

Павлов В.Н.¹, Измайлов А.А.¹, Курбангулов И.Р.¹,
Данилко К.В.¹, Слесаренко Я.С.¹, Максимова С.Ю.¹,
Фарганов А.Р.¹, Виланд В.Ф.², Прантль Л.², Фельтхаус О.²

Использование стромально-васкулярной фракции из аутологичной жировой ткани при стрессовом недержании мочи у мужчин

1 — ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ; 2 — Университетская клиника города Регенсбург, Германия

Pavlov V.N., Izmailov A.A., Kurbangulov I.R., Danilko K.V., Slesarenko I.S., Maksimova S.Y., Farganov A.R., Wieland W.F., Prantl L., Felthaus O.

Use of stromal-vascular fraction from autologous fat tissue under stressed urinary disease in men

Резюме

Цель работы - разработка малоинвазивного метода восстановления функции сфинктера мочевого пузыря с применением стромально-васкулярной фракции (СВФ) аутологичного жира. Материалы и методы. Пациентам с диагнозом стрессовое недержание мочи легкой и средней степеней тяжести выполнено трансуретральное введение аутологичной СВФ в зону наружного сфинктера мочевого пузыря. Выделение СВФ производилось неферментным методом при помощи тумесцентной липоаспирации. Полученный материал был направлен в лабораторию для исследования клеточного состава. Результаты. На основании Pad test и опросников ICIQ-SF, QoL через 4 недели получены первые положительные клинические результаты и улучшение качества жизни. Выводы. В данной работе отмечено, что трансплантация СВФ из аутологичной жировой ткани представляется эффективным и безопасным методом лечения пациентов с недержанием мочи.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция, стрессовое недержание мочи, трансплантация аутологичной жировой ткани, регенеративная медицина

Summary

The aim of the work is to develop a minimally invasive method for restoring the function of the sphincter of the urinary bladder using autologous fat in the stromal-vascular fraction (SVF). Materials and methods. Patients with a diagnosis of stress urinary incontinence of moderate severity were given a transurethral injection of an autologous SVF into the zone of the external sphincter of the bladder. Isolation of SVF was performed by a nonenzymatic method using tumescent lipoaspiration. The resulting material was sent to the laboratory for the study of cellular composition. Results. Based on the Pad test and ICIQ-SF questionnaires, QoL received the first positive clinical results and improved quality of life after 4 weeks. Conclusions. In this work, it is noted that transplantation of SVF from autologous adipose tissue appears to be an effective and safe method of treatment of patients with incontinence.

Key words: stromal-vascular fraction, stress urinary incontinence, autologous adipose tissue transplantation, regenerative medicine

Введение

В последние годы произошло стремительное развитие науки в различных областях медицины с применением стволовых клеток, полученных из аутологичной ткани. Важной особенностью стволовых клеток, определяющей высокий интерес научного мира, является их способность к восстановлению поврежденных в результате болезни или травмы тканей и органов человека. Стволовые клетки представляют собой клетки с низкой степенью

дифференцировки, способные неограниченно делиться и под действием различных стимулов дифференцироваться в специализированные типы клеток [1].

В клинической практике для получения стволовых клеток используют аспираты из костного мозга и жировой ткани. Кроме того, стволовые клетки могут быть выделены из скелетных мышц, амниотической жидкости, пупочного канатика, пульпы зуба. Однако наиболее предпочтительным источником мультипотентных мезенхимальных ство-

ловых клеток (ММСК) с малой инвазивностью процедуры забора, минимальным болевым синдромом и минимальным риском для жизни пациента является подкожная жировая клетчатка. Благодаря малой травматичности процедуры изъятия липоаспирата и отсутствию косметического или функционального дефекта, возможно взятие довольно большого объема ткани, что позволяет в более короткие сроки получить необходимое количество клеток [2]. Полученное количество клеток даёт возможность применять их без последующего культивирования и использовать, так называемую, стромально-васкулярную клеточную фракцию (СВФ), которая представляет собой совокупность всех ядросодержащих клеток [3, 4].

СВФ довольно гетерогенна по составу. После сортировки можно выделить клетки гемопоэтического дифферона: гранулоциты, лимфоциты, моноциты, эндотелиоциты, перициты, а также фибробласты, тучные клетки, преадипоциты. Кроме того, СВФ жировой ткани богата ММСК [5].

Аутотрансплантация СВФ жировой ткани является одним из популярных направлений для научных исследований и используется в качестве новой методики для увеличения объема мягких тканей и замещения дефектов, обусловленных травмой или процессами старения.

На данный момент проведено большое количество доклинических и клинических испытаний, в результате которых была продемонстрирована эффективность применения ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) в терапии различных заболеваний, за счет их способности дифференцироваться в различные линии клеток [6, 7]. Эффективность использования СВФ или ММСК при различных заболеваниях продемонстрирована на множественных моделях животных [8, 9, 10].

