

На правах рукописи

Камалов Давид Михайлович

**Заместительная пластика мочевых путей препаратами
из коллагена I типа**

14.01.23 — урология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва — 2017

Работа выполнена на кафедре урологии и андрологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

заведующий отделом экспериментального моделирования урологических заболеваний Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина — филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, отдел урологии и андрологии клинических подразделений медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В.Ломоносова доктор медицинских наук, профессор

Кирпатовский
Владимир Игоревич

Официальные оппоненты:

профессор кафедры урологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, доктор медицинских наук

Винаров
Андрей Зиновьевич

профессор кафедры урологии и оперативной андрологии ГБОУ ВПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, доктор медицинских наук

Синякова
Любовь Александровна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1)

Защита состоится «27» июня 2017 г. в _____ часов по адресу: 117333, г. Москва, ул. Фотиевой, д. 6 на заседании диссертационного совета Д.212.203.01 при Российском университете дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте <http://dissovet.rudn.ru/>.

Автореферат размещен на сайте <http://dissovet.rudn.ru/> «26» апреля 2017 г.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д. 212.203.01
кандидат медицинских наук

Лебедева
Марина Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В урологической практике нередки ситуации, когда необратимо повреждается один из участков мочевых путей — мочеточник, мочевого пузыря, мочеиспускательный канал. Возникает необходимость замены поврежденного сегмента другим материалом для восстановления функции мочеиспускания. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в этой области, многие проблемы, связанные с реконструктивно-заместительной пластикой мочевыводящих путей, по-прежнему остаются актуальными (Комяков Б.Г. и соавт., 2015; Глыбочко П.В. и соавт., 2015; Коган М.И. и соавт., 2015).

Протяженные стриктуры мочеточника, которые невозможно ликвидировать с использованием местных тканей (лоскутная пластика, уретеро-уретероанастомоз, операция Боари), вынуждают использовать другие методы, основным из которых является кишечная пластика с использованием изолированного сегмента тонкой кишки на сосудистой ножке (Зубань О.М. и соавт., 2014; Комяков Б.Г. и соавт., 2014, 2015, 2016). Альтернативные методы уретеропластики (использование слизистой ротовой полости, аппендикса, тканеинженерных конструкций, эндопротезирование) проходят только экспериментальные исследования или имеют очень ограниченный клинический опыт (Комяков Б.Г. и соавт., 2014; Трапезникова М.Ф. и соавт., 2014; Глыбочко П.В. и соавт., 2015; Гулиев Б.Г. и соавт., 2015).

Кишечная пластика также является основным методом замещения мочевого пузыря как при его полном удалении при раке мочевого пузыря, так и при обширных его резекциях по поводу доброкачественных заболеваний, таких как интерстициальный цистит, нейрогенный мочевой пузырь, рефрактерный гиперактивный мочевой пузырь и прочее (Лоран О.Б. и соавт., 2001; Лопаткин Н.А. и соавт., 2003; Biers S.M. et al., 2012 и соавт.). С этой целью используют сегменты тонкой, толстой или прямой кишки, илео-цекального угла, большой кривизны желудка на сосудистой ножке.

Однако, помимо высокой травматичности кишечной пластики мочеточника и мочевого пузыря, а также высокого риска развития хирургических осложнений, существует 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 (Biers S. et al., 2012; Castellan M. et al., 2012; Veeratterapillay R. et al., 2013).

Не менее важной проблемой, несмотря на многолетние исследования, остается лечение протяженных стриктур уретры. Наиболее часто используемые варианты операции — замещение зоны стриктуры слизистой полости рта, кожным или кожно-фасциальным лоскутом, в том числе на сосудистой ножке с микрохирургическим анастомозированием кровеносных сосудов

(Meeks J.J., 2010; Пушкарь Д.Ю. и соавт., 2012; Коган М.И. и соавт., 2015; Синельников Л.М. и соавт., 2016). Основные отрицательные стороны этих операций — сложность выполнения, особенно при микрохирургической реваскуляризации трансплантатов, высокая частота образования стриктур и облитераций анастомозов, частое формирование мочевого свищей, а при использовании кожных лоскутов — рост волос в неоуретре (Братчиков О.И. и соавт., 2003; Бабыкин А. В. и соавт., 2008). Эндопротезирование уретры с имплантацией в область стриктуры нитиноловых сетчатых протезов носит паллиативный характер и, как правило, используется в качестве вспомогательного метода лечения (Курбатов Д.Г. и соавт., 2016).

Степень разработанности темы. В связи с вышесказанным изучается вопрос об альтернативных вариантах заместительной пластики мочевого пузыря как с использованием специально обработанных аллогенных и ксеногенных тканей, так и искусственно созданных заменителей стенки органа. С этой целью испытывались мышечно-апоневротический лоскут брюшной стенки, сальник на ножке, аллотрансплантаты мочевого или желчного пузыря, сегмент брюшины, лиофилизированный трансплантат твердой мозговой оболочки, синтетические протезы или лишенные клеток биологические материалы (Оччархаджиев С.Б., 2005). Однако при экспериментальном изучении этих методов наблюдали неудовлетворительные результаты, обусловленные склерозированием и сморщиванием трансплантатов, приводящими к стриктуре и облитерации неоуретры и сморщиванию реконструированного мочевого пузыря.

Один из перспективных материалов — коллаген, выделенный из тканей животных, достоинствами которого являются отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, высокая механическая прочность и устойчивость к тканевым ферментам, регулируемая скорость лизиса в организме, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами, стимуляция регенерации собственных тканей организма (Щукина Е.В. и соавт., 2005; Lin H.K., et al., 2015). Особенностью белков данного класса является их филогенетическое родство у разных видов животных и человека, что позволяет использовать ксеногенный коллаген для разработки биоматриц (Бегма А.Н. и соавт., 2014).

Публикации об экспериментальных исследованиях свидетельствуют о перспективности использования препаратов на основе коллагена для пластики уретры и мочевого пузыря (Zhu W.D. et al., 2011; Roelofs L.A. et al., 2014; Lin H.K. et al. 2014; Глыбочко П.В. и соавт., 2015). Однако они носят единичный характер и связаны с использованием различных препаратов коллагена, что требует накопления данных по этой проблеме. В частности, нет сведений о влиянии источника получения коллагена на его биоинертные свойства. Кроме того, эксперименты на крупных лабораторных животных и единичные клинические исследования на ограниченном числе пациентов, которым провели цистопластику бесклеточной коллагеновой

мембраной, показали неоднозначный результат. Наряду с хорошей приживляемостью бесклеточные 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 (Caione P. et al., 2012; Tu D.D. et al., 2012; Joseph D.B. et al., 2014; Lin H.K. et al., 2015).

В связи с этим актуальным остается вопрос стимуляции васкуляризации и врастания клеток из окружающих тканей в имплантированный коллагеновый каркас для формирования полноценной стенки мочевого пузыря. С этой целью ряд авторов предлагают включать в состав мембран фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) изолированно (Domingos A.L. et al., 2012) или в комплексе с гиалуроновой кислотой (Loai Y. et al., 2010), комплекс полигликолиевой кислоты, гликолиевой кислоты и амниотической мембраны человека (Sharifiaghdas F. et al., 2014), основной фактор роста фибробластов (Chen W. et al., 2010), а также стволовые клетки (Lin H.K. et al., 2015). Однако, эти исследования носят единичный характер, выполнены на различных экспериментальных животных и с использованием различных типов мембран, что требует дальнейшего изучения эффективности данных технологий.

Цель исследования: разработать методику заместительной пластики мочевых путей с использованием мембран из коллагена I типа, без и с включением в их состав кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека.

Задачи исследования:

1. Сравнить выраженность воспалительной реакции стенки мочевого пузыря и окружающих тканей при подшивании к его стенке мембран, изготовленных из коллагена I типа, выделенного из тканей свиньи и крупного рогатого скота.

2. Провести сравнительную оценку способности свиных и бычьих коллагеновых мембран инкорпорироваться в состав стенки мочевых путей после заместительной пластики.

3. Оценить гистологические изменения в зоне имплантации свиных и бычьих коллагеновых мембран, как в прилежащих отделах стенки мочевого пузыря и уретры, так и в имплантатах.

4. Изучить влияние включения в состав коллагеновых мембран кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека на регенерацию новообразованной стенки мочевого пузыря после его резекции.

5. Оценить выраженность васкуляризации и клеточный состав имплантированных в мочевой пузырь коллагеновых мембран, содержащих и не содержащих кондиционированную среду культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека.

6. Сравнить функциональное состояние резецированного мочевого пузыря после

заместительной цистоластики коллагеновой мембраной, содержащей и не содержащей кондиционированную среду культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, а также при простом ушивании резецированного мочевого пузыря.

Научная новизна. Получены приоритетные данные о биологических свойствах мембран из коллагена I типа выделенных из тканей свиней и крупного рогатого скота. Выявлены преимущества использования мембран из свиного коллагена. Доказано, что включение в состав коллагеновой мембраны кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека способствует более полноценной эпителизации имплантата, ускорению его реваскуляризации, более полноценной регенерации мышечного слоя новообразованной стенки мочевого пузыря и препятствует инкрустации солей мочи на неэпителизированной внутренней поверхности. Выявлено более полноценное восстановление функционального объема органа и его комплаентность, оцененные методом инфузионной цистометрии, при включении в состав мембраны кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека. Доказана возможность клинического применения коллагенового имплантата для заместительной пластики мочеточника.

