

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 576.5+57.017.35
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-457-465>

Поступило в редакцию 10.12.2018
Received 10.12.2018

**С. В. Пинчук¹, А. Ю. Молчанова², И. Б. Василевич¹, И. П. Жаворонок², Е. И. Пехтерева²,
О. А. Антипова², член-корреспондент И. В. Залуцкий², академик И. Д. Волотовский¹**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА СПОНГОСТАН
В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕДЕРЖАНИЯ МОЧИ У КРЫС**

Аннотация. Изучены адгезия и пролиферация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани крысы в составе биокомпозита с носителем на основе гемостатического препарата Спонгостан (Spongostan Absorbable Haemostatic Gelatin Powder), а также регенерационная эффективность биокомпозита при его введении в парауретральную область крысам с экспериментальным недержанием мочи. Установлено, что МСК быстро адгезируют на поверхности носителя и активно пролиферируют. Введение биокомпозита (Спонгостан + МСК) в парауретральную область быстро и эффективно восстанавливает функцию удержания мочи в мочевом пузыре у животных после моделирования недержания посредством уретролизиса. Спонгостан, гидратированный в соотношении 1 : 24 в фосфатно-солевом буфере, оказывает также объемообразующее действие в области уретры экспериментальных животных.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, препарат Спонгостан, клеточная терапия, недержание мочи, уретролизис

Для цитирования: Использование гемостатического препарата Спонгостан в качестве носителя мезенхимальных стволовых клеток при лечении экспериментального недержания мочи у крыс / С. В. Пинчук [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 457–465. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-457-465>

**Sergei V. Pinchuk¹, Alla Yu. Molchanova², Irina B. Vasilevich¹, Irina P. Zhavoronok², Elena I. Pekhtereva²,
Olga A. Antipova², Corresponding Member Iosif V. Zalutski², Academician Igor D. Volotovskii¹**

¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**USE OF HEMOSTATIC DRUG SPONGOSTAN AS A CARRIER OF MESENCHYMAL STEM CELLS
IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL URINARY INCONTINENCE IN RATS**

Abstract. The adhesion and proliferation of rat adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) as part of biocomposite with haemostatic drug Spongostan Absorbable Haemostatic Gelatin Powder as well as its regenerative efficiency after its introduction into the periurethral region in rats with experimental urinary incontinence were studied. It was found that MSCs rapidly adhere to the surface of the carrier and actively proliferate. The periurethral injection of biocomposite (Spongostan + MSCs) quickly and effectively recovers the urine continence function in animals that have undergone modeling of incontinence by urethrolysis. Spongostan hydrated in the ratio of 1 : 24 in phosphate-saline buffer has a volume-forming effect in the urethra of experimental animals.

Keywords: mesenchymal stem cells, Spongostan, cell therapy, urinary incontinence, urethrolysis

For citation: Pinchuk S. V., Molchanova A. Yu., Vasilevich I. B., Zhavoronok I. P., Pekhtereva E. I., Antipova O. A., Zalutski I. V., Volotovskii I. D. Use of hemostatic drug Spongostan as a carrier of mesenchymal stem cells in the treatment of experimental urinary incontinence in rats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 457–465 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-457-465>

Введение. Недержание мочи (НМ) у женщин и мужчин – широко распространенное заболевание, возникающее в основном под влиянием действия патофизиологических, возрастных, постоперационных и других факторов и представляющее собой серьезную медицинскую и социально-экономическую проблему. Под НМ обычно понимают любой непроизвольный выход мочи из мочеиспускательного канала, который не контролируется пациентом. В норме удержание мочи в мочевом пузыре достигается с помощью сфинктера и компрессии уретры окружающими ее тканями. Последнее особенно важно для удержания мочи при росте давления в мочевом пузыре в результате увеличения внутрибрюшного давления во время физических действий (ходьба, бег, поднятие тяжестей и т. п.) или «стрессовых» ситуаций (смех, чихание, кашель и т. п.). Эффективное удержание мочи в описанных ситуациях достигается вследствие трансмиссии импульса внутрибрюшного давления на уретру окружающими ее тканями, находящимися в состоянии особого тонуса, что компенсирует рост внутрипузырного давления и препятствует попаданию мочи в мочеиспускательный канал. Несостоятельность околоуретральных тканей ослабляет компрессию уретры и ведет к развитию стрессовой формы НМ, называемой еще НМ при напряжении. Данная форма НМ у мужчин и женщин составляет около 50 % всех случаев данной патологии. Принято выделять также ургентное НМ, обусловленное гиперактивностью мочевого пузыря, и смешанное, когда у пациента регистрируется симптоматика и стрессового, и ургентного недержания. По данным ряда эпидемиологических исследований симптомы НМ могут проявляться более чем у 30 % женщин и 5 % мужчин [1; 2]. НМ приближается к 100 % у мужчин, перенесших оперативное удаление простаты по поводу аденомы или рака.

