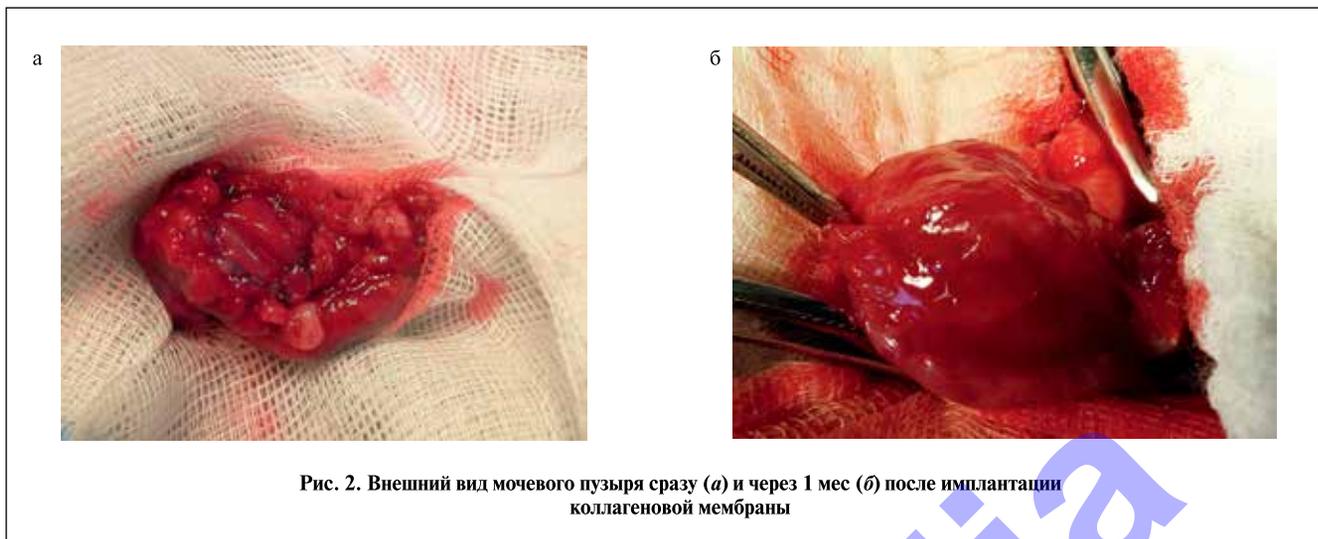


Рис. 2. Внешний вид мочевого пузыря сразу (а) и через 1 мес (б) после имплантации коллагеновой мембраны

диненным к инфузионной системе и датчику давления. Функциональное исследование выполняли как на опорожненном мочевом пузыре, так и в процессе проведения цистометрии наполнения, что позволило определить его комплаентность путем определения динамики возрастания внутрипузырного давления при разной степени наполнения мочевого пузыря и его максимальную цистометрическую емкость.

В конце эксперимента удаляли мочевой пузырь, визуально оценивали степень эпителизации внутренней поверхности имплантированной мембраны и брали образцы ткани для гистологического и морфометрического исследования.

Полученные цифровые данные подвергали статистической обработке с помощью компьютерных программ Excel 2007 и Statistica 8.0. Усредненные значения в исследуемых группах выражали в виде средней арифметической \pm ошибка средней ($M \pm m$). Достоверность различий между группами определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Вилкоксона–Манна. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В экспериментах с имплантацией стандартной коллагеновой мембраны при ревизии области операции через 1 мес в обеих сериях выявляли полную интеграцию вшитой мембраны в стенку мочевого пузыря (рис. 2). Область вшитой мембраны прикрыта новообразованными тканями.

При вскрытии мочевого пузыря установлено, что внутренняя поверхность имплантированной стандартной мембраны почти на всем протяжении покрыта слизистой оболочкой с небольшими участками оставшегося нерассосавшегося коллагена. Слизистая оболочка новообразованной стенки выглядела слегка цианотичной (рис. 3, а). В опытах с имплантацией коллагеновой мембраны с КС МСК ЖТ также выявлена полная эпителизация внутренней поверхности. Новообразованная слизистая оболочка выглядела нормальной, сохраняла типичную складчатость (рис. 3, б).

При гистологическом исследовании в препаратах с имплантацией стандартной коллагеновой мембраны констатировали субтотальное ее замещение соединительной тканью с вращением отдельных кровеносных сосудов (рис. 4, а). Люминальная поверхность почти полностью эпителизована, но эпите-



Рис. 3. Внешний вид внутренней поверхности реконструированного мочевого пузыря через 1 мес. после имплантации стандартной коллагеновой мембраны (а) и мембраны с КС МСК ЖТ (б)

лий выглядел атрофичным, а в отдельных участках отсутствовал. В ткани, заместившей коллагеновую мембрану, выявлены лишь единичные гладкомышечные клетки, т.е. на месте мембраны сформировался преимущественно соединительнотканый каркас (рис. 4, б).