Теоретическая и практическая значимость. Доказана эффективность использования методики цистоластики для изучения пригодности различных коллагеновых биоматериалов материалов для заместительной пластики мочевых путей. Определен оптимальный вид коллагена, вызывающий минимальную воспалительную реакцию окружающих тканей, который может быть рекомендован для изготовления материала для цистоластики. Обоснована целесообразность включения в состав коллагеновых мембран кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека для обеспечения полноценной регенерации стенки мочевого пузыря и сохранения ее функции. Проведена апробация заместительной пластики мочевых путей в клинике с использованием биопротеза мочеточника из коллагена I типа. Сформулированы рекомендации по дальнейшим исследованиям возможности использования коллагеновых материалов для расширяющей цистоластики, в том числе и в клинической практике.

Методология и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 48 Ново-Зеландских кроликах-самцах массой 3-3,5 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария на рационе из специального комбикорма с неограниченным доступом к воде.

Проведено 6 серий экспериментов:

1-я серия – сравнительная оценка биосовместимости препаратов коллагена I типа, изготовленного из тканей крупного рогатого скота (бычий коллаген) и свиней, на модели их подшивания к наружной стенке мочевого пузыря (12 экспериментов);

2-я серия – сравнительная оценка способности к интеграции в ткань мочевого пузыря мембран, изготовленных из бычьего или свиного коллагена I типа, после замещения ими дефекта его стенки (18 экспериментов);

3-я серия – изучение возможности заместительной пластики уретры трубчатым препаратом коллагена I типа (4 эксперимента);

4-я серия – оценка возможности использования нативных мембран из свиного коллагена I типа для заместительной пластики мочевого пузыря после его резекции (5 экспериментов);

5-я серия – оценка коллагеновых мембран, содержащих кондиционированную среду культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, в качестве материала для заместительной пластики мочевого пузыря после его резекции (5 экспериментов);

6-я серия – резекция мочевого пузыря с его ушиванием (4 эксперимента).

Из эксперимента животных выводили на 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки после операции.

Коллагеновые мембраны были приготовлены по следующей методике. Стерильный прозрачный нейтральный раствор коллагена I типа, выделенный из тканей животных («ВИСКОЛЛ», производство ООО «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 +37⁰ С до тех пор, пока не формировался гидрогель, который в дальнейшем подвергался сушке в асептических условиях при температуре от +20⁰С до +25⁰С 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.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделяли из подкожного жирового отложения здоровых доноров обоих полов, полученного при проведении малого хирургического вмешательства под местной анестезией или в ходе плановых хирургических операций. Полученный в результате операции 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 37⁰С 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, состоящий из клеток стромы жировой ткани, клеток сосудистой стенки и крови,

суспендировали в стерильной деионизированной воде для лизирования эритроцитов. Чтобы восстановить осмотическое давление, добавляли соответствующий объем 10-кратного фосфатного буфера, а затем фильтровали через нейлоновые фильтры с 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 $5 \times 10^4 / \text{см}^3$ и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 ; 95% воздуха) при 37°C. На следующий день в чашках меняли среду для удаления не прикрепившихся клеток. Смену среды проводили каждые 2-3 дня; при достижении 70-80% конfluence клетки пассаживали 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 жировой ткани 4-5 пассажа, достигшие 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 300g, затем концентрировали в 50 раз с помощью ультрафильтрации через мембраны из регенерированной целлюлозы с указанным отсечением 10 кДа в центрифужных картриджах («Millipore», США).

Для получения биоматериала смешивали 2,5% свиной стерильный нейтральный коллагеновый гель («ИМТЕК», Россия) с образцами концентрированной в 50 раз кондиционированной среды (КС) МСК жировой ткани в соотношении по объему 4:1. Затем инкубировали смесь при +4°C в течение 2 часов. Полученный раствор равномерно распределяли на дне лунки 24-луночного планшета с площадью поверхности около 2 см², помещали планшет в CO_2 -инкубатор и инкубировали при +37°C в течение 30 минут, 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. Контрольные мембраны готовили по такому же протоколу, добавляя вместо КС МСК жировой ткани соответствующее количество среды DMEM-LG.

Все операции на кроликах проводили в условиях общего наркоза. Для наркоза использовали смесь препаратов Золетил 100 производства Virbac S.A. и XylaVET professional

(ксилавет инъекционный) производства Pharmamagist Kft в соотношении 2:1. Рабочий раствор доводили до концентрации Золетила 30 мг/мл добавлением физиологического раствора. Полученный раствор вводили в концентрации 1мл/кг внутримышечно.

Для профилактики инфекционных осложнений вводили антибиотик (амоксиклав 200 мг внутривенно, однократно).

Методика подшивания коллагеновой мембраны к стенке мочевого пузыря. После соответствующей подготовки операционного поля проводили нижне-срединную лапаротомию и в рану выводили мочевой пузырь. При необходимости для полной мобилизации мочевого пузыря пересекали соединительнотканые связки, соединяющие пузырь с боковыми стенками брюшной полости, а также отделяли перивезикальную жировую ткань. На наружной поверхности мочевого пузыря выбирали бессосудистый участок и подшивали коллагеновую мембрану отдельными узловыми швами атравматической нитью «Vicryl» 4/0. Обычно накладывали 6 узловых швов на равном расстоянии. После этого 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 замещения коллагеновой мембраной дефекта стенки мочевого пузыря. После введения в наркоз катетеризировали мочевой пузырь по уретре для эвакуации мочи и определения исходной функциональной емкости мочевого пузыря. В бессосудистой зоне иссекали участок стенки органа размером примерно 2х2 см, что соответствовало размерам коллагеновой мембраны. Мембрану вшивали в область дефекта непрерывным обвивным швом с использованием атравматической нити «Vicryl» 4/0. Мочевой пузырь помещали в брюшную полость и ушивали лапаротомную рану 2-рядным швом: непрерывный обвивной шов на мышечную стенку и отдельные узловые швы на кожу с использованием атравматической нити «Vicryl» 2/0. Мочевой пузырь дренировали уретральным катетером.

Методика резекции мочевого пузыря с его ушиванием. В этих опытах производили резекцию мочевого пузыря как в предыдущих сериях, но образовавшийся дефект ушивали непрерывным обвивным швом атравматической нитью «Vicryl» 4/0. Дальнейший ход операции — как в других сериях.

Методика пластики уретры трубчатым коллагеновым протезом. В опытах с пластикой уретры выполняли ее катетеризацию полиэтиленовым катетером. Рассекали кожу препуция и слизистую оболочку полового члена и выделяли уретру, которую брали на держалку. Катетер временно удаляли. Подготавливали трубчатый коллагеновый протез, после чего уретру пересекали. В образовавшийся после расхождения краев дефект помещали коллагеновый имплантат, который анастомозировали на вновь введенном катетере с краями уретры,

используя отдельные узловые швы атравматичной нитью «Vicryl» 4/0. Кожную рану ушивали отдельными узловыми швами нитью «Vicryl» 4/0.

Оценка результатов пластики мочевых путей. В заданные сроки животных вновь вводили в наркоз. В опытах с цистопластикой выполняли лапаротомию, проводили макроскопическую оценку состояния мочевого пузыря и окружающих тканей, выполняли функциональные исследования и в конце эксперимента удаляли мочевой пузырь для гистологического исследования. В опытах с уретропластикой после визуального осмотра области операции выполняли уретрографию или фистулографию, после чего удаляли уретру с имплантатом для гистологического исследования.

В опытах с цистопластикой при визуальном осмотре области операции обращали внимание на выраженность спаечного процесса мочевого пузыря с окружающими тканями, наличие экссудата в брюшной полости, внешний вид мочевого пузыря (степень гиперемии, отечность, ригидность стенки), а также коллагеновой мембраны. После удаления и вскрытия мочевого пузыря отмечали степень гиперемии и отечности слизистой оболочки, прилегающей к имплантированной мембране, визуально оценивали площадь мембраны, не покрытой уротелием, а также отмечали наличие или отсутствие инкрустации мембраны солями и образование конкрементов. В опытах с уретропластикой оценивали состояние наружных тканей, наличие мочевых свищей.

Для оценки состояния нижних мочевых путей в ряде исследований выполняли уретроцистографию с 76% верографинном. В опытах с уретропластикой при выявлении мочевого свища выполняли фистулографию.

Функциональные исследования проводили как на интактном мочевом пузыре до начала манипуляций на нем, так и через 1 месяц после цистопластики. Исследования начинали с определения функциональной емкости мочевого пузыря. Для этого мочевой пузырь пунктировали в области верхушки внутривенным кубитальным катетером G20 и через него опорожняли мочевой пузырь. После этого мочевой пузырь постепенно наполняли физиологическим раствором до начала подтекания жидкости по уретре или до начала активного мочеиспускания. Объем введенного при этом раствора считали функциональным объемом мочевого пузыря. В процессе наполнения мочевого пузыря регистрировали также динамику внутрипузырного давления. Эти данные использовали для расчета показателя «объем/давление», характеризующего комплаентность мочевого пузыря.

Для дальнейших исследований к поверхности мочевого пузыря подшивали 2 хлорсеребряных электрода по обе стороны от имплантированной мембраны. С помощью этих электродов на специально разработанной высокочувствительной аппаратуре регистрировали малые колебания биоимпеданса и анализировали с помощью Фурье-преобразования их

частотный спектр с помощью оригинального программного обеспечения. При одновременной регистрации внутрипузырного давления через катетер, соединенный с электроманометром, с помощью этой методики можно оценивать состояние кровообращения в изучаемой области стенки мочевого пузыря, а также функциональное состояние детрузора, в том числе его возбудимость и спонтанную активность, не связанную с актом мочеиспускания, что является признаком детрузорной гиперактивности.

Методика исследования, аппаратный комплекс и программное обеспечение разработаны в НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина совместно с НПФ «Биола» и их информативность доказана в исследованиях функционального состояния мочевого пузыря и предстательной железы при различных патологических состояниях (Мудрая И.С. и соавт., 2011; Кирпатовский В.И. и соавт., 2012, 2013, 2015; Ибрагимов А.Р. и соавт., 2011).