Список заболеваний, для лечения которых разрабатывают подходы с применением СВФ, включает болезни, связанные с нарушением функций мышц (миодистрофия Дюшенна), нарушения целостности кости различного генеза, несовершенный остеогенез. Также есть примеры успешного применения СВФ при различных аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, диабет I типа), при нейродегенеративных заболеваниях, таких как множественный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [11]. Кроме того, введение СВФ в качестве нового терапевтического подхода используется в лечении различных урологических патологий, в частности в лечении недержания мочи [12].

Недержание мочи является одной из важных медицинских, социальных, экономических проблем. Современные опросы показывают, что в настоящее время примерно 10% мужчин и 15% женщин страдают от недержания мочи на определенной стадии их жизни [13].

Все существующие методы лечения можно разделить на консервативное лечение, включающее в себя лекарственную терапию, поведенческую терапию, физиотерапию, тренировку мышц тазового дна (упражнения Кегеля) с использованием биологической обратной связи (БОС), и хирургические методы лечения, такие как: имплантация сфинктера мочевого пузыря, периуретральная

инъекционная терапия коллагеном, слинговые операции и др.

Несмотря на наличие большого количества хирургических и консервативных методов лечения данного заболевания проблема выбора тактики лечения до сих пор остается актуальной. Имеются данные об эффективности использования СВФ в лечении недержания мочи. Считается, что ММСК, как компонент СВФ, способны восстанавливать утраченную функцию сфинктера мочевого пузыря [14]. Обогащенная клетками жировая ткань все больше рассматривается в качестве объемо-замещающего агента при поврежденном сфинктере мочевого пузыря и стрессовом недержании мочи. СВФ жировой ткани, богатая ММСК продемонстрировала высокие регенеративные возможности на множестве моделях животных. На моделях свиней и крыс было показано, что инъекция клеток в составе СВФ в сфинктер мочевого пузыря принесла положительные результаты. В доклинических исследованиях были изучены стволовые клетки, полученные из костного мозга, мышечной и жировой тканей с целью регенерации уретры и сфинктера мочевого пузыря [15, 16].

С 2007 года инъекции стволовых клеток стали новым методом терапии недержания мочи. Немногочисленные клинические исследования также демонстрируют положительные эффекты при стрессовом недержании мочи [17, 18].

Цель исследования — разработка малоинвазивного метода восстановления функции сфинктера мочевого пузыря с применением стромально-васкулярной фракции аутологичного жира.

Материалы и методы

Работа проводится в формате инициативного клинического исследования, фаза IIb. С ноября по декабрь 2017 года на базе Клиники Башкирского государственного медицинского университета 4 пациентам с диагнозом стрессовое недержание мочи средней степени тяжести выполнено трансуретральное введение аутологичной СВФ с зону наружного сфинктера мочевого пузыря. Из них 3 пациентам была выполнена радикальная простатэктомия и одному пациенту выполнена трансуретральная резекция простаты. Все проводимые оперативные вмешательства проводились более одного года назад. Диагноз стрессовое недержание мочи выставлялся на основании жалоб пациента, международных опросников по недержанию мочи, рентгенологических исследований (уретрография), КУДИ, уретроскопии. Пациенты получали консервативное лечение в виде массажа, ЛФК, медикаментозных препаратов (М-холиноблокаторы), однако положительный эффект от консервативного лечения не был достигнут. Было принято решение произвести ауто-трансплантацию жировой ткани, обогащенной клетками СВФ. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение данной процедуры.

Выделение СВФ

Выделение СВФ производится неферментным методом. Жировую ткань забирали методом стандартной

шприцевой тумесцентной липосакции. Липоаспираг собирался в шприцы ACP Double-Syringe Arthrex. Общий объем липоасpirата достигал 80-90 мл. Далее производили центрифугирование шприцов с липоасpirатом в течение 4 минут при скорости 2500 оборотов/мин, без остановки. После центрифугирования жировую фракцию извлекали с помощью верхнего шприца ACP. Заготовленный центрифугированный жир медленно переносили в один из 10 мл шприцов через коннектор 2.4 мм. Затем эту порцию жира интенсивно «перегоняли» 30 раз с максимальной скоростью между двумя 10 мл шприцами через коннектор 1,4 мм. Далее вновь переносили данную эмульгированную жировую фракцию в шприцы ACP и производили повторное центрифугирование в течение 4 мин при 2500 оборотах/минуту. После центрифугирования на дне шприцов выявлялся клеточный осадок (СВФ). Кроме того, получали клеточный осадок, который затем направляли в лабораторию с целью исследования клеточного состава.

Изучение клеточного состава

Клеточный состав, полученный из липоасpirата, изучается в отношении его экспрессии поверхностных маркеров и потенциала дифференцировки.

Посредством проточной цитометрии определяется, что клетки, выделенные как из необработанного липоасpirата, так и из концентрированной жировой ткани, экспрессируют мезенхимальные маркеры стволовых клеток CD44, CD73, CD90 (рисунок 1).

Кроме того, для определения наличия стволовых клеток в СВФ используется их способность к остеогенной (рисунок 2), адипогенной (рисунок 3) дифференцировке.

