

УДК 612.084

Экспериментальная реконструкция мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения

Н.В. Орлова¹, А.Н. Муравьев¹, Т.И. Виноградова¹, Н.М. Блюм³,
Н.Ю. Семенова¹, Н.М. Юдинцева², Ю.А. Нащекина², М.И. Блинова²,
М.А. Шевцов², М.Л. Витовская¹, Н.В. Заболотных¹, М.Г. Шейхов¹

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России;

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

³ НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург

Experimental reconstruction of rabbit bladder using allogeneic cells of different tissue origin

N.V. Orlova¹, A.N. Murav'ev¹, T.I. Vinogradova¹, N.M. Blyum³, N.Yu. Semenova¹,
N.M. Yudinseva², Yu.A. Nashchekina², M.I. Blinova², M.A. Shevtsov²,
M.L. Vitovskaya¹, N.V. Zabolotnykh¹, M.G. Sheikhov¹

¹ St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology of the Russian Ministry of Health;

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

³ Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

© Коллектив авторов, 2016 г.

Резюме

Целью настоящего исследования является изучение возможности экспериментальной реконструкции мочевого пузыря с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения. Многокомпонентные композиты на основе поли-L-лактида, заселенные различными аллогенными клетками, трансплантированы после парциальной резекции МП 4 группам кроликов-самцов. Через 2 мес наблюдения в группах, получивших бесклеточные матрицы (контроль) и скаффолды с фибробластами и с уротелием/гладкими миоцитами, наблюдалась различной степени выраженности воспалительная реакция с уменьшением емкости мочевого пузыря и отторжением трансплантата в окружающую МП жировую клетчатку или в просвет органа. Однако в группе, получившей

скаффолд, содержащий мезенхимальные стволовые клетки, воспалительные изменения в месте имплантации были минимальными, без значимого уменьшения емкости мочевого пузыря. В месте имплантации определялся участок измененной слизистой оболочки, в котором гистологически выявлены начальные стадии репарации и ангиогенеза.

Ключевые слова: тканевая инженерия; мочевой пузырь; аллогенные клетки; мезенхимальные стволовые клетки

Summary

The aim of current study is to research the possibility of an experimental urinary bladder reconstruction using allogeneic cells of different tissue origin. Multicomponent grafts

based on poly-L,L-lactide were seeded with different allogeneic cells and transplanted to 4 groups of male rabbits after partial resection of the urinary bladder. 2 months post transplantation all animals which received control scaffolds without cells and scaffolds seeded with fibroblasts and urothelium/smooth muscle cells demonstrated different grades of bladder inflammation with decrease of its capacity and rejection of transplanted scaffold in the perivesical fat or into the bladder lumen. Opposite in

group with scaffolds seeded with mesenchymal stem cells the grade of inflammation at the implantation site was minimal without significant decrease of urinary bladder capacity. Also in the site of implantation an area of newly formed mucosa was visualized with histologically proved initial stages of reparation and angiogenesis.

Keywords: tissue engineering; urinary bladder; allogeneic cells; mesenchymal stem cells

Введение

Реконструкция мочевого пузыря (МП) фрагментами желудочно-кишечного тракта, несмотря на высокую травматичность операции и большое число осложнений, на сегодняшний день является «золотым стандартом». Поэтому неустанно продолжается поиск альтернативных аналогов стенки МП.

Зарубежными учеными предпринят удачный опыт замещения МП у 14 собак выращенным *in vitro* тканевым лоскутом. Далее сгенерированный *in vitro* резервуар успешно трансплантирован человеку. Однако исследователи в качестве источника клеток использовали собственные ткани МП, что невозможно у пациентов с отсутствующими здоровым уротелием и мышечной стенкой. Причиной таких состояний может быть множество заболеваний мочеполовой системы, в том числе и туберкулез. Перспективной для таких пациентов является аллогенная клеточная трансплантация.

Известно, что некоторые клетки организма не обладают выраженной иммуногенностью. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают способностью модулировать иммунный ответ. Потенциал МСК костного мозга дифференцироваться в клетки, имеющие свойства гладкомышечных клеток (ГМК) мочевого пузыря, доказан *in vitro* и на различных животных моделях. Однако вопросы возможности применения аллогенных клеток до сих пор полностью не изучены.

Целью нашего исследования является изучение возможности экспериментальной реконструкции мочевого пузыря с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для приготовления матрицы взят полимер на основе молочной кислоты — поли-L,L-лактид, укрепленный фиброином шелка в соотношении 1:1. В полученные матрицы ввели коллагеновый гель с аллогенными клетками различного тканевого происхождения: две матрицы заселены аллогенными ГМК и уротелием (1-я группа), две — аллогенными фи-

бробластами (ФБ, 2-я группа), выделенными и культивированными по стандартной методике, еще две матрицы оставлены бесклеточными (3-я группа) и две — аллогенными МСК костного мозга кроликов, которые для последующей идентификации мечены суперпарамагнитными наночастицами на основе магнетита (4-я группа). Приготовленные многокомпонентные композиты трансплантированы после парциальной резекции МП 8 кроликам-самцам породы «шиншилла». Результаты оценивались после 2 мес наблюдения.