В результате получили динамику записи базальных значений и микроколебаний импеданса мочевого пузыря, а также базальных значений и спонтанных колебаний внутрипузырного давления. Спектральный анализ микроколебаний биоимпеданса позволяет получить их амплитудный спектр, содержащий кардиальный пик С1, регистрируемый на частоте сердцебиения. Амплитуда этого пика характеризует состояние микроциркуляции в исследуемой зоне. Его значения выражали в мОм.

Измерения регистрируемых параметров проводили как на фоне опорожненного мочевого пузыря, так и в условиях его максимального наполнения.

Для гистологического исследования образцы ткани мочевого пузыря фиксировали в нейтральном 9% формалине с последующей стандартной обработкой в батарее спиртов восходящей концентрации и заливкой в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Завершением работы стала клиническая апробация использования коллагенового трубчатого протеза для заместительной пластики мочевых путей, в частности, сегмента мочеточника. Описание этого клинического наблюдения приводится в главе с изложением результатов проведенных исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Мембраны из свиного коллагена I типа обладают хорошей биосовместимостью, способны интегрироваться в окружающие ткани и могут быть использованы для заместительной пластики мочевых путей, в частности мочевого пузыря.

2. Включение в состав коллагеновой мембраны кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека способствует ускорению регенерации новообразованной стенки с более полноценной эпителизацией и реваскуляризацией коллагенового имплантата, а также более полноценной регенерации

мышечной оболочки.

3. Использование коллагеновых мембран с включенной в их состав кондиционированной средой культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека для пластики мочевого пузыря после его резекции способствует более полноценному восстановлению функции органа по сравнению с мембранами без кондиционированной среды и по сравнению с резекцией мочевого пузыря без цистопластики.

4. Клиническая апробация пластики мочевых путей коллагеновой матрицей свидетельствует о перспективности этого направления исследований.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Полученные 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 критерия t Стьюдента и критерия Вилкоксона-Манна. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры андрологии и урологии Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; заседании кафедры урологии и оперативной нефрологии с курсом онкоурологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о субсидии №14.607.21.0045 от 22 августа 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0045).

По материалам диссертации опубликованы 4 печатные работы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе исследования проведена сравнительная оценка биосовместимости препаратов коллагена I типа, выделенного из тканей различных животных — крупного рогатого скота (бычий коллаген) или свиней (свиной коллаген). Для первоначальной оценки воспалительной реакции на инородное тело и чужеродный (ксеногенный) белок, вызываемой коллагеновым имплантатом, мы использовали упрощенную модель, заключающуюся в подшивании коллагеновой мембраны к наружной поверхности мочевого пузыря. В ходе рассчитывали получить информацию о реакции как окружающих тканей, так и стенки самого мочевого пузыря при минимальном риске развития

осложнений.

В экспериментах с мембраной из бычьего коллагена уже через 3 суток выявляли развитие спаечного процесса между стенкой мочевого пузыря и окружающими тканями. Сам мочевой пузырь выглядел гиперемированным с повышенным тонусом. Подшитая мембрана выглядела набухшей, но была плотно связана со стенкой мочевого пузыря. Через 7 суток воспалительные изменения нарастали. У 1 из кроликов даже выявили поверхностный некроз стенки мочевого пузыря в области имплантированной мембраны. Лишь к 14-м суткам выраженность воспалительных изменений уменьшалась. Подшитая мембрана выглядела набухшей, уменьшенной в размерах (частичная резорбция).

Гистологическое исследование выявило массивную лейкоцитарную инфильтрацию стенки мочевого пузыря, прилежащей к имплантату, уменьшающуюся лишь к 14-му дню после имплантации. Адвентициальная оболочка под мембраной утолщена. Имплантированная мембрана постепенно резорбировалась, через 14 суток была окружена соединительно-тканной капсулой (Рисунок 1).

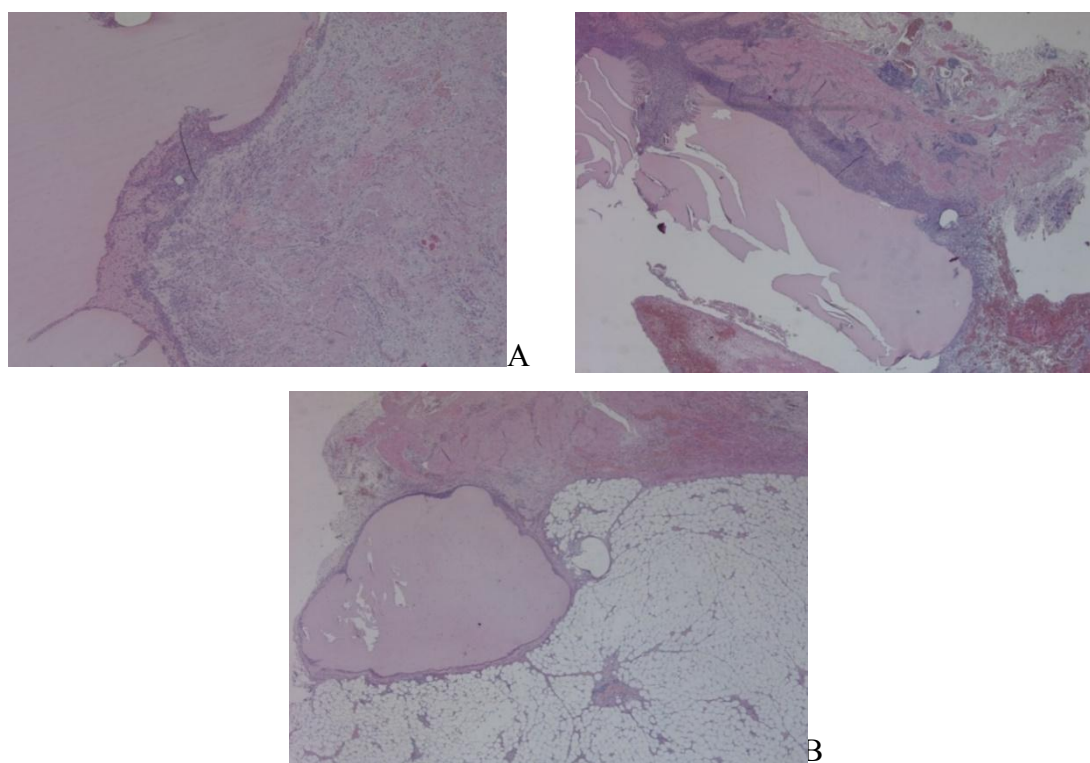


Рисунок 1 — Гистологические изменения в стенке мочевого пузыря после подшивания к его наружной поверхности мембраны из бычьего коллагена. А – через 3 дня, Б – через 7 дней, В – через 14 дней. Окраска гематоксилином и эозином, x100

В опытах с подшиванием мембраны из свиного коллагена воспалительная реакция на всех сроках наблюдения была менее выражена. Спаечный процесс между стенкой мочевого пузыря и окружающими тканями был слабо выражен даже через 14 суток, стенка мочевого

пузыря не была гиперемирована, имела нормальный тонус. Гистологически через 3 суток отмечена нерезко выраженная лейкоцитарная инфильтрация стенки мочевого пузыря в области подшитой мембраны, через 7 суток воспалительная реакция сохранялась, но отмечали постепенное замещение мембраны соединительной тканью, к 14-м суткам мембрана была значительно дезинтегрирована и частично замещена соединительной тканью, исходящей из адвентициальной оболочки мочевого пузыря. К этому сроку воспалительная лейкоцитарная инфильтрация практически отсутствовала (Рисунок 2).

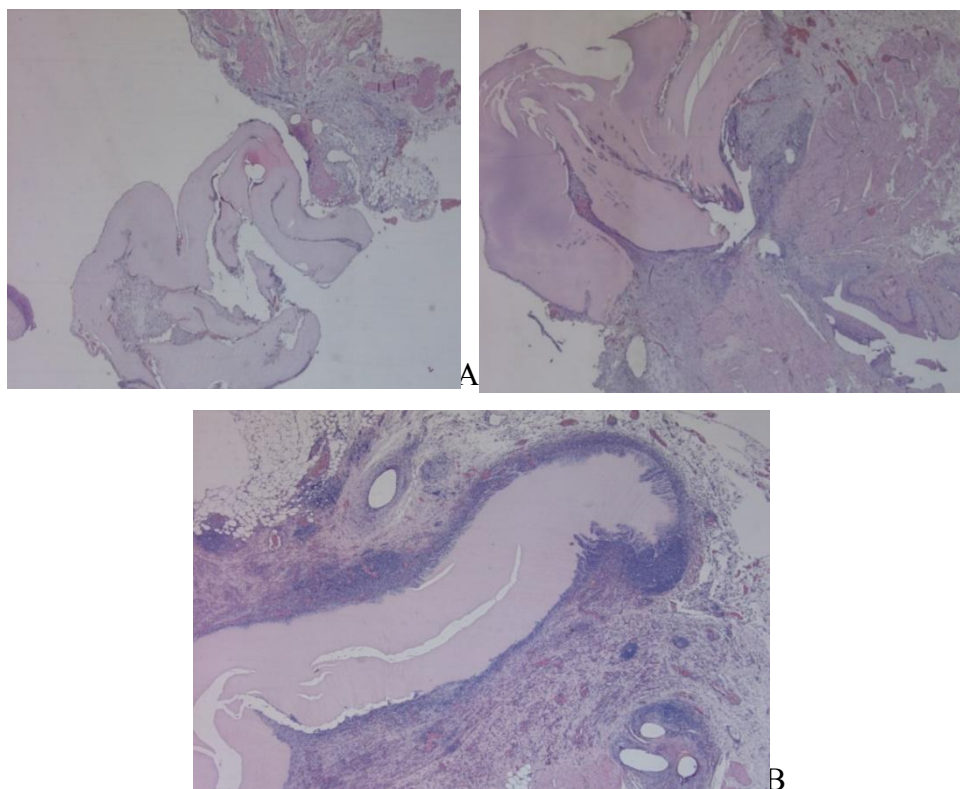


Рисунок 2 — Гистологические изменения в стенке мочевого пузыря после подшивания к его наружной поверхности мембраны из свиного коллагена. А – через 3 дня, Б – через 7 дней, В – через 14 дней. Окраска гематоксилином и эозином, x100

Сравнение результатов имплантации мембран из бычьего и свиного коллагена свидетельствует о более высокой биоинертности мембран из свиного коллагена, что проявлялось в меньшей степени воспалительной реакции как в самой стенке мочевого пузыря, так и в окружающих тканях (что влияет на выраженность спаечного процесса). При этом в опытах с использованием данных мембран отмечали более выраженную резорбцию мембран и замещение коллагена врастающей соединительной тканью из адвентиция мочевого пузыря.