В настоящее время лечение данного заболевания осуществляется с использованием фармакологических препаратов и хирургических процедур, основанных на использовании слинг-систем или введении в область сфинктера и уретры объемобразующих препаратов. Учитывая отсутствие радикальной эффективности общепринятых методов лечения НМ и высокую частоту осложнений при лечении, в последние годы внимание клиницистов сконцентрировано на клеточных технологиях лечения [3] – введение в область сфинктера и уретры прогениторных клеток, в том числе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [4]. В случае клеточных технологий применяют продукты не только в виде суспензии МСК, но и в виде биокомпозитов (клетки + носитель), что обеспечивает сохранность и фиксацию клеток в месте введения, приводя к оптимизации эффективности терапевтического действия. К биологическим и физико-химическим свойствам носителей предъявляются следующие требования: носитель должен быть биосовместимым, биodeградируемым, выступать в роли матрицы для адгезии клеток. В случае использования биокомпозитов для лечения НМ механические свойства носителя должны обеспечивать его функционирование в роли объемобразующего средства.

В настоящей работе в качестве носителя МСК в составе биокопозита исследовали гемостатический препарат Спонгостан, изготовленный в форме порошка (Spongostan Absorbable Haemostatic Gelatin Powder). Данный препарат широко применяется в хирургической практике, биосовместим и не вызывает побочных реакций.

Цель работы – изучение адгезии и пролиферации МСК в составе биокомпозита с препаратом Спонгостан и регенерационной эффективности биокомпозита при его введении в парауретральную область крысам с экспериментальным недержанием мочи.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на МСК из жировой ткани крыс-самок линии Вистар. Для выделения МСК была проведена ферментативная обработка гомогената жировой ткани 0,25 %-ным раствором коллагеназы в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,2, при 37 °C в течение 30 мин. Полученную клеточную суспензию фильтровали через капроновый фильтр (диаметр пор 100 мкм), центрифугировали при 370 g в течение 10 мин. После удаления супернатанта осадок заливали полной ростовой средой DMEM (среда Игла модифицированная по способу Дульбекко), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 1 % базового раствора комплексного антибиотика-антимикотика. Затем клетки высевали в количестве $2 \cdot 10^5$ кл/см² в культуральные флаконы (Sarstedt, Германия), культивировали в течение 24 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере при 5 % CO₂. После этого среду с неадгезированными клетками удаляли и после промывки ФСБ меняли на свежую. Последую-

шую смену ростовой среды проводили каждые 72 ч. При достижении 70–80 % конfluenceности монослоя клетки переводили в суспензию, обрабатывая их раствором трипсина (0,25 %) и ЭДТА (0,02 %) и рассеивали в количестве $5 \cdot 10^3$ кл/см² на следующий пассаж. Для проведения экспериментов и изготовления биокомпозита использовали клетки 2–3-го пассажа.

Для определения иммунофенотипа МСК клетки в количестве $1 \cdot 10^5$ ресуспендировали в 100 мкл ФСБ, вносили в суспензию связанные с флуорофорами антитела против антигенов CD29, CD44, CD45 (FITC – флуоресцеинизотиоцианат), CD90 (PE – фикоэритрин) в разведениях согласно инструкции фирмы-производителя (Thermo Scientific, RD Systems). Клетки инкубировали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре, промывали 2 раза в ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре (FACSCanto II, Becton Dickinson, США). В качестве контроля использовали МСК, не инкубированные с антителами. Анализ иммунофенотипа МСК показал, что клетки культуры экспрессируют маркеры CD90 (>99 %), CD29 (>95 %) и CD44 (>95 %), типичные для МСК, в то время как экспрессия маркера гемопоэтических клеток была незначительна: CD45 (<2 %).

Микроскопию в режиме флуоресценции проводили на инвертированном микроскопе Olympus IX71, используя флуоресцентный фильтр-куб для зеленой области с параметрами возбуждения флуоресценции 420–495 нм и ее регистрации при 505–580 нм. К образцам с МСК (0,1–1,0 мл) в чашках Петри добавляли ФСБ, содержащий флуоресцентный краситель флуоресцеин диацетат (ФДА) в концентрации 0,5 мкг/мл, инкубировали 10 мин в темноте при комнатной температуре. Флуоресценцию регистрировали цифровой камерой DP72. Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Cell F (Olympus, Япония).