Гистологическое исследование препаратов при имплантации мембраны с КС МСК ЖТ выявило ее почти полное замещение тканью мочевого пузыря. Люминальная поверхность имплантата была выстлана слизистой оболочкой, состоявшей из полноценной уротелиальной выстилки (многорядным эпителием) и подслизистого слоя, содержавшего полнокровные кровеносные сосуды (рис. 5, а). Новообразованная стенка мочевого пузыря содержала комплексы гладкомышечных клеток в значительном количестве, между которыми имелись тонкие прослойки соединительной ткани (рис. 5, б). Гладкомышечные клетки активно вращали в оставшийся коллаген. В новообразованной стенке имел место активный ангиогенез (рис. 5, в).

Для более точной характеристики активности регенерационных процессов мы провели количественную оценку морфометрических параметров, характеризующих их интенсивность, сравнив изучаемые показатели в группах с цистопластикой с данными серии с ушиванием мочевого пузыря (см. таблицу). Результаты этого анализа показали, что по сравнению с опытами с ушиванием дефекта стенки мочевого пузыря без цистопластики использование

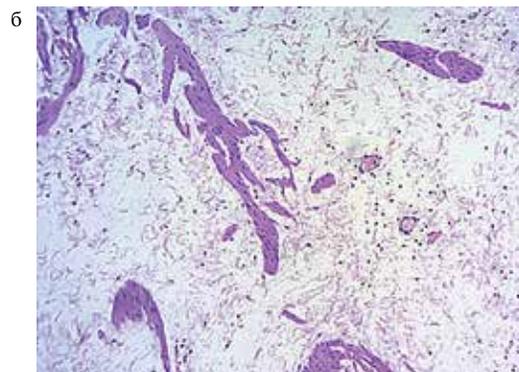
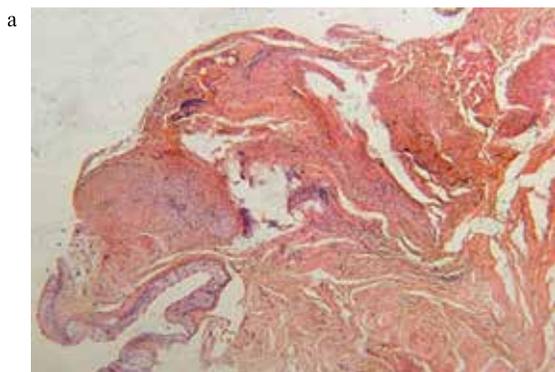


Рис. 4. Гистологическая картина через 1 мес после заместительной цистопластики с использованием стандартной коллагеновой мембраны. Окраска гематоксилином и эозином

a — общий вид зоны имплантации, окраска гематоксилином и эозином, ув. 100; *б* — единичные гладкомышечные клетки, окруженные соединительной тканью, заместившей коллагеновую мембрану, ув. 400.

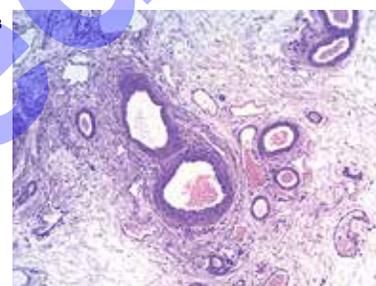
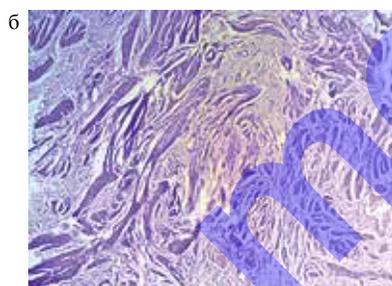
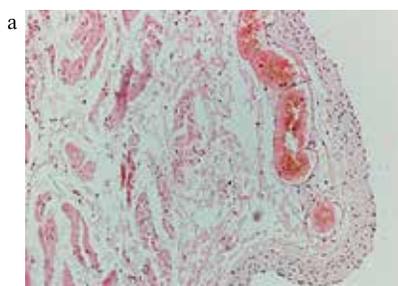


Рис. 5. Гистологическая картина зоны реконструкции мочевого пузыря через 1 мес после цистопластики с использованием коллагеновой мембраны с КС МСК ЖТ. Окраска гематоксилином и эозином

a — формирование полноценной слизистой оболочки, ув. 100; *б* — регенерация гладкомышечных клеток в новообразованной стенке мочевого пузыря, ув. 200; *в* — множественные новообразованные сосуды в регенерирующей стенке мочевого пузыря, ув. 200.