В следующей серии опытов изучали способность мембран из бычьего и свиного коллагена интегрироваться в стенку мочевых путей (в частности мочевого пузыря) при замещении части стенки этими мембранами. Для этого резецировали участок стенки мочевого

пузыря в области тела размером 2x2 см и замещали образовавшийся дефект одним из видов коллагеновой мембраны. При использовании обоих видов мембран все оперированные животные выжили. Не отмечено ни одного случая недостаточности швов, соединяющих коллагеновую мембрану со стенкой мочевого пузыря, и потери герметичности мочевого пузыря. Все животные были выведены из эксперимента в плановые сроки.

В опытах с имплантацией мембраны из бычьего коллагена через 7 суток после операции выявили выраженный спаечный процесс между мочевым пузырем и окружающими тканями. Мочевой пузырь выглядел резко гиперемированным с повышенным тонусом. Слизистая оболочка вокруг вшитой мембраны была резко отечна. Большая часть внутренней поверхности мембраны была покрыта белково-солевым налетом. Через 14 суток стенка мочевого пузыря также выглядела воспаленной с повышенным тонусом. У одного животного из-за спаек между петлями тонкой кишки и мочевым пузырем развилась частичная кишечная непроходимость. Выраженный отек слизистой оболочки вокруг имплантированной мембраны сохранялся, однако, она частично покрывала внутреннюю поверхность мембраны. Оставшаяся неэпителизированная часть мембраны была покрыта белково-солевым налетом. Через 21 сутки картина мало изменилась, за исключением уменьшения выраженности отека слизистой и площади неэпителизированного участка внутренней поверхности вшитой мембраны.

Гистологическое исследование, проведенное через 14 дней после имплантации мембраны, выявило резко выраженную воспалительную реакцию вокруг мембраны, проявляющуюся в массивной лейкоцитарной инфильтрации прилежащих тканей и выраженном полнокровии сосудов. Через 21 день воспалительная реакция стихала. Края имплантата частично покрывались нарастающим со стороны собственных тканей уротелием, однако значительная часть мембраны оставалась неэпителизирована. Происходило частичное замещение мембраны соединительной тканью (Рисунок 3).

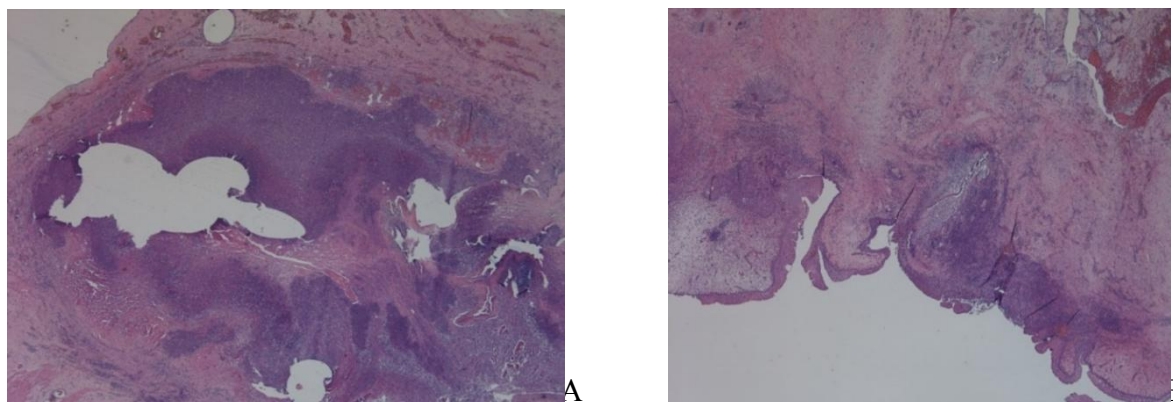


Рисунок 3 — Гистологические изменения стенки мочевого пузыря в зоне вшивания мембраны из бычьего коллагена через 14 дней (А) и через 21 день (Б) после операции.

Окраска гематоксилином и эозином, x100

В опытах с вшиванием мембраны из свиного коллагена через 7 суток после операции мочевого пузыря выглядел малоизмененным без признаков выраженного воспалительного процесса. Слизистая оболочка вокруг мембраны мало изменена с нерезко выраженным отеком. Внутренняя поверхность мембраны уже на этом сроке частично покрыта слизистой, площадь неэпителизированного участка, выстланного белково-солевым налетом, меньше, чем в опытах с мембраной из бычьего коллагена. К 14-м и 21-м суткам отмечали дальнейшее прогрессивное уменьшение площади внутренней поверхности мембраны, не покрытой слизистой оболочкой. Макроскопических признаков воспалительной реакции не выявляли.

При гистологическом исследовании уже через 7 суток обнаружено нарастание уротелия на поверхности имплантированной мембраны при незначительной выраженности воспалительной лейкоцитарной инфильтрации прилежащих отделов стенки мочевого пузыря. Через 14 суток происходило выраженное замещение коллагеновой мембраны соединительной тканью; оставались лишь небольшие участки внутренней поверхности мембраны, лишенные уротелия. Через 21 день после имплантации в стенке мочевого пузыря оставались лишь отдельные очаги воспалительной инфильтрации. Имплантированная мембрана была почти полностью дезинтегрирована и замещена соединительной тканью, исходящей из стенки мочевого пузыря. Внутренняя поверхность имплантата была почти полностью эпителизирована (Рисунок 4). При этом ни в одном из экспериментов мы не выявили врастания гладкомышечных клеток в имплантат.

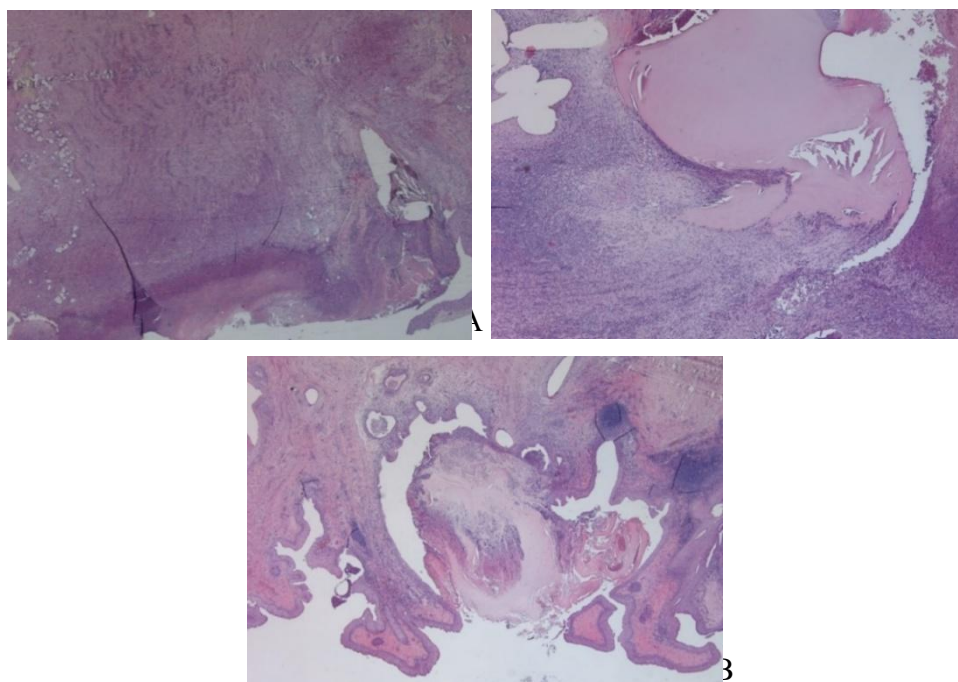


Рисунок 4 — Гистологические изменения стенки мочевого пузыря в зоне вшивания мембраны из свиного коллагена через 7 (А), 14 (Б) и через 21 день (в) после операции.

Окраска гематоксилином и эозином, x100

Функциональные исследования с определением максимальной емкости мочевого пузыря (определяли по объему физиологического раствора, введенного через уретральный катетер, до начала подтекания жидкости помимо катетера) также выявили определенные различия между группами опытов с использованием разных видов мембран. При определении этого показателя через 7 дней после операции выявили его снижение в обеих группах до примерно одинаковых значений (34 ± 1 и 37 ± 2 мл при использовании мембран из бычьего и свиного коллагена, соответственно) при норме 48 ± 2 мл (Рисунок 5).