Для приготовления биокомпозита препарат Спонгостан предварительно гидратировали в ФСБ в соотношении 1 : 12 и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Биокомпозит получали смешиванием 0,5 мл гидратированного препарата и 0,5 мл суспензии МСК ($5 \cdot 10^5$ клеток). Для изучения адгезии МСК на поверхности препарата биокомпозит инкубировали при 37 °С в течение 1, 2 и 3 ч. Затем 0,04 мл биокомпозита помещали в чашку Петри, смешивали с 0,40 мл ФСБ, содержащего ФДА, и анализировали на флуоресцентном микроскопе в режиме флуоресценции или фазового контраста.

Для изучения пролиферации МСК при взаимодействии клеток с препаратом Спонгостан 1 мл гидратированного в питательной среде DMEM порошка в соотношении 1 : 24 равномерно распределяли по поверхности чашки Петри (3,5 см). К препарату осторожно добавляли 2 мл суспензии МСК (30 тыс. клеток) в полной ростовой среде и культивировали до 12 сут. Для визуализации клеток методом флуоресцентной микроскопии ростовую среду удаляли и замещали 2 мл ФСБ с ФДА. Образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе после 30 мин инкубации в темноте при комнатной температуре.

Исследования выполнены на самках крыс линии Вистар массой 200–250 г. Эксперименты проведены с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики») в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований. Эксперименты начинали в одно и то же время суток, учитывая хронобиологическую зависимость большинства физиологических процессов в организме. Экспериментальные животные были поделены на следующие группы: интактный контроль ($n = 16$); животные, у которых моделировали НМ ($n = 25$); животные, которым в парауретральную область на фоне экспериментального НМ вводили гидратированный препарат Спонгостан ($n = 25$); животные, в парауретральную область которых на фоне НМ вводили биокомпозит (смесь препарата Спонгостан и МСК) ($n = 25$).

Моделирование стресс-индуцированного недержания у крыс осуществляли путем трансабдоминального уретролизиса по модифицированному методу [5]. Животных наркотизировали посредством внутривенного введения (в латеральную вену хвоста) тиопентала натрия в дозе 30 мг/кг, растворенного в воде для инъекций. Для инфильтрационной анестезии использовали раствор лидокаина гидрохлорида (1 %), 30–40 мкл на крысу, внутривенно в область таза. После достижения достаточной глубины наркоза животным производили лапаротомию широ-

ким доступом, производя разрез брюшистым скальпелем по нижней части средней линии живота примерно 2–3 см. Вокруг проксимальной и дистальной части уретры по окружности рассекали париетальную фасцию таза, а также точным разрезом отделяли уретру от передней стенки влагалища и лобковой кости, не повреждая при этом уретру, стенку влагалища или сосуды нижней части пузыря. Затем брюшную полость санировали раствором хлоргексидина биглюконата (0,05 %), после чего послойно ушивали кожно-мышечную рану. Для предупреждения развития инфекций крысам ежедневно однократно подкожно вводили Байтрил в дозе 12,5 мг/кг на протяжении 5 дней после вмешательства. Судя по литературным данным [5], лапаротомический доступ в область мочевого пузыря и мочеоточника, хирургическое отделение уретры от окружающих тканей сопровождается структурно-морфологическими изменениями в парауретральной области (апоптоз клеток, дегенерация нервных элементов, атрофия мышечных волокон), что и приводит в конечном итоге к НМ.

Для измерения давления в мочевом пузыре крысы при вытекании первой капли мочи животным под наркозом проводили лапаротомию широким доступом, выделяли мочевой пузырь и через купол мочевого пузыря вводили канюлю с инъекционным портом, после чего иглу аккуратно вынимали, оставляя в полости пузыря лишь катетер. Внутрипузырный катетер соединяли посредством инфузионной магистрали (заранее заполненной апирогенным физиологическим раствором NaCl 0,9 %) и медицинских трехходовых соединителей с датчиком давления и шприцевым насосом для инфузии мочевого пузыря и регистрации давления в нем. Опорожняли мочевой пузырь (пассивно) и проводили инфузию мочевого пузыря апирогенным физиологическим раствором со скоростью 100 мкл/мин. За давление вытекания первой капли (LPP, пороговое давление) была принята разница между давлением непосредственно перед мочеиспусканием и базовым давлением в момент начала инфузии. После окончания измерения катетер аккуратно извлекали, герметизируя место прокола медицинским клеем.