стандартной коллагеновой мембраны характеризовалось большей протяженностью деэпителизированных участков базальной мембраны новообразованной слизистой, сохранением значительных участков нерезорбированного коллагена, меньшей плотностью новообразованных сосудов, а также значительно менее выраженной регенерацией гладкомышечных клеток в зоне операции. В то же время в опытах с замещением резецированной стенки мембраной

с КС МСК ЖТ отмечены почти полная резорбция имплантированной мембраны, наименьшие значения деэпителизированной внутренней поверхности стенки, наиболее выраженный ангиогенез и активная регенерация гладкомышечных клеток, по интенсивности значительно превышающая этот показатель в других сериях.

Таким образом, при использовании мембран с КС МСК ЖТ происходит более быстрая и более

Т а б л и ц а
Морфометрические параметры регенерации стенки мочевого пузыря через 1 мес после его резекции в различных сериях

Параметр	Резекция без цистопластики	Цистопластика мембраной без КС	Цистопластика мембраной с КС
Относительная занятая площадь ГМК среди рыхлой соединительной ткани, мкм ²	1,2±0,2	5,2±0,2	246,2±12,1***
Относительная длина деэпителизированной базальной мембраны в слизистой оболочке мочевого пузыря, мкм	281,8±13,3	316,1±31,1	164,1±22,2**
Относительная площадь участков нерассосавшегося коллагена, мкм ²	—	106,2±12,5	27,1± 9,3***
Количество сосудистых почек на единице относительной площади стенки мочевого пузыря	10,1±0,2	8,0±0,03	15,3±0,2***

П р и м е ч а н и е. Статистическая значимость различий: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

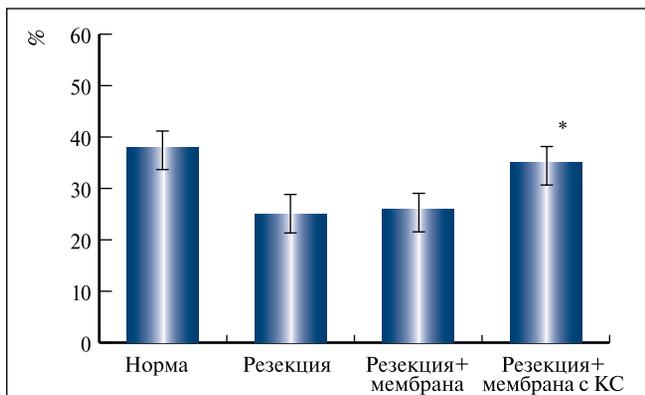


Рис. 6. Показатели максимальной емкости мочевого пузыря (в мл) через 1 мес. после его резекции без и с заместительной цистопластикой различными коллагеновыми мембранами

* — различия статистически значимы ($p < 0,05$) по сравнению с показателями при резекции мочевого пузыря без цистопластики.

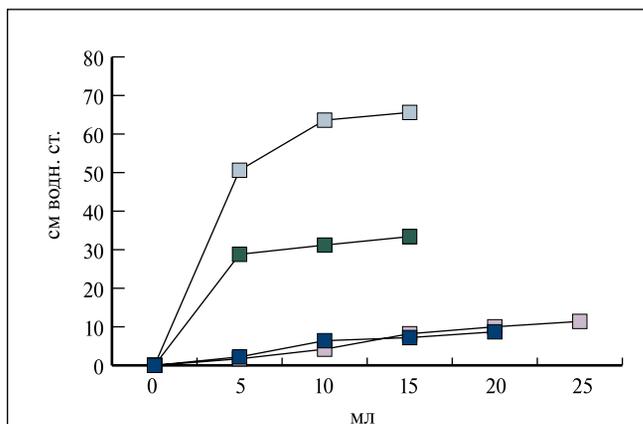


Рис. 7. Зависимость «объем/давление» при инфузионной цистометрии в разных сериях опытов

полноценная регенерация новообразованной стенки мочевого пузыря, замещающей постепенно резорбирующийся имплантат по сравнению со стандартной коллагеновой мембраной.