Результаты. Все животные перенесли операцию хорошо. За период наблюдения в анализах крови и мочи не зафиксировано патологических сдвигов, также отмечался адекватный прирост массы тела кроликов. При макроскопическом осмотре патологических изменений со стороны внутренних органов (кроме МП) у всех 8 животных не выявлено: паренхиматозные органы визуально не изменены, патологический выпот в брюшной полости отсутствовал, внутрибрюшные лимфатические узлы визуально не увеличены. Мочевые пузыри животных исследованы макро- и микроскопически.

Трансплантация конструкции, содержащей аллогенные ГМК и уротелий, в 1-й группе вызвала выраженную воспалительную реакцию с уменьшением емкости мочевого пузыря, формированием втянутого рубца в месте имплантации и вытеснением трансплантата в окружающую МП жировую клетчатку, его инкапсуляцией и некрозом.

У животных из 2-й группы (ФБ) наблюдалась выраженная воспалительная реакция со значительным снижением емкости и комплаентности МП, приведшей у одного животного к формированию гидронефроза. В обоих случаях матрица обнаружена в просвете МП, грубо спаянного с окружающими тканями.

В 3-й группе (матрицы без клеток) у обоих животных матрица, покрытая конкрементами, обнаружена в просвете МП. Так же как и в 1-й группе, в месте имплантации сформировался втянутый рубец с папиллярными разрастаниями слизистой оболочки. Емкость мочевого пузыря была значительно снижена в обоих случаях. Вне зоны имплантации стенки МП

утолщены, ригидны, отмечен выраженный спаечный процесс вокруг МП.

Несколько отличается картина в 4-й группе (МСК-содержащий скаффолд). Емкость мочевого пузыря через 2 мес после операции оказалась сравнима с дооперационной, стенки МП вне зоны имплантации визуально были нормальными. В месте имплантации определялся участок измененной слизистой оболочки с признаками васкуляризации. Гистологически выявлены начальные стадии репарации и ангиогенеза. Наличие меченых МСК в зоне имплантации подтверждено данными магнитно-резонансной томографии.

Обсуждение результатов и выводы

Воздействие аллогенных МСК на иммунный ответ представляет огромный научный интерес на се-

годняшний день. В проведенном эксперименте при пересадке МСК-содержащего скаффолда не отмечено значимой воспалительной реакции и признаков отторжения имплантата. Возможно, это связано с уникальными свойствами МСК. Ведь во всех случаях трансплантации бесклеточных конструкций или матриц, содержащих аллогенные ФБ, ГМК и уротелий, активная воспалительная реакция сохранялась даже по истечении 2 мес опыта. Более того, процесс распространялся на прилежащие ткани, чего не наблюдалось в опыте с МСК.

Дальнейшая разработка методик создания многокомпонентного трансплантата с использованием аллогенных клеток может способствовать улучшению результатов лечения патологических состояний, при которых получение аутологичного материала не представляется возможным.

Поступила в редакцию 25.11.2015 г.

Орлова Надежда Валерьевна, аспирант ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; nadinbat@gmail.com;

Муравьев Александр Николаевич, рук. отд. фтизионефрологии и урологии ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; urolog5@gmail.com;

Виноградова Татьяна Ивановна, главный н. с. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 187000, Ленинградская обл., Тосно, ул. М. Горького, д. 21, кв. 41; vinogradova@spbniif.ru;

Блюм Наталья Михайловна, н. с. лаб. патоморфологии отд. патологии НИЦ ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, 192148, Санкт-Петербург, ул. Седова, д. 34, кв. 7; blumn@mail.ru;

Семенова Наталья Юрьевна, н. с., патологоанатомическое отд. ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; natuciel87@gmail.com;

Юдинцева Наталья Михайловна, с. н. с. лаб. биологии клетки в культуре отд. клеточных культур ФГБУН Институт цитологии РАН, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4; yudintceva@mail.ru;

Нащекина Юлия Александровна, с. н. с. лаб. биологии клетки в культуре отд. клеточных культур ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4; ulychka@mail.ru;

Блинова Миральда Ивановна, в. н. с. лаб. биологии клетки в культуре отд. клеточных культур ФГБУН Институт цитологии Российской Академии наук, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4; mira.blinova@mail.ru;

Шевцов Максим Александрович, н. с. лаб. биологии клетки в культуре отд. клеточных культур ФГБУН Институт цитологии Российской академии наук, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4; shevtsov-max@mail.ru;

Заболотных Наталья Вячеславовна, в. н. с. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 190121, Санкт-Петербург, ул. Псковская, д. 13, кв. 15; zabol-natal@yandex.ru;

Витовская Мария Львовна, с. н. с. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 195271, Санкт-Петербург, ул. Бестужевская, д. 27, кв. 2; mariavit72@mail.ru;

Шейхов Магомедсадык Гасанович, аспирант ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; sheykhov@mail.ru