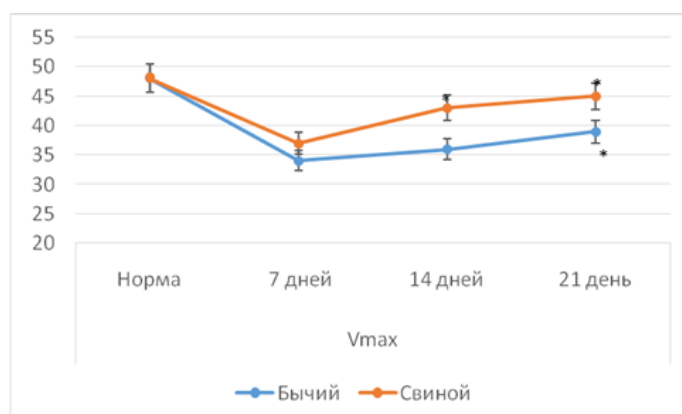


Рисунок 5 — Динамика максимальной емкости мочевого пузыря (мл) после его резекции и имплантации мембраны из бычьего и свиного коллагена

Через 14 и 21 день в опытах с бычьей коллагеновой мембраной емкость мочевого пузыря возросла незначительно, составив 36 ± 1 и 39 ± 1 мл, соответственно (различия достоверны только при сравнении результатов через 7 и 21 день), тогда как в опытах со свиной коллагеновой мембраной уже через 14 дней происходило достоверное увеличение максимальной емкости мочевого пузыря — до 43 ± 1 мл с дальнейшим постепенным возрастанием до 45 ± 1 мл ($p < 0,05$).

Сравнение результатов экспериментов с использованием мембран из свиного и бычьего коллагена позволяет сделать определенный вывод о преимуществах мембран из свиного коллагена для уропластики. Этот материал обладает более выраженной биоинертностью, вызывает менее выраженную воспалительную реакцию при его имплантации в мочевые пути, по сравнению с бычьим коллагеном, как в самих органах мочевой системы, так и в прилежащих окружающих тканях. При имплантации свиной коллагеновой мембраны в мочевой пузырь происходит более быстрая ее эпителизация и замещение собственными тканями мочевого пузыря. Однако при этом на всех сроках наблюдения не происходит регенерации мышечной оболочки новообразованной стенки мочевого пузыря (как и в опытах с бычьей коллагеновой мембраной). Функциональная емкость мочевого пузыря лучше восстанавливается при использовании свиной коллагеновой мембраны.

В то же время и мембрану из бычьего коллагена также можно считать приемлемым пластическим материалом, но не лишенным недостатков в виде недостаточной биологической инертности.

В связи с полученными данными, в дальнейших экспериментах для заместительной пластики мочевых путей мы использовали препараты коллагена, изготовленные из тканей свиньи, учитывая их лучшие биологические свойства.

Оценку возможности заместительной пластики мочевых путей коллагеновым протезом мы начали с попытки уретропластики. Трубчатый коллагеновый протез вшивали в дефект пенильного отдела уретры кролика, образовавшийся после ее пересечения. Хотя технически операция по уретропластике выполнялась успешно, тем не менее, функциональные результаты, к сожалению, оказались неоптимальными. У всех 4 животных этой серии опытов не удалось обеспечить дренирования мочевого пузыря уретральным катетером в течение срока, необходимого для герметизации анастомозов. Кролики самостоятельно удаляли катетер или в ближайший период после выхода из наркоза, или в течение суток, несмотря на фиксацию катетера к головке полового члена и к коже препуция. В результате развивались мочевые затеки, приводящие к нагноению и рубцеванию тканей. В 2 опытах в результате этого произошло гнойное расплавление имплантата, а у 2 животных все же удалось избежать гнойных осложнений, но у них произошла облитерация дистального анастомоза с формированием мочевого свища. Однако макро- и микроскопическое исследование имплантата через 1 месяц после операции выявило, что он сохранил проходимость (результаты фистулографии), полностью заместился соединительной тканью, а его внутренняя поверхность была полностью выстлана эпителием, хотя он и выглядел атрофичным (Рисунок 6).

Таким образом, результаты этой серии экспериментов показали, что трубчатый коллагеновый имплантат хорошо приживается в тканях при замещении им участка мочеиспускательного канала. Он полностью замещается соединительной тканью, прорастающей из собственных тканей, окружающих имплантат, и постепенно реваскуляризируется. Однако технические сложности в обеспечении адекватного дренирования мочевых путей не позволили получить желаемого результата. В связи с этим дальнейшие исследования мы проводили на технически более простой модели — заместительной пластике мочевого пузыря после его резекции.

Целью этого раздела исследований стало изучение характера регенерации новообразованной стенки мочевого пузыря после его замещения мембраной из свиного коллагена I типа, содержащей или не содержащей кондиционированную среду культивирования МСК жировой ткани человека, а также определение показателей функционального состояния мочевого пузыря после цистоластики этими мембранами.

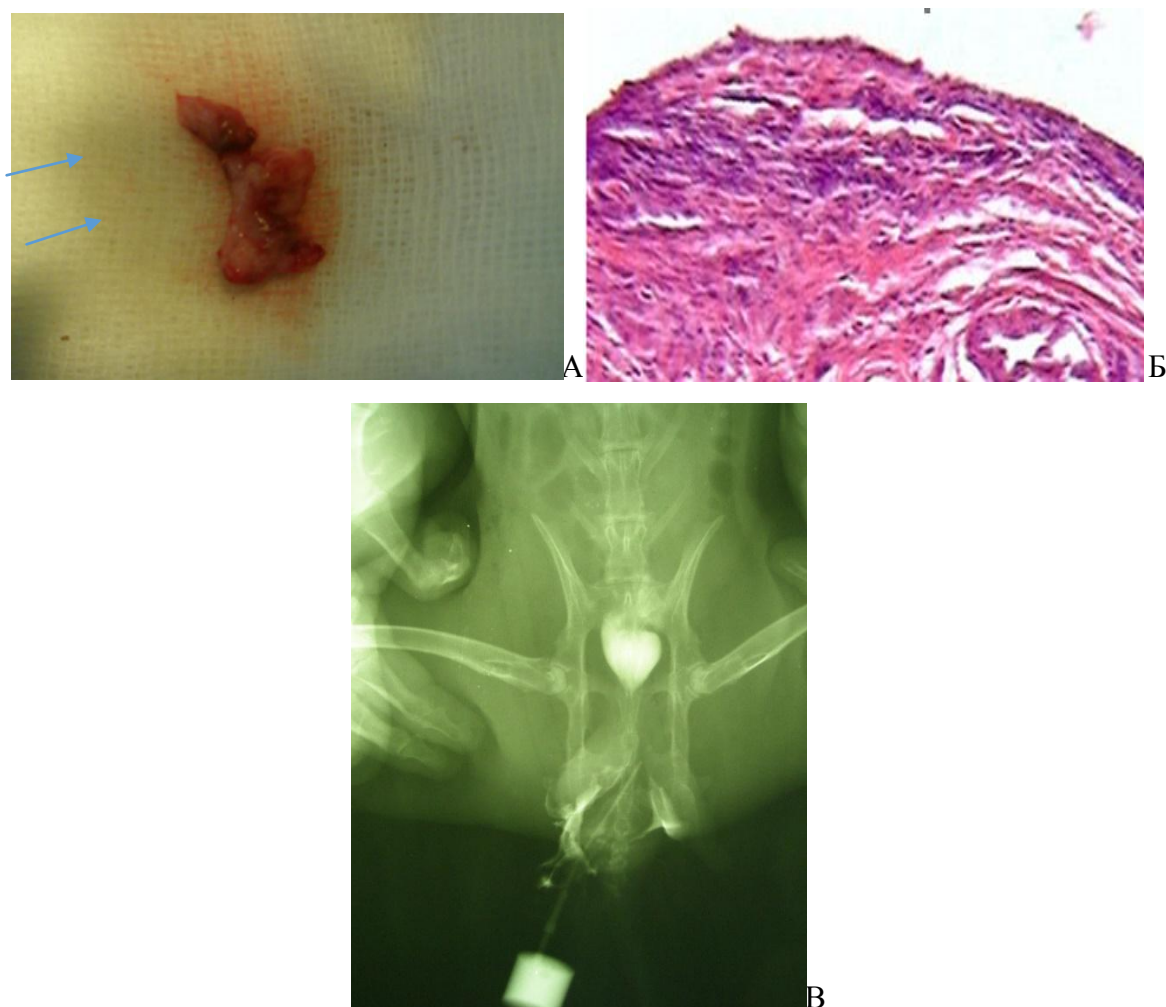


Рисунок 6 — Внешний вид (А), гистологическая картина (Б) коллагенового имплантата и результаты фистулографии (В) через 1 месяц после уретропластики

Контролем к этим исследованиям служили опыты с резекцией мочевого пузыря без заместительной цистопластики. Предпосылками к этим исследованиям стали данные литературы и полученные нами в предыдущих сериях результаты, свидетельствующие о замещении коллагенового имплантата преимущественно соединительной тканью без регенерации мышечной оболочки, что может существенно влиять на функциональное состояние реконструированного мочевого пузыря, а также данные литературы о том, что включение в состав коллагеновой матрицы факторов роста, стволовых клеток или продуктов их секреции стимулирует регенерацию гладкомышечных клеток. Оценку характера регенерации новообразованной стенки и функциональных показателей проводили через 1 месяц после операции.

Результаты опытов показали, что через 1 месяц в обеих сериях имплантированная мембрана была полностью интегрирована в ткань мочевого пузыря. Внутренняя ее поверхность была полностью выстлана новообразованной слизистой оболочкой. При этом в серии с цистопластикой стандартной коллагеновой мембраной гистологически выявляли субтотальное

замещение имплантата соединительной тканью с вращением отдельных кровеносных сосудов. В ткани, заместившей коллагеновую мембрану, выявляются лишь единичные гладкомышечные клетки. Прилежащие к зоне имплантации мембраны ткани выглядят неизменными, воспалительной инфильтрации не обнаружено (Рисунок 7).