Важным моментом в нашем исследовании было определить: улучшает ли методика заместительной цистопластики коллагеновыми мембранами функциональное состояние резецированного мочевого пузыря наряду с ускорением регенерации его стенки, а если улучшает, то в какой степени? При исследовании функции реконструированного мочевого пузыря мы оценивали параметры, характеризующие функцию накопления. При изучении максимальной функциональной емкости мочевого пузыря сразу после резекции и через 1 мес выявлено, что в серии опытов с резекцией мочевого пузыря без цистопластики сразу после резекции его максимальная емкость уменьшилась с 38 ± 1 до 23 ± 1 мл ($p < 0,001$). Через 1 мес после резекции она существенно не изменилась, составив 25 ± 1 мл. В опытах с замещением дефекта стенки мочевого пузыря после его резекции стандартной коллагеновой мембраной через 1 мес после операции максимальная емкость мочевого пузыря составила 26 ± 1 мл, а при использовании коллагеновой мембраны, содержащей КС МСК ЖТ, она статистически значимо ($p < 0,01$) возросла до 35 ± 2 мл, приблизившись к нормальным значениям (рис. 6).

Другой важный показатель функционального состояния мочевого пузыря — способность его стенки сохранять низкий тонус при постепенном наполнении мочой без резкого роста внутрипузырного давления (показатель «объем/давление», характеризующий комплаентность мочевого пузыря). Проведенное исследование показало, что в серии опытов, где дефект мочевого пузыря замещали коллагеновой мембраной с КС МСК ЖТ, комплаентность реконструированного мочевого пузыря не отличалась от нормы, которая определялась путем проведения цистометрии наполнения на интактном мочевом пузыре до проведения на нем хирургических манипуляций. В серии опытов, где использовали коллагеновую мембрану без кондиционированной среды, а также при резекции без цистопластики

отмечали резкое повышение внутрипузырного давления даже при небольшом объеме введенной жидкости (рис. 7). То есть в этих опытах комплаентность реконструированного мочевого пузыря оказалась значительно сниженной, что может быть связано с тем, что часть стенки органа замещалась функционально неактивной соединительной тканью, обладающей относительно высокой жесткостью, тогда как при использовании для цистопластики мембраны со средой культивирования стволовых клеток в новообразованной стенке регенерировали функционально активные гладкомышечные клетки (рис. 4, 5). Наихудшие результаты, полученные в опытах с резекцией мочевого пузыря без цистопластики, могут быть связаны с уменьшением его функциональной емкости (рис. 6) и рубцеванием стенки в зоне ушивания дефекта.

Обсуждение. Таким образом, результаты проведенного исследования убедительно показали, что включение в состав коллагеновой мембраны кондиционированной среды, содержащей продукты секреции МСК ЖТ человека, существенно повышает ее способность полноценно замещать стенку мочевого пузыря. Хотя использование стандартной мембраны из коллагена I типа также позволяет заместить часть стенки органа с сохранением его герметичности, новообразованная стенка оказывается малофункциональной, так как состоит преимущественно из соединительной ткани, заместившей коллагеновую основу, в результате чего происходит неполное восстановление функциональной емкости мочевого пузыря и его комплаентности. Включение в состав мембраны КС МСК ЖТ за счет стимуляции неогенеза, вставания и регенерации гладкомышечных клеток и более полноценной эпителизации внутренней поверхности обеспечивает практически полное восстановление показателей, характеризующих накопительную функцию реконструированного мочевого пузыря.

Рядом авторов показано, что именно паракринная активность стволовых клеток (секреция комплекса факторов роста, цитокинов, противовоспалительных пептидов и других факторов) служит основным

механизмом стимуляции регенерации поврежденных органов за счет активации резидентных стволовых клеток и стимуляции регенерации дифференцированных функционально активных клеток [25–27]. Включение этих факторов в состав биоинженерных конструкций, используемых для замещения мочевых путей, значительно повышало их функциональные свойства [32, 35, 36]. При этом отмечалось, что использование комплекса сигнальных молекул оказывает более выраженный стимулирующий эффект, чем каждая из них по отдельности [31, 37, 38]. Данные литературы свидетельствуют, что эффект иммобилизованных на коллагеновом матриксе молекул, секретируемых стволовыми и прогениторными клетками, сопоставим со стимулирующим действием самих клеток. Также доказано, что стимуляция регенерации клеточных структур при заместительной пластике мочевого пузыря происходит за счет постепенного высвобождения биологически активных факторов из коллагеновой основы [30, 39, 40].

Полученные нами результаты подтверждают перспективность такого подхода. Включение в состав коллагеновой мембраны полного комплекса продуктов, секретируемых стволовыми и прогениторными клетками, в среду их культивирования значительно повышало функциональную полноценность новообразованной стенки мочевого пузыря, сформировавшейся на месте имплантированной мембраны. Использование иммобилизованных на коллагеновой основе сигнальных молекул в перспективе может быть решением ряда проблем, связанных с использованием стволовых клеток, в частности дефицита клеточного материала, иммунологических, юридических и др.