Введение гидратированного препарата или биокомпозита в парауретральную область крыс проводили после лапаротомии широким доступом парауретрально в области средней трети уретры. Каждой крысе с помощью шприца вводили 100 мкл гидратированного препарата или биокомпозита за 4 инъекции (по 25 мкл каждая) на 3, 6, 9 и 12 часов условного циферблата. Спонгостан отдельно и в составе биокомпозита гидратирован в ФСБ в соотношении 1 : 24, содержание МСК в 100 мкл биокомпозита – $3,5 \cdot 10^5$ клеток.

Анализ данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение. Такие биополимеры, как коллаген и его денатурированная форма – желатин, рассматриваются многими исследователями в качестве наиболее оптимальных компонентов для создания матрицы-носителя стволовых клеток в составе биокомпозитов [6]. При этом желатин, по-видимому, является более предпочтительным, поскольку он в результате денатурации более инертный и менее иммуногенный по сравнению с коллагеном. Примером такого носителя являются нерастворимые в воде желатиновые микросферы Cultispher, на поверхности которых МСК эффективно адгезируют и активно пролиферируют, сохраняя при этом свой иммунофенотип и дифференцировочный потенциал [6; 7]. Однако в медицинской практике такой носитель применять нельзя ввиду отсутствия разрешения для его клинического использования. Наиболее близким по структуре и физико-химическим свойствам к желатиновым микросферам и разрешенным к клиническому применению является гемостатический желатиновый препарат – порошок Спонгостан (Spongostan Absorbable Haemostatic Gelatin Powder). Данный препарат изготавливается на основе свиного желатина, обработанного формальдегидом, обладает хорошей биосовместимостью и не вызывает отрицательных эффектов в организме. При этом он нерастворим в водной среде и длительное время сохраняет в ней свою структуру: полное рассасывание препарата происходит через 4–6 недель после введения в организм человека. При разведении порошка Спонгостан в пропорции согласно инструкции по применению (1 : 7) получается густая пастообразная масса. Поскольку при введении гемостатической пасты Спонгостан в парауретральную область нельзя исключить дальнейшую гидратацию препарата, ведущую к увеличению его объема и оказанию избыточного давления на окружающие ткани, были

определены условия максимальной гидратации носителя. Проведенные эксперименты показали, что полная гидратация порошка Спонгостан происходит при соотношении препарата к жидкости 1 : 24, а дальнейшее увеличение жидкости ведет к появлению водной фракции без препарата. В условиях полной гидратации Спонгостан представляет собой вязкую желеобразную массу, которая способна проходить через иглу 27G (внутренний диаметр 300 мкм), что указывает на возможность использования его в такой форме в качестве носителя инъекционного биокомпозита.

Для изучения адгезии МСК при их взаимодействии с носителем Спонгостан клетки в концентрации $5 \cdot 10^5$ в 1 мл биокомпозита в условиях полной гидратации препарата ФСБ инкубировали при 37 °С. Поскольку препарат не растворяется в ФСБ и содержит частицы разного размера и геометрической формы, для идентификации клеток использовали эффект накопления в жизнеспособных МСК красителя ФДА. Благодаря наличию эфирных групп данный краситель способен проникать через плазматическую мембрану внутрь клеток, где подвергается гидролизу внутриклеточными эстеразами с образованием флуоресцирующего полярного продукта, непроницаемого для мембраны. При возбуждении излучением в области 420–495 нм регистрируется интенсивная флуоресценция в зеленой области спектра продукта гидролиза ФДА, равномерно распределенного в цитоплазме клеток. Контрольные эксперименты показали, что наличие ФДА в среде не влияет на интенсивность флуоресценции частиц порошка Спонгостан, что позволяет избирательно визуализировать МСК в составе биокомпозита. Смесь МСК с носителем разводили в 10 раз ФСБ, содержащим ФДА, и исследовали сначала методом флуоресцентной микроскопии, а затем фазово-контрастной микроскопии при том же фокусном расстоянии. Проведенные исследования показали, что МСК эффективно адгезируют на поверхности гидратированного препарата. Так, уже после инкубации в течение 1 ч регистрируются клетки, адгезировавшие на поверхности частиц порошка Спонгостан (рис. 1).