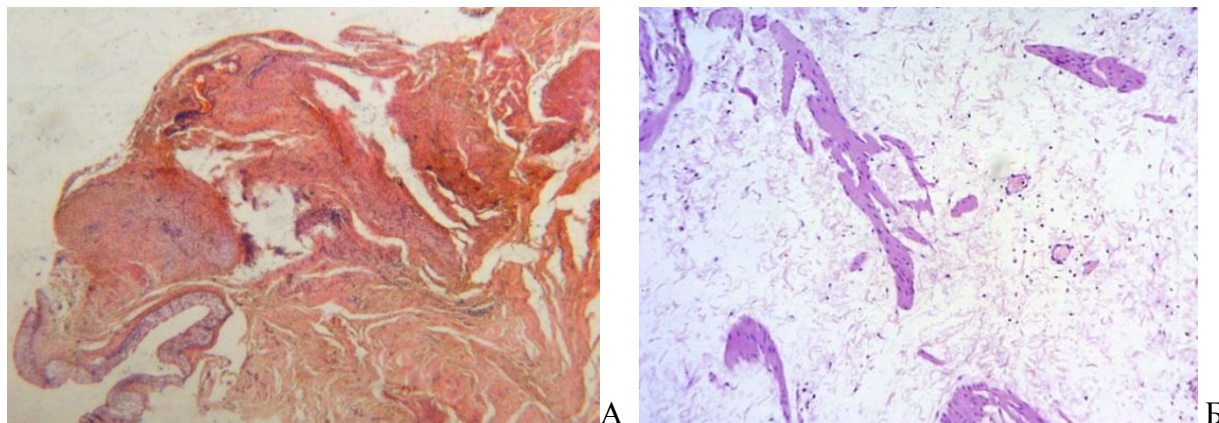


Рисунок 7 — Гистологическая картина через 1 месяц после заместительной цистопластики с использованием стандартной мембраны из свиного коллагена.

А – общий вид, окраска гематоксилином и эозином (x100),

Б – единичные гладкомышечные клетки, окрашенные соединительной тканью, заместившей коллагеновую мембрану (x400)

В опытах с заместительной цистопластикой мембраной, содержащей среду культивирования стволовых клеток, гистологическое исследование препарата из области имплантированной коллагеновой мембраны выявило ее почти полное замещение тканью мочевого пузыря. Люминальная поверхность имплантата выстлана слизистой оболочкой, состоящей из полноценной уротелиальной выстилки (многорядным эпителием) и подслизистого слоя, содержащего полнокровные сосуды. Новообразованная стенка мочевого пузыря содержит комплексы гладкомышечных клеток в значительном количестве, между которыми имеются тонкие прослойки соединительной ткани. Коллагеновый матрикс почти полностью резорбирован. Гладкомышечные клетки активнорастают в оставшийся коллаген. В новообразованной стенке происходит активные ангиогенез (Рисунок 8).

Таким образом, при использовании мембран, обогащенных культуральной средой стволовых клеток, происходит более быстрая и более полноценная регенерация новообразованной стенки мочевого пузыря, замещающей постепенно резорбирующийся имплантат. При этом формируется практически полноценная новообразованная стенка мочевого пузыря, содержащая все слои — полную эпителиальную выстилку, васкуляризированный подслизистый слой и выраженную гладкомышечную оболочку.

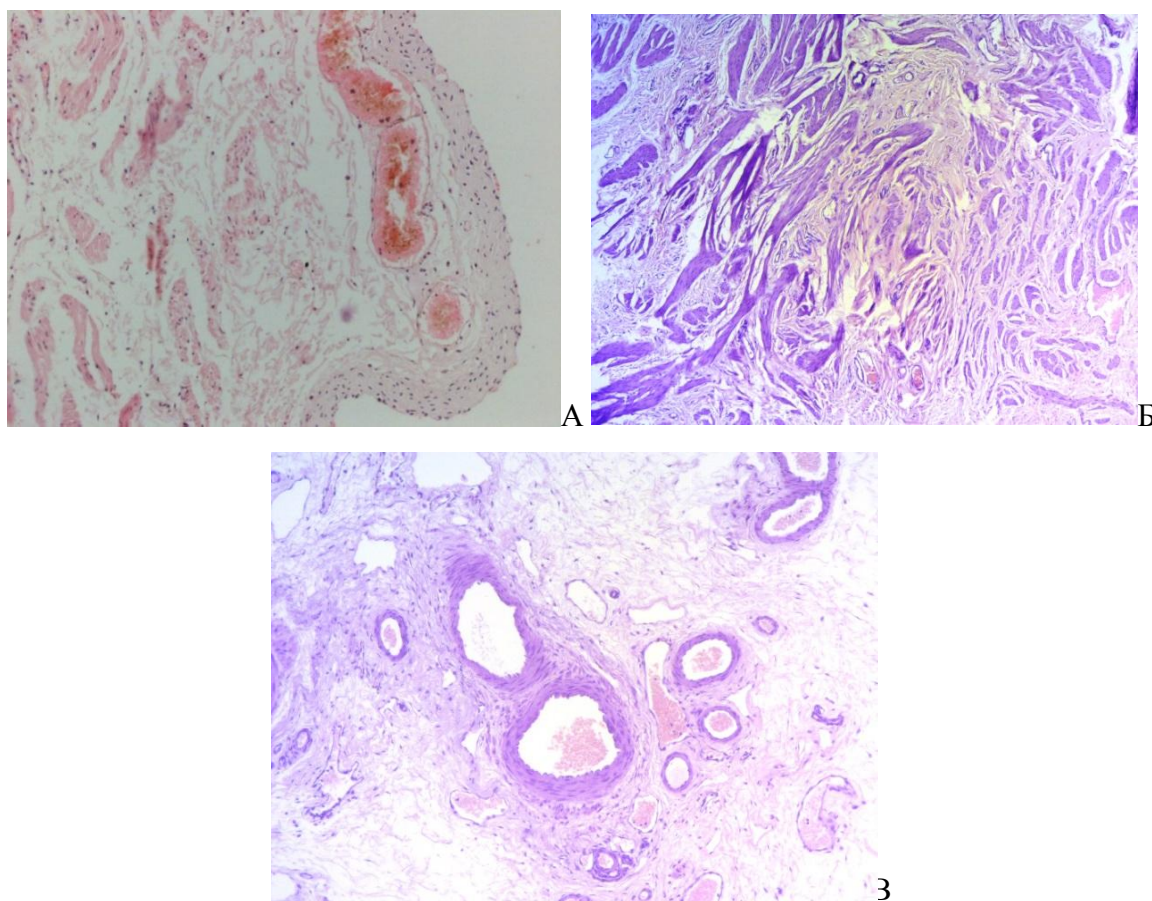


Рисунок 8 — Гистологическая картина мочевого пузыря через 1 месяц после цистопластики с использованием коллагеновой мембраны, содержащей кондиционированную среду культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека. А – формирование полноценной слизистой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином (x100), Б – регенерация гладкомышечных клеток в новообразованной стенке мочевого пузыря (x200), В – множественные новообразованные сосуды в регенерирующей стенке мочевого пузыря.

Окраска гематоксилином и эозином (x200)

Регенерация стенки мочевого пузыря после цистопластики стандартной коллагеновой мембраной приводит к существенно менее полноценному восстановлению структуры стенки реконструированного органа.

Таким образом, при использовании мембран, обогащенных культуральной средой стволовых клеток, происходит более быстрая и более полноценная регенерация новообразованной стенки мочевого пузыря, замещающей постепенно резорбирующийся имплантат. При этом формируется практически полноценная новообразованная стенка мочевого пузыря, содержащая все слои — полную эпителиальную выстилку, васкуляризированный подслизистый слой и выраженную гладкомышечную оболочку. Регенерация стенки мочевого пузыря после цистопластики стандартной коллагеновой

мембраной приводит к существенно менее полноценному восстановлению структуры стенки реконструированного органа.

В качестве контроля к сериям с заместительной цистопластикой мы провели опыты с простой резекцией стенки мочевого пузыря и ушиванием образовавшегося дефекта. Гистологическое исследование, проведенное через 1 месяц, выявило типичные признаки послеоперационного заживления стенки органа с образованием рубца из рыхлой соединительной ткани с регенерацией вокруг него пучков гладкомышечных клеток (Рисунок 9).

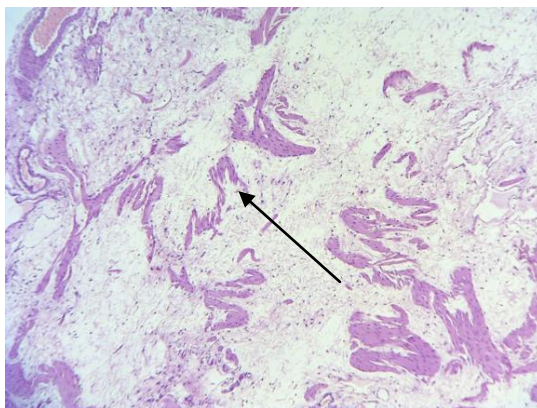


Рисунок 9 — Гистологическая картина зоны резекции мочевого пузыря через 1 месяц после операции (стрелкой указана зона рубца).

Окраска гематоксилином и эозином (x400)

Для более точной характеристики активности регенерационных процессов мы провели количественную оценку морфометрических параметров, характеризующих их интенсивность (Таблица 1).