Работа выполнена на базе Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова и факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение о субсидии № 14.607.21.0045 от 22.08.2014, уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0045).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lopatkin N.A., Darenkov S.P., Chernyshev I.V. Radical treatment of invasive bladder cancer. *Urologiia*. 2003;4:3–8. Russian (Лопаткин Н.А., Даренков С.П., Чернышев И.В. Радикальное лечение инвазивного рака мочевого пузыря. *Урология*. 2003;4:3–8).
2. Loran O.B., Sinyakova L.A., Mitrokhin A.A., Plesovskii A.M., Shteinberg M.L., Vinarova N.A. The contemporary view on the problem of interstitial cystitis. *Meditsinskii sovet*. 2011;11–12:15–19. Russian (Лоран О.Б., Синякова Л.А., Митрохин А.А., Плесовский А.М., Штейнберг М.Л., Винарова Н.А. Современный взгляд на проблему интерстициального цистита. *Медицинский совет*. 2011;11–12:15–19).
3. Matveev B.P. *Urinary bladder cancer*. M., 2001. Russian (Матвеев Б.П. Рак мочевого пузыря. М., 2001).
4. Abdel-Aziz M.S., Abdel-Hakim A.M. Gastrocystoplasty in patients with an areflexic low compliant bladder. *Eur Urol*. 2003;44(2): 260–265.
5. Hara I., Miyake H., Hara S. et al. Health-related quality of life after radical cystectomy for bladder cancer: a comparison of ileal conduit and orthotopic bladder replacement. *BJU Int*. 2002;89:10.
6. Cohen A.J., Brodie K., Murthy P., Wilcox D.T., Gundeti M.S. Comparative Outcomes and Perioperative Complications of Robotic Vs. Open Cystoplasty and Complex Reconstructions. *Urology*. 2016 Jul 18. pii: S0090-4295(16)30410-1. doi:10.1016/j.urology.2016.06.053.
7. Darenkov S.P., Krivoborodov G.G., Kotov S.V., Dzitiev V.K., Proskokov A.A., Pinchuk I.S. Complications of radical cystectomy with orthotand heterotopic intestinal substitution (A literature review). *Vestnik Rossiiskogogosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013;4:49–53. Russian (Даренков С.П., Кривобородов Г.Г., Котов С.В., Дзитиев В.К., Проскоков А.А., Пинчук И.С. Осложнения радикальной цистэктомии с орто- и гетеротопической кишечной пластикой (обзор литературы). *Вестник Российской государственного медицинского университета*. 2013;4:49–53).
8. Semenyakin I.V., Vasil'chenko M.I., Zelenin D.A., Yashin E.A. Complications after cystectomy and their treatment. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2012;4-1(86):84–86. Russian (Семенякин И.В., Васильченко М.И., Зеленин Д.А., Яшин Е.А. Осложнения после цистэктомии и их лечение. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012;4-1(86):84–86).
9. Chang S.S., Cookson M.S., Baumgartner R.G., Wells N., Smith J.A. Jr. Analysis of Early Complications After Radical Cystectomy: Results of a Collaborative Care Pathway. *J. Urol*. 2002;167:2012–2016.