Опыты по изучению пролиферации МСК в составе биокомпозита показали, что после нанесения МСК на поверхность препарата и 1 суток культивирования клетки мигрируют внутрь носителя, комплексируют с его частицами, приобретая фибробластоподобную форму (рис. 2, *a*). При последующем культивировании в течение 5–9 суток количество клеток значительно возрастает (рис. 2, *b, c*), а к 12-м суткам МСК практически полностью заполняют поверхность носителя (рис. 2, *d*). Эти результаты свидетельствуют о том, что МСК эффективно адгезируют с носителем и активно пролиферируют в комплексе с ним. Полученные данные позволяют рассматривать порошок Спонгостан в качестве подходящего компонента для изготовления биокомпозита на основе МСК для введения в парауретральную область с целью лечения экспериментального недержания мочи.

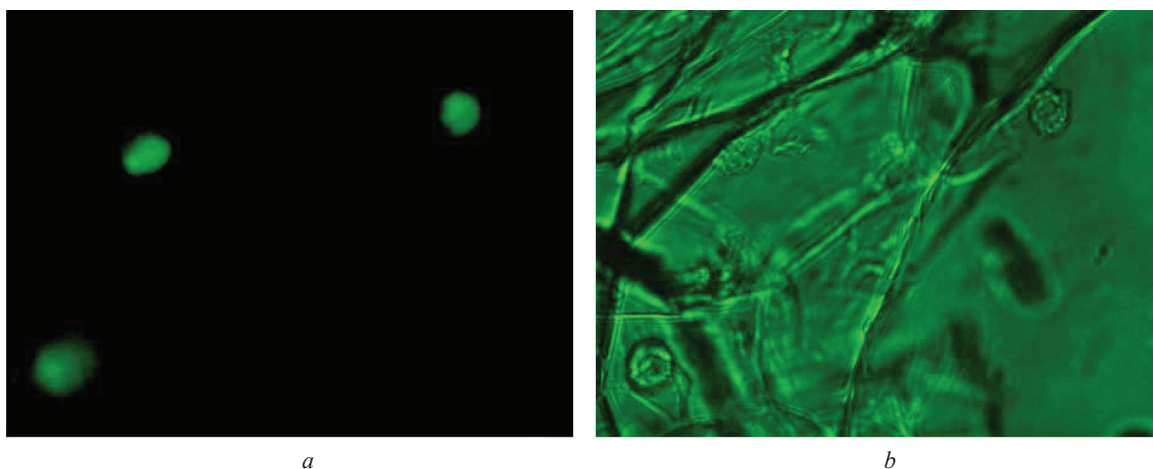


Рис. 1. Микрофотографии МСК после инкубации в течение 1 ч при 37 °С в составе биокомпозита с препаратом Спонгостан: *a* – флуоресцентная микроскопия; *b* – фазово-контрастная микроскопия. Увеличение 400

Fig. 1. Microphotographs of MSC after incubation for 1 h at 37 °С as part of a biocomposite with the Spongostan: *a* – fluorescence microscopy; *b* – phase-contrast microscopy. Magnification 400