Результаты этого анализа показали, что по сравнению с опытами с ушиванием дефекта стенки мочевого пузыря без цистопластики, использование стандартной коллагеновой мембраны сопровождается 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 со средой культивирования стволовых клеток отмечается почти полная резорбция имплантированной мембраны, наименьшие значения деэпителизированной внутренней поверхности стенки, наиболее выраженный ангиогенез и активная регенерация гладкомышечных клеток, значительно превышающая по интенсивности этот показатель в других сериях. Полученные данные убедительно доказывают положительный эффект включения в состав коллагеновой мембраны стимуляторов регенерации, выделяемых стволовыми клетками в среду их

Таблица 1 — Морфометрические параметры регенерации стенки мочевого пузыря через 1 месяц после его резекции в различных сериях

Серия опытов	Относительная занятая площадь ГМК клеток среди рыхлой соединительной ткани (мкм ²)	Относительная длина дезэпителизированной базальной мембраны в слизистой оболочке мочевого пузыря (мкм)	Относительная длина участков нерассосавшегося коллагена (мкм)	Количество сосудистых почек на единице относительной площади стенки мочевого пузыря.
Резекция без цистопластики	1,24±6,17	281,82±13,26	-	10,13±0,16
Цистопластика мембраной без КС	5,24±0,172	316,07±31.14	106,24±12,52	8,02±0,03
Цистопластика мембраной с КС	246,25±12,11***	164,05±22,18**	27,08±9,27***	15,27±0,17***

Примечание:

КС – кондиционированная среда культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека.

Достоверность различий: ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

культивирования, который даже превышает стимулирующий эффект сигнальных молекул, действующих при физиологической регенерации поврежденной стенки.

Важным этапом в нашем исследовании было изучение вопроса, 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.

Поскольку функциональная полноценность органа зависит от состояния его кровоснабжения, мы изучили интенсивность микроциркуляции методом спектрального анализа микроколебаний импеданса. При расположении электродов в зоне имплантированных коллагеновых мембран мы получали информацию о состоянии микроциркуляции между электродами локально в интересующей нас области. Анализ состояния кровоснабжения новообразованной стенки мочевого пузыря, определяемого по значениям пика С1 в спектрограмме колебаний импеданса, выявил, что через 7 дней после имплантации коллагеновой мембраны, как содержащей, так и не содержащей среду культивирования стволовых клеток, значения пика С1 находятся на минимальном уровне, колеблясь от 0,8 до 6 мОм. Через 30 дней после операции отмечали значительное увеличение значений пика С1 в обеих сериях опытов, что свидетельствовало о прогрессивной реваскуляризации новообразованной стенки мочевого пузыря. При этом степень возрастания пика С1 была

достоверно выше в группе животных, которым имплантировали коллагеновую мембрану, содержащую среду культивирования стволовых клеток, по сравнению с опытами, в которых использовали стандартную мембрану (Рисунок 10).

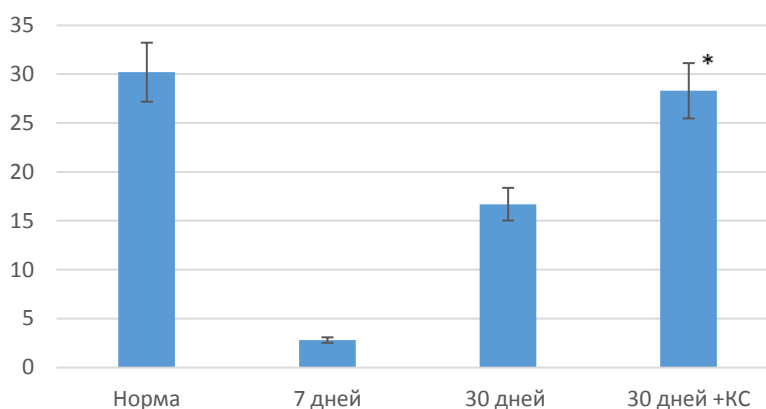


Рисунок 10 — Средние значения пика C1 (мОм), характеризующего состояние кровоснабжение стенки мочевого пузыря в зоне имплантации коллагеновых мембран. * - различия достоверны между группами мембран без КС и с КС

Важным показателем функционального состояния органа является сохранение взаимосвязи между интенсивностью кровоснабжения и выраженностью функциональной нагрузки, что отражает степень восстановления регуляторных взаимосвязей между этими параметрами. Измерение динамики значений пика C1 при наполнении мочевого пузыря до его максимальной емкости показало, что в обеих сериях происходит интенсификация кровообращения в стенке органа, как и в нормальном мочевом пузыре (Кирпатовский В.И. и соавт., 2014). Однако все значения в группе опытов с использованием коллагеновой мембраны со средой культивирования стволовых клеток оказались достоверно выше, чем в опытах с мембраной без культуральной среды (Рисунок 11). При этом значения внутрипузырного давления в обеих группах существенно не различались ($5,3 \pm 1,1$ и $4,9 \pm 1,4$ см водн. ст. в начале исследования и $32,4 \pm 2,2$ и $37,1 \pm 2,4$ см водн. ст. при максимальном наполнении мочевого пузыря, соответственно).

Через 10 минут в условиях максимального наполнения интрамуральный кровоток несколько снижался. При этом в первом случае он по-прежнему оставался выше исходных значений, тогда как во втором случае он уменьшался в большей степени.

Эти данные свидетельствуют, что при цистопластике с использованием коллагеновой мембраны, содержащей среду культивирования стволовых клеток, происходит не только более полноценная васкуляризация новообразованной стенки, но и в большей степени

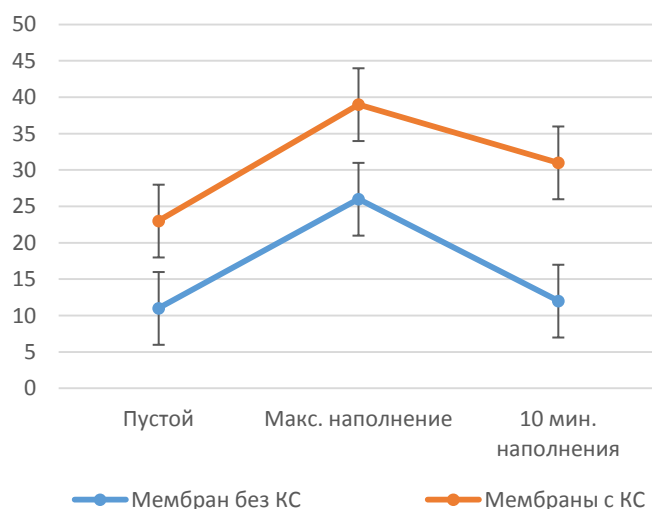


Рисунок 11 — Динамика пика C1 (мОм)
в процессе проведения инфузионной цистометрии

восстанавливается регуляция интраорганного кровотока в зависимости от функциональной нагрузки на орган.

При исследовании функции реконструированного мочевого пузыря мы оценивали параметры, характеризующие функцию накопления.

При исследовании изменения максимальной функциональной емкости мочевого пузыря сразу после резекции и через 1 месяц выявили, что в серии опытов с резекцией мочевого пузыря без цистопластики сразу после резекции его максимальная емкость уменьшалась с 38 ± 1 мл до 23 ± 1 мл ($p < 0,001$). Через 1 месяц после резекции она существенно не изменилась, составив 25 ± 1 мл. В опытах с замещением дефекта стенки мочевого пузыря после его резекции с использованием стандартной коллагеновой мембраны через 1 месяц после операции максимальная емкость мочевого пузыря составила 26 ± 1 мл, а при использовании коллагеновой мембраны, содержащей кондиционированную культуральную среду стволовых клеток, она достоверно возросла — до 35 ± 2 мл ($p < 0,01$), приблизившись к нормальным значениям (Рисунок 12).

Другим важным показателем функционального состояния мочевого пузыря является 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, содержащей среду культивирования стволовых клеток, комплаентность реконструированного мочевого пузыря не отличалась от нормы. В серии опытов с использованием коллагеновой мембраны без культуральной среды, а также при резекции без цистопластики отмечали резкое повышение

внутрипузырного давления даже при небольшом объеме введенной жидкости. (Рисунок 13).

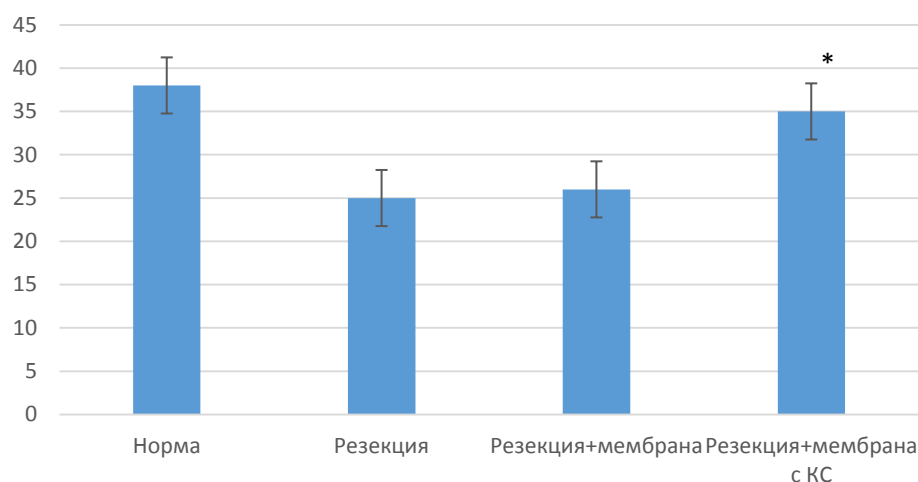


Рисунок 12 — Сравнение изменения максимальной емкости мочевого пузыря (мл) через 1 месяц после его резекции без и с заместительной цистопластикой различными коллагеновыми мембранами.