10. de Freitas Filho L.G., Carnevale J., Leão J.Q., Schor N., Ortiz V. Gastrocystoplasty and chronic renal failure: an acid-base metabolism study. *J. Urol*. 2001;166(1):251–254.
11. Lin H.K., Madihally S.V., Palmer B., Frimberger D., Fung K.M., Kropp B.P. Biomatrices for bladder reconstruction. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;82-83:47–63. Doi: 10.1016/j.addr.2014.11.020.
12. Shchukina E.V., Sapozhnikova A.I. Collagen in medicine and cosmetology. *Natural'naya farmakologiya i kosmetologiya*. 2005;4:29–34. Russian (Щукина Е.В., Сапожникова А.И. Коллаген в медицине и косметологии. *Натуральная фармакология и косметология*. 2005;4:29–34).
13. Begma A.N., Begma I.V., Khomyakova E.K. Experience in the use of Meturakol collagen dressings and sponges in surgical practice. *RMZh*. 2014;17:1248–1253. Russian (Бегма А.Н., Бегма И.В., Хомякова Е.К. Опыт применения коллагеновых повязок и губок Метуракол в хирургической практике. *РМЖ*. 2014;17:1248–1253).
14. Ivanova L.A. *Collagen in the technology of medicinal forms*. M.: Meditsina. 1984. 112 p. Russian (Иванова Л.А. Коллаген в технологии лекарственных форм. М.: Медицина. 1984. 112 с.).
15. Kirpatovskii V.I., Efimenko A.Yu., Syssoeva V.Yu., Mudraya I.S., Kamalov D.M., Akopyan Zh.A., Kamalov A.A. The use of collagen membrane type 1 for the replacement of the bladder wall. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2016;7:117–123. Russian (Кирпатовский В.И., Ефименко А.Ю., Сысоева В.Ю., Мудрая И.С., Камалов Д.М., Акопян Ж.А., Камалов А.А. Использование мембраны из коллагена 1-го типа для замещения стенки мочевого пузыря. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016;7:117–123).
16. Caione P., Boldrini R., Salerno A., Nappo S.G. Bladder augmentation using acellular collagen biomatrix: a pilot experience in exstrophic patients. *Pediatr Surg Int*. 2012;28(4):421–28. doi: 10.1007/s00383-012-3063-0.
17. Tu D.D., Seth A., Gil E.S., Kaplan D.L., Mauney J.R., Estrada C.R. Jr. Evaluation of biomaterials for bladder augmentation using cytometric analyses in various rodent models. *J Vis Exp*. 2012;(66). pii: 3981. doi: 10.3791/3981.
18. Joseph D.B., Borer J.G., De Filippo R.E., Hodges S.J., McLorie G.A. Autologous cell seeded biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: phase II study in children and adolescents with spina bifida. *J Urol*. 2014;191(5):1389–95. Doi: 10.1016/j.juro.2013.10.103.
19. Chun S.Y., Kwon J.B., Chae S.Y., Lee J.K., Bae J.S., Kim B.S., Kim H.T., Yoo E.S., Lim J.O., Yoo J.J., Kim W.J., Kim B.W., Kwon T.G. Combined injection of three different lineages of early-differentiating human amniotic fluid-derived cells restores urethral sphincter function in urinary incontinence. *BJU Int*. 2014;114(5):770–83. doi: 10.1111/bju.12815.
20. Yuan H., Zhuang Y., Xiong J., Zhi W., Liu L., Wei Q., Han P. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix

- grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model. *PLoS One*. 2013;8(11):e80959. doi: 10.1371/journal.pone.0080959.
21. Ma D., Ren L., Mao T. Research progress of cell sheet technology and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2014;31(5):1164–1167.
 22. Kates M., Singh A., Matsui H., Steinberg G.D., Smith N.D., Schoenberg M.P., Bivalacqua T.J. Tissue-engineered urinary conduits. *Curr Urol Rep*. 2015;16(3):8. Doi: 10.1007/s11934-015-0480-3.
 23. Qin D., Long T., Deng J., Zhang Y. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):69. doi: 10.1186/scrt458.
 24. Meng L.C., Liao W.B., Yang S.X., Xiong Y.H., Song C., Liu L.Q. Seeding Homologous Adipose-Derived Stem Cells and Bladder Smooth Muscle Cells Into Bladder Submucosa Matrix for Reconstructing the Ureter in a Rabbit Model. *Transplant Proc*. 2015;47(10):3002–11. doi:10.1016/j.transproceed.2015.10.035.
 25. Adamowicz J., Pokrywczyńska M., Drewa T. Conditioned medium derived from mesenchymal stem cells culture as a intravesical therapy for cystitis interstitialis. *Med Hypotheses*. 2014;82(6):670–73. Doi: 10.1016/j.mehy.2014.02.027.
 26. Pokrywczyńska M., Jundzill A., Bodnar M., Adamowicz J., Tworkiewicz J., Szyberg L., Debski R., Marszałek A., Drewa T. Do mesenchymal stem cells modulate the milieu of reconstructed bladder wall? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(6):483–93. doi:10.1007/s00005-013-0249-7.
 27. Bury M.I., Fuller N.J., Wethekam L., Sharma A.K. Bone marrow derived cells facilitate urinary bladder regeneration by attenuating tissue inflammatory responses. *Cent European J Urol*. 2015;68(1):115–20. doi: 10.5173/cej.2015.01.526.
 28. Loai Y., Yeager H., Coz C., Antoon R., Islam S.S., Moore K., Farhat W.A. Bladder tissue engineering: tissue regeneration and neovascularization of HA-VEGF-incorporated bladder acellular constructs in mouse and porcine animal models. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(4):1205–15. Doi: 10.1002/jbm.a.32777.
 29. Domingos A.L., Garcia S.B., Bessa Junior Jd, Cassini M.F., Molina C.A., Tucci Junior S. Expression of VEGF and collagen using a latex biomembrane as bladder replacement in rabbits. *Int Braz J Urol*. 2012;38(4):536–543.
 30. Chen W., Shi C., Yi S., Chen B., Zhang W., Fang Z., Wei Z., Jiang S., Sun X., Hou X., Xiao Z., Ye G., Dai J. Bladder regeneration by collagen scaffolds with collagen binding human basic fibroblast growth factor. *J Urol*. 2010;183(6):2432–39. Doi: 10.1016/j.juro.2010.02.042.
 31. Yang B., Zhou L., Peng B., Sun Z., Dai Y., Zheng J. In vitro comparative evaluation of recombinant growth factors for tissue engineering of bladder in patients with neurogenic bladder. *J Surg Res*. 2014;186(1):63–72. Doi: 10.1016/j.jss.2013.07.044
 32. Roelofs L.A., Oosterwijk E., Kortmann B.B., Daamen W.F., Tiemessen D.M., Brouwer K.M., Eggink A.J., Crevels A.J., Wijnen R.M., van Kuppevelt T.H., Geutjes P.J., Feitz W.F. Bladder Regeneration Using a Smart Acellular Collagen Scaffold with Growth Factors VEGF, FGF2 and HB-EGF. *Tissue Eng Part A*. 2016;22(1–2):83–92. Doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0096.
 33. Lee J.N., Chun S.Y., Lee H.J., Jang Y.J., Choi S.H., Kim D.H., Oh S.H., Song P.H., Lee J.H., Kim J.K., Kwon T.G. Human Urine-derived Stem Cells Seeded Surface Modified Composite Scaffold Grafts for Bladder Reconstruction in a Rat Model. *J Korean Med Sci*. 2015;30(12):1754–63. Doi: 10.3346/jkms.2015.30.12.1754.
 34. Chen W., Shi C., Hou X., Zhang W., Li L. Bladder acellular matrix conjugated with basic fibroblast growth factor for bladder regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(15–16):2234–42. Doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0730.
 35. Lorentz K.M., Yang L., Frey P., Hubbell J.A. Engineered insulin-like growth factor-1 for improved smooth muscle regeneration. *Biomaterials*. 2012;33(2):494–503. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.088.
 36. Vardar E., Larsson H.M., Engelhardt E.M., Pinnagoda K., Briquez P.S., Hubbell A., Frey P. IGF-1-containing multi-layered collagen-fibrin hybrid scaffolds for bladder tissue engineering. *Acta Biomater*. 2016;41:75–85. Doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.010.
 37. Zhou L., Yang B., Sun C., Qiu X., Sun Z., Chen Y., Zhang Y., Dai Y. Coadministration of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor with bladder acellular matrix enhances smooth muscle regeneration and vascularization for bladder augmentation in a rabbit model. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(1–2):264–76. Doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0609.
 38. Jiang X., Lin H., Jiang D., Xu G., Fang X., He L., Xu M., Tang B., Wang Z., Cui D., Chen F., Geng H. Co-delivery of VEGF and bFGF via a PLGA nanoparticle-modified BAM for effective contracture inhibition of regenerated bladder tissue in rabbits. *Sci Rep*. 2016;6:20784. doi: 10.1038/srep20784.
 39. Jiang X., Xiong Q., Xu G., Lin H., Fang X., Cui D., Xu M., Chen F., Geng H. VEGF-Loaded Nanoparticle-Modified BAMAs Enhance Angiogenesis and Inhibit Graft Shrinkage in Tissue-Engineered Bladder. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(10):2577–86. Doi: 10.1007/s10439-015-1284-9.
 40. Xiong Q., Lin H., Hua X., Liu L., Sun P., Zhao Z., Shen X., Cui D., Xu M., Chen F., Geng H. A nanomedicine approach to effectively inhibit contracture during bladder acellular matrix allograft-induced bladder regeneration by sustained delivery of vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(1–2):45–52. Doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0671.