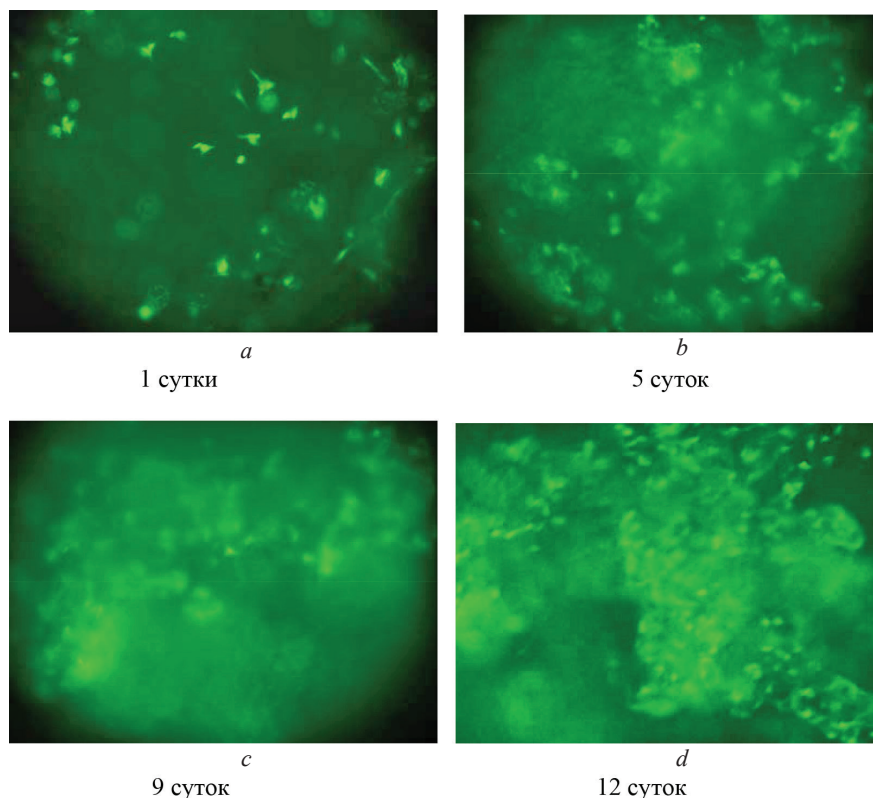


Рис. 2. Микрофотографии МСК после культивирования в составе биокомпозита с препаратом Спонгостан. Флуоресцентная микроскопия. Увеличение 100

Fig. 2. Microphotographs of MSCs after cultivation as part of a biocomposite with the Spongostan. Fluorescence microscopy. Magnification 100

Тестирование биокомпозита для лечения экспериментального НМ было направлено на выяснение следующих вопросов. Во-первых, способен ли биокомпозит выполнять роль объемобразующего средства после введения в парауретральную область и не будет ли он при этом оказывать избыточного давления на уретру. Во-вторых, обладают ли МСК в составе биокомпозита регенерационной активностью для восстановления мочеиспускания у животных с моделированным НМ.

Одним из наиболее объективных параметров, позволяющих адекватно оценить функционирование мочеиспускательной системы, а именно эффективность удержания мочи, является давление в мочевом пузыре при вытекании первой капли из мочеиспускательного канала (LPP, leak point pressure). Данный методический подход широко используется для характеристики мочеиспускания при различных способах моделирования НМ у крыс [8; 9]. При моделированном НМ величина порогового давления в мочевом пузыре животных при вытекании первой капли ниже (в 2–3 раза) по сравнению с интактными, а у экспериментальных животных проявляются внешние признаки НМ [5; 8; 9]. Как видно на рис. 3, *a* деструкция тканей в парауретральной области крыс в результате уретролизиса приводит к снижению порогового давления в мочевом пузыре через 7 суток после операции с $30,8 \pm 2,4$ см водного столба в контроле до $8,9 \pm 0,7$. При этом у животных регистрируются внешние признаки НМ при передвижении. Последующее наблюдение до 50 суток показало частичное восстановление порогового давления в мочевом пузыре. Отсутствие внешнего проявления НМ и приближение значений порогового давления в мочевом пузыре при вытекании первой капли к исходным значениям наблюдается лишь к 70-м суткам после уретролизиса ($24,0 \pm 2,0$ см вод. ст.), свидетельствуя о частичном восстановлении функции удержания мочи мочеиспускательной системой у экспериментальных животных.

LPP, см вод. ст.

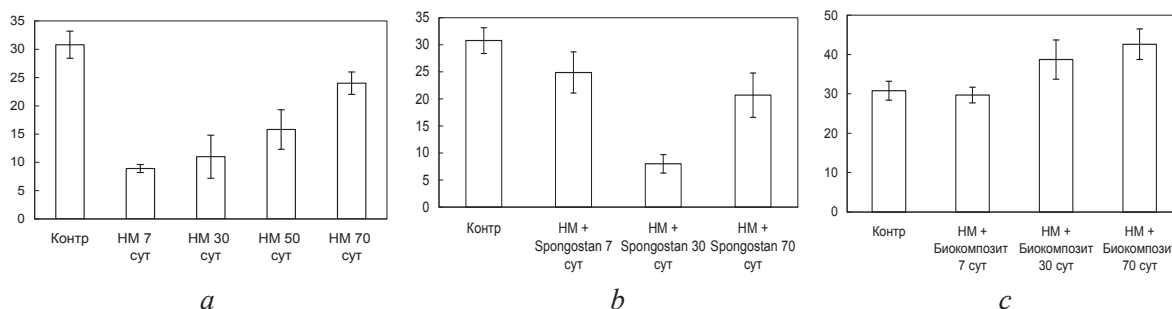


Рис. 3. Давление в мочевом пузыре крыс (LPP) при вытекании первой капли мочи в разные сроки после моделирования у животных НМ без (a) и с введением в парауретральную область носителя Спонгостан (b) или биоккомпозита (c)

Fig. 3. Leak point pressure (LPP) at different times after UI modeling in animals without (a) and with the periurethral injection of a carrier Spongostan (b) or a biocomposite (c)