* — различия достоверны по сравнению с резекцией мочевого пузыря без цистопластики

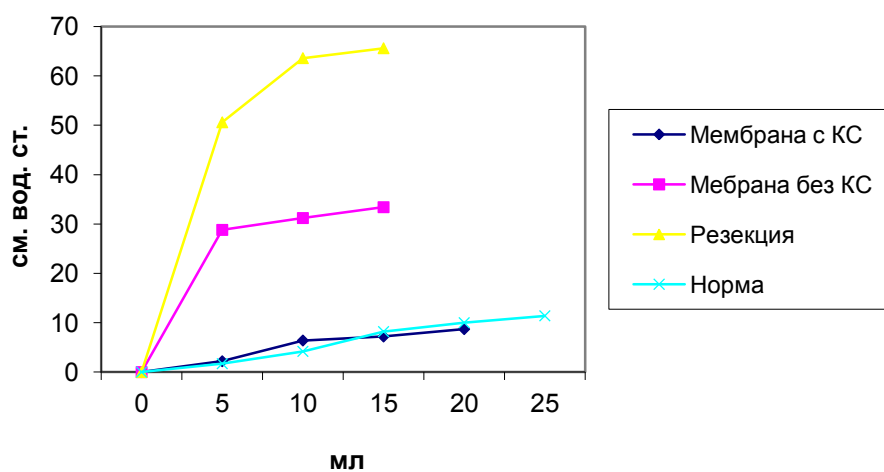


Рисунок 13 — Зависимость «объем/давление» при инфузионной цистометрии в разных сериях опытов

Таким образом, в этих опытах COMPLAINTность 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. Наихудшие результаты, полученные в опытах с резекцией

мочевого пузыря без цистопластики, могут быть связаны с уменьшением его функциональной емкости и рубцеванием стенки в зоне ушивания дефекта.

Проанализировав результаты экспериментальных исследований, мы посчитали возможным провести клиническую апробацию использования препаратов коллагена I типа для заместительной пластики мочевых путей. У больной с протяженным ятрогенным дефектом стенки мочеточника на границе верхней и средней трети, развившимся при контактной литотрипсии, и паранефральной гематомой заменили поврежденный участок трубчатым коллагеновым имплантатом. В течение 8 месяцев имплантат обеспечивал адекватный транспорт мочи, но позднее начали развиваться обструктивные осложнения. Причина их точно неизвестна. Предположительно формирование стриктуры мочеточника могло быть следствием склерозирования периуретральных тканей как следствие периренальной гематомы. Косвенно об этом свидетельствует позднее начало обструктивной симптоматики. Если бы стриктура сформировалась вследствие сморщивания коллагенового имплантата, то симптомы нарушения оттока мочи от почки появились бы значительно раньше. Его замещение тканями организма, по нашим данным, происходит в течение 1 месяца, и к этому сроку он должен был давно рассосаться.

Поскольку в данном наблюдении был использован коллагеновый протез, не содержащий продуктов секреции стволовых клеток, то, согласно нашим данным, он должен был заместиться преимущественно соединительной тканью, но длительность адекватного дренирования почки в течение 8 месяцев свидетельствует, что это не ухудшило транспорт мочи.

Впоследствии все манипуляции были направлены на восстановление оттока мочи. После установки спирали «Мемокат» проходимость мочеточника была восстановлена и адекватный дренаж мочи обеспечивался в течение 1,5 лет, после чего вновь появились симптомы обструкции. Обследование показало, что его причиной было избыточное разрастание слизистой оболочки и ее протрузия через спираль, что является нередким осложнением этого вида эндопротезирования. То есть, последующее рецидивирование нарушения оттока мочи уже не было связано с коллагеновым имплантатом, а являлось следствием реакции тканей мочеточника на имплантированный эндопротез.

Проведенный анализ этого случая позволил заключить, что, хотя у этой больной отдаленный послеоперационный период требовал периодических медицинских вмешательств, тем не менее, он подтвердил принципиальную возможность использования коллагенового материала для пластики мочевых путей. Однако, безусловно, необходимы специальные исследования для отработки показаний и противопоказаний для данного вида лечения урологических больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные экспериментальные исследования и клиническое наблюдение свидетельствуют о целесообразности и перспективности изучения возможностей использования препаратов из коллагена I типа для заместительной пластики мочевых путей. Нами продемонстрировано, что включение в состав коллагеновых препаратов компонентов, стимулирующих регенерацию тканевых структур (в наших опытах – кондиционированная среда культивирования МСК жировой ткани человека), существенно ускоряет регенерацию новообразованной стенки мочевых путей, ускоряет и улучшает ее васкуляризацию, стимулирует регенерацию гладкомышечных элементов, что способствует более полноценному восстановлению функции реконструированного органа.

Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Коллагеновые мембраны, изготовленные из тканей свиньи, вызывают менее выраженную воспалительную реакцию в окружающих тканях, по сравнению с мембранами из бычьего коллагена.

2. Коллагеновые мембраны, изготовленные из тканей свиньи, обладают большей биоинертностью и способностью инкорпорироваться в ткани мочевого пузыря, чем мембраны из коллагена крупного рогатого скота. При заместительной пластике уретры также происходит инкорпорация коллагенового протеза в собственные ткани.

3. Имплантированная коллагеновая мембрана постепенно замещается тканью мочевого пузыря и уретры с практически полной эпителизацией и резорбцией коллагена через 1 месяц после цистопластики.

4. Включение в состав мембраны из свиного коллагена кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека ускоряет регенерацию новообразованной стенки мочевого пузыря после его резекции.

5. При включении в состав мембраны из свиного коллагена кондиционированной среды культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека происходит более полноценная реваскуляризация новообразованной стенки мочевого пузыря с вращением в нее гладкомышечных клеток детрузора, тогда как при использовании мембран без культуральной среды коллагеновый протез замещается преимущественно соединительной тканью.

6. Использование коллагеновых мембран, содержащих кондиционированную среду культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, для заместительной цистопластики способствует более полноценному восстановлению функции реконструированного мочевого пузыря по сравнению с использованием мембран, не содержащих среду культивирования, и при простом ушивании резецированного мочевого

пузыря.

7. Клиническое применение коллагенового имплантата для заместительной пластики мочеочника выявило принципиальную возможность использования этого метода лечения.

Полученные выводы позволяют сформулировать **практические рекомендации**:

1. Модель пластики мочевого пузыря целесообразно использовать для изучения пригодности различных материалов для заместительной пластики мочевых путей в связи с ее технической простотой и высокой воспроизводимостью.

2. При пластике уретры различными биологическими или синтетическими протезами ключевым моментом в достижении результатов является обеспечение адекватного дренирования мочевых путей в течение 3-5 дней после операции, для чего необходимо использовать специальные приемы и осуществлять ежедневный контроль за животными. Неадекватное дренирование уретры ведет к формированию мочевых затеков, воспалению и формированию свищей и облитерации уретры.

3. Для заместительной пластики мочевых путей предпочтительнее использование мембран из коллагена I типа, изготовленных из ткани свиней.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Учитывая полученные положительные результаты проведенного исследования, целесообразно продолжение работы в следующих направлениях:

- анализ более отдаленных результатов пластики мочевых путей (до 6 месяцев)
- разработка технологии изготовления коллагеновых мембран большого размера для их испытаний на крупных лабораторных животных;
- увеличение прочности коллагеновых мембран за счет их армирования биodeградируемой синтетической сеткой;
- разработка методов замедления высвобождения из мембран включенных в них биологических компонентов для пролонгации эффекта стимуляции регенерации стенки мочевых путей;
- оценка возможностей использования коллагеновых материалов, содержащих стимуляторы регенерации для замещения мочеочника и уретры.
- целесообразно продолжение исследований по использованию коллагеновых материалов с включением в них различных биологических компонентов, стимулирующих васкуляризацию и регенерацию тканей для разработки оптимальных методов заместительной различных отделов пластики мочевых путей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Замещение дефектов стенки мочевого пузыря мембраной, созданной на основе коллагена I типа (экспериментальное исследование) / А.А. Камалов, В.А. Максимов, В.И. Кирпатовский, Ю.В. [и соавт.] // Урология. – 2012. – Том 6. – С. 33-37.
2. Коллагеновые биоматрицы в реконструктивной урологии. / А.А. Камалов, В.И. Кирпатовский, Д.А. Охоботов, Д.М. Камалов [и соавт.] // Урология. – 2015. – Том 2. – С. 103-106.
3. Использование мембран из коллагена I-го типа для замещения стенки мочевого пузыря. / В.И. Кирпатовский, А.Ю. Ефименко, В.Ю. Сысоева, И.С. Мудрая [и соавт.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Том 162. – С. 117-122.
4. Заместительная пластика мочевого пузыря с использованием комбинированной мембраны на основе продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток человека и коллагена I типа / В.И. Кирпатовский, Д.М. Камалов, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич [и соавт.] // Урология. – 2016. – Том 6. – С. 34-42.

**ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ПЛАСТИКА МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ
ПРЕПАРАТАМИ ИЗ КОЛЛАГЕНА I ТИПА**

Камалов Давид Михайлович
(РОССИЯ)

В диссертационной работе представлены результаты, свидетельствующие о целесообразности и перспективности использования препаратов из коллагена I типа для заместительной пластики мочевых путей. Продемонстрировано, что включение в состав коллагеновых препаратов компонентов, стимулирующих регенерацию тканевых структур (кондиционированная среда культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека), существенно ускоряет регенерацию новообразованной стенки мочевых путей, ускоряет и улучшает ее васкуляризацию, стимулирует регенерацию гладкомышечных элементов, что способствует более полноценному восстановлению функции реконструированного органа.

**SUBSTITUTIVE PLASTY OF THE URINARY TRACT
BY PRODUCTS FROM COLLAGEN I TYPE**

Kamalov David Mikhailovich
(RUSSIA)

The thesis is presenting results that testify to the expediency and prospects of studying the possibilities of using products from collagen type I for substitutive plasty of the urinary tract. It has been demonstrated that the inclusion of components stimulating the regeneration of tissue structures (the conditioned medium for the cultivation of mesenchymal stem cells of human adipose tissue) in collagen preparations significantly accelerates the regeneration of the newly formed urinary tract wall, accelerates and improves its vascularization, stimulates the regeneration of smooth muscle cells, which contributes to a more complete recovery functions of the reconstructed organ.