Поступила 04.10.16

Принята в печать 08.11.16

Received 04.10.16

Accepted 08.11.16

URINARY BLADDER SUBSTITUTION USING COMBINED MEMBRANE BASED ON SECRETIONS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND TYPE I COLLAGEN

V.I. Kirpatovskii^{1,2}, D.M. Kamalov¹, A.Yu. Efimenko¹, P.I. Makarevich^{1,3}, G.D. Sagaradze^{1,4}, O.A. Makarevich⁴, P.P. Nimiritskii^{1,4}, E.O. Osidak⁵, S.P. Domogatskii⁶, V.K. Karpov³, Zh.A. Akopyan^{1,3}, V.A. Tkachuk^{1,3}, A.A. Kamalov^{1,3}

¹Medical Scientific Educational Center of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow; ²N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of P. A. Herzen Federal Medical Research Center of Minzdrav of Russia, Moscow; ³Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University, Moscow; ⁴LLC «Gene and Cell Therapy», Moscow; ⁵LLC IMTEK, Moscow; ⁶Russian Cardiology Scientific Industrial Complex of Minzdrav of Russia, Moscow

Corresponding author: A. Yu. Efimenko – PhD, Senior Research Fellow at the Institute for Regenerative Medicine, Medical Scientific Educational Center of M.V. Lomonosov Moscow State University; e-mail: efimenkoan@gmail.com

Aim. Despite the widespread use of intestinal cystoplasty, urinary bladder substitution remains a challenging problem due to the complexity of operations and the potentially high risk of complications. A promising alternative may be bio-engineered collagen-based matrices containing stem cells or their secretions.

Material and methods. To evaluate the effectiveness of this bladder substitution modality, an experiment was conducted on 14 male rabbits. The animals underwent resection of urinary bladder, and the formed defect was substituted with a membrane of type I collagen (series 1, 5 rabbits) or a membrane of the same composition containing a conditioned medium with secretion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human adipose tissue (series 2, 5 rabbits). In the comparison group (4 rabbits) resection of the bladder and the closure of the defect was carried out without bladder substitution (series 3).

Results. At 1 month after surgery, there was a complete epithelization of the inner surface of the implant, and body tissues replaced the collagen matrix. In series 1, the collagen implant was replaced mainly by connective tissue ingrown with occasional solitary smooth muscle cells. In series 2, the newly formed bladder wall contained numerous smooth muscle cells, growing into the collagen matrix and forming the muscular coat. In series 3, the muscular layer regeneration at the scar site was also noted, but it was less intense, which was confirmed by morphometry. In series 2, more active vascularization of the collagen implant occurred due to neo-angiogenesis, which was more intense than that in series 3, and especially in series 1. Functional studies revealed a reduced bladder functional capacity in series 1 and 3, while in series 2 it was close to normal. During filling cystometry, changes in intra-vesical pressure profile in series 2 were close to normal, while in series 1 and 3 infusion

of a small volume of saline resulted in a marked increase in intravesical pressure, showing a reduced compliance of the reconstructed bladder. Discussion The study findings show that implants based on type I collagen can be effectively used to substitute a part of the urinary bladder wall, but bio-engineered collagen matrix grafts containing cell regeneration stimulants secreted by stem cells in their culture medium seem to be more promising.

Keywords: *bladder substitution, type I collagen, the mesenchymal stem/stromal cells of human adipose tissue, stem cell secretion products, bio-engineered matrix*

Authors declare no conflict of interests for this article. For citations: Kirpatovskii V.I., Kamalov D.M., Efimenko A.Yu., Makarevich P.I., Sagaradze G.D., Makarevich O.A., Nimiritskii P.P., Osidak E.O., Domogatskii S.P., Karpov V.K., Akopyan Zh.A., Tkachuk V.A., Kamalov A.A. Urinary bladder substitution using combined membrane based on secretions of human mesenchymal stem cells and type I collagen. Urologiia. 2016;6:00–00 (in Russian)

Сведения об авторах:

Кирпатовский В.И. – д.м.н., профессор, врач Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, заведующий отделом экспериментального моделирования урологических заболеваний НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, e-mail: vladkirp@yandex.ru

Камалов Д.М. – врач уролог Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: davidffm@mail.ru

Ефименко А.Ю. – к.м.н., старший научный сотрудник Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: efimenkoan@gmail.com

Макаревич П.И. – к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: pavel.makarevich@gmail.com

Сагарадзе Г.Д. – аспирант, кафедра биохимии, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова; e-mail: georgysagaradze@gmail.com

Макаревич О.А. – научный сотрудник, ООО «Генная и клеточная терапия»; e-mail: go.grigorievaolga@gmail.com

Нимирицкий П.П. – аспирант, кафедра биохимии, факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: nimiritsky@gmail.com

Осидак Е.О. – к.м.н., ведущий научный сотрудник ООО фирмы «ИМТЕК»; e-mail: egorosidak@gmail.com

Домогатский С.П. – к.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, Институт экспериментальной кардиологии, ФГУП РКНПК МЗ РФ; e-mail: spdomo@yandex.ru

Карпов В.К. – к.м.н., доцент кафедры урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: karpov@fbm.msu.ru

Акопян Ж.А. – к.м.н., заместитель директора Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: zhanna.fbm@gmail.com

Ткачук В.А. – академик, д.б.н., профессор, декан факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Директор Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: tkachuk@fbm.msu.ru

Камалов А.А. – академик, д.м.н., профессор, Директор Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой урологии и андрологии Факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: armais.kamalov@rambler.ru