Введение животным в парауретральную область через 7 суток после моделирования НМ одного (без МСК) гитратированного порошка Спонгостан приводит к увеличению порогового давления в мочевом пузыре при вытекании первой капли. Через 7 суток после введения данный показатель составил $24,9 \pm 3,8$ (рис. 3, b). К этому времени у животных также не проявлялись внешние признаки НМ. Эти данные свидетельствуют о том, что препарат Спонгостан после полной гидратации выполняет роль объемобразующего средства в парауретральной области и при этом не оказывает избыточного давления на уретру. Через 30 суток после введения препарата пороговое давление в мочевом пузыре данной группы животных соответствовало его значениям для экспериментальных животных без введения препарата (рис. 3, b), при этом снова проявлялись внешние признаки НМ. Очевидно, что это связано с деградацией препарата и соответствует срокам, указанным производителем. Последующая динамика изменения цистометрических показателей экспериментальных крыс с введенным носителем соответствовала динамике у животных с только моделированным НМ. Это указывает на то, что препарат Спонгостан, введенный в парауретральную область, не проявляет самостоятельной регенерационной активности, но и не потенцирует последствия уретролизиса.

Также как и в случае одного носителя, использование биоккомпозита (смесь препарата Спонгостан и МСК) при лечении экспериментального НМ у крыс увеличивало пороговое давление в мочевом пузыре (LPP), регистрируемое через 7 суток после введения (рис. 3, c). Очевидно, что в обоих экспериментах эффект в первые 7 суток после введения был обусловлен в основном объемобразующим действием носителя. Однако в случае биоккомпозита в последующие сроки наблюдения значение порогового давления не только не снижалось, а напротив, увеличивалось (рис. 3, c). Через 30 и 70 суток после введения биоккомпозита данный показатель составил $38,7 \pm 5,0$ и $42,6 \pm 3,9$ мм рт. ст. соответственно. При этом у данной группы животных после введения биоккомпозита внешние признаки НМ не проявлялись на протяжении всего периода наблюдения. Иными словами, МСК на фоне действия носителя Спонгостан проявляют самостоятельный эффект на удержание мочи у крыс с моделированным недержанием. Эти данные позволяют предполагать эффективную регенерацию поврежденных тканей в парауретральной области экспериментальных животных, которая обусловлена действием клеточного компонента биоккомпозита.

Применение МСК жировой ткани для восстановления функции удержания мочи исследовалось с использованием различных экспериментальных моделей НМ у крыс. В работах Жао и соавт. [8] и Лина и соавт. [9] установлено частичное восстановление порогового давления в мочевом пузыре (LPP) в течение 2–4 недель после инъекции экспериментальным животным суспензии МСК из жировой ткани, при этом прямое введение суспензии МСК в парауретральную область было более эффективным по сравнению с внутривенным введением клеток [9]. В работах указанных авторов животным вводили однократно $1 \cdot 10^6$ клеток, что существенно превы-

шало дозу клеток, использованную в наших экспериментах ($3,5 \cdot 10^5$ клеток). Таким образом, сравнение литературных данных с полученными нами результатами показывает, что применение МСК жировой ткани при лечении НМ в виде биокомпозита с носителем, обеспечивающим адгезию и пролиферацию МСК, значительно усиливает терапевтический эффект и позволяет снизить дозу вводимых клеток. Кроме того, использование биокомпозита с необходимыми механическими свойствами позволяет получить эффект восстановления удержания мочи практически сразу же после введения благодаря объемобразующему действию носителя, что не наблюдается в случае применения суспензий МСК.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что гемостатический порошок Спонгостан соответствует необходимым требованиям для носителя МСК в составе биокомпозита, предназначенного для введения в парауретральную область при лечении недержания мочи. МСК быстро связываются с поверхностью носителя и активно пролиферируют. Введение МСК в составе данного биокомпозита в парауретральную область быстро и эффективно восстанавливает у экспериментальных животных функцию удержания мочи в мочевом пузыре после моделирования недержания посредством уретролизиса. Спонгостан, гидратированный в соотношении 1 : 24 в фосфатно-солевом буфере, оказывает также объемобразующее действие в области уретры экспериментальных животных.

Благодарности. Работа выполнена в рамках подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии–2020» государственной программы «Научно-технологические технологии и техника» на 2016–2020 годы (мероприятие 32).

Acknowledgements. The work is done within the framework of the subprogram «Innovative Biotechnology–2020» of the State Program «Science-based Technologies and Techniques» for 2016–2020 (project 32).

Список использованных источников

1. Urinary incontinence in US women: A population-based study / J. Melville [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2005. – Vol. 165, N 5. – P. 537–542. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.5.537>
2. Prevalence of urinary incontinence in men: results from the national health and nutrition examination survey / A. D. Markland [et al.] // *J. Urol.* – 2010. – Vol. 184, N 3. – P. 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.05.025>
3. Tran, C. The potential role of stem cells in the treatment of urinary incontinence / C. Tran, M. Damaser // *Ther. Adv. Urol.* – 2015. – Vol. 7, N 1. – P. 22–40. <https://doi.org/10.1177/1756287214553968>
4. Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients / M. Gotoh [et al.] // *Int. J. Urol.* – 2014. – Vol. 21, N 3. – P. 294–300. <https://doi.org/10.1111/iju.12266>
5. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency / L. V. Rodríguez [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2005. – Vol. 288, N 5. – P. 1332–1338. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00760.2004>
6. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential / L. Y. Sun [et al.] // *Cell Prolif.* – 2010. – Vol. 43, N 5. – P. 445–456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00694.x>
7. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture / Y. Yuan [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2014. – Vol. 8, N 3. – P. 210–225. <https://doi.org/10.1002/term.1515>
8. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells with controlled-release nerve growth factor for the treatment of stress urinary incontinence in a rat model / W. Zhao [et al.] // *Eur. Urol.* – 2011. – Vol. 59, N 1. – P. 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.10.038>
9. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells / G. Lin [et al.] // *Cytherapy.* – 2010. – Vol. 12, N 1. – P. 88–95. <https://doi.org/10.3109/14653240903350265>

References

1. Melville J., Katon V., Delaney K., Newton K. Urinary incontinence in US women: A population-based study. *Archives of Internal Medicine*, 2005, vol. 165, no. 5, pp. 537–542. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.5.537>
2. Markland A. D., Goode P. S., Redden D. T., Borrad L. G., Burgio K. L. Prevalence of urinary incontinence in men: results from the national health and nutrition examination survey. *Journal of Urology*, 2010, vol. 184, no. 3, pp. 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.05.025>
3. Tran C., Damaser M. The potential role of stem cells in the treatment of urinary incontinence. *Therapeutic Advances in Urology*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 22–40. <https://doi.org/10.1177/1756287214553968>
4. Gotoh M., Yamamoto T., Kato M., Majima T., Toriyama K., Kamei Y., Matsukawa Y., Hirakawa A., Funahashi Y. Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients. *International Journal of Urology*, 2014, vol. 21, no. 3, pp. 294–300. <https://doi.org/10.1111/iju.12266>

5. Rodríguez L. V., Chen S., Jack G. S., de Almeida F., Lee K. W., Zhang R. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005, vol. 288, no. 5, pp. 1332–1338. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00760.2004>

6. Sun L. Y., Hsieh D. K., Syu W. S., Li Y. S., Chiu H. T., Chiou T. W. Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Proliferation*, 2010, vol. 43, no. 5, pp. 445–456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00694.x>

7. Yuan Y., Kallos M. S., Hunter C., Sen A. Improved expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in microcarrier-based suspension culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, vol. 8, no. 3, pp. 210–225. <https://doi.org/10.1002/term.1515>

8. Zhao W., Zhang C., Jin C., Zhang Z., Kong D., Xu W., Xiu Y. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells with controlled-release nerve growth factor for the treatment of stress urinary incontinence in a rat model. *European Urology*, 2011, vol. 59, no. 1, pp. 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.10.038>

9. Lin G., Wang G., Banie L., Ning H., Shindel A. W., Fandel T. M., Lue T. F., Lin C. S. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 2010, vol. 12, no. 1, pp. 88–95. <https://doi.org/10.3109/14653240903350265>

Информация об авторах

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Молчанова Алла Юрьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla@fizio.bas-net.by.

Василевич Ирина Борисовна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Жаворонок Ирина Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru.

Пехтерева Елена Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Eleivatar88@list.ru.

Антипова Ольга Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mayuha@yandex.ru.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Information about the authors

Pinchuk Sergei Vladimirovich – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Molchanova Alla Yur'evna – Ph. D. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla@fizio.bas-net.by.

Vasilevich Irina Borisovna – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Zhavoronok Irina Petrovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru.

Pehtereva Elena Ivanovna – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Eleivatar88@list.ru.

Antipova Olga Aleksandrovna – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mayuha@yandex.ru.

Volotovski Igor Dmitrievich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com.