Введение СВФ

Сразу после подготовки клеточного материала производится его введение трансуретрально с помощью цистоскопа и иглы Fr 5 – 35 см в зону наружного сфинктера в трех точках на 12, 5 и 7 часах условного циферблата и в двух точках в область видимого дефекта ткани сфинктера мочевого пузыря. За каждую инъекцию вводится 0,4 мл

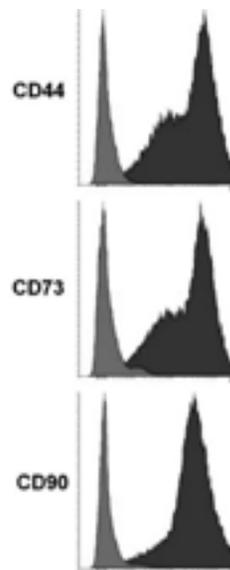


Рисунок 1: Клетки из липоасpirата положительны по мезенхимальным маркерам стволовых клеток CD44, CD73 и CD90. Антитела для изотип-контроля окрашены в красный цвет, антитела, специфичные для CD44, CD73 и CD90, окрашены в синий цвет.

СВФ. На сутки устанавливается уретральный катетер ch 14. Через 1, 3, 6, 12 месяцев после оперативного вмешательства проводится клиническая оценка результатов, используя опросники и жалобы пациентов.

Результаты и обсуждение

Сопоставив данные указанные в таблице 1 до и после операции, определили, что качество жизни у 3 из 4 пациентов значительно улучшилось, в то время как у одного пациента показатели остались неизменными. Нужно учесть, что данному пациенту проводилась трансуретральная резекция простаты.

Заключение

Недержание мочи по-прежнему остается одним из значимых осложнений после радикальной простатэкто-

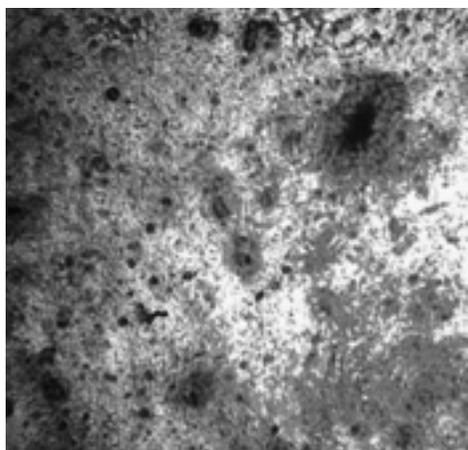


Рисунок 2: Клетки из липоасpirата, дифференцированные в среде остеогенной дифференцировки и окрашенные AlizarinRedS.

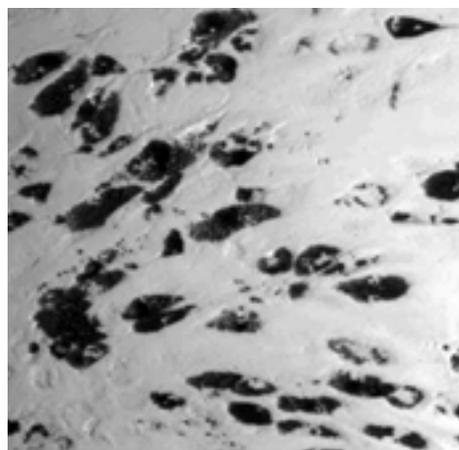


Рисунок 3: Клетки из липоасpirата, дифференцированные в среде адипогенной дифференцировки и окрашенные OilRedO.

Таблица 1. Сравнительные показатели результатов проводимых опросников до и после операции проводимые через 4 недели после оперативного вмешательства.

| Пациент | Pad test, количество прокладок | | ICIQ-SF*, баллы | | QoL**, баллы | |
|-------------|--------------------------------|-------|-----------------|-------|--------------|-------|
| | до | после | до | после | до | после |
| Г., 66 лет | 4-5 | 1 | 11 | 3 | 6 | 2 |
| Л., 62 года | 2-3 | 1 | 8 | 4 | 5 | 2 |
| М., 67 лет | 2 | 0 | 7 | 1 | 5 | 1 |
| Г., 72 года | 2 | 0 | 8 | 1 | 5 | 0 |

мии (РПЭ), которое встречается у 9-16% пациентов [19]. Возросшее количество оперативных вмешательств влечёт за собой увеличение числа пациентов, страдающих от послеоперационного недержания мочи. В публикациях разных авторов частота раннего стрессового недержания после перенесенной РПЭ варьирует от 5 до 60%. Следует отметить, что случаи недержания мочи существенно реже наблюдаются в клиниках, где РПЭ является рутинной практикой. Этиология инконтиненции после РПЭ многогранна. В послеоперационном периоде сочетание указанных факторов приводит к тому, что развивается недержание мочи, обусловленное недостаточностью сфинктерного механизма, гиперактивностью детрузора, снижением комплаентности мочевого пузыря или сочетанием перечисленных состояний. Наиболее часто имеет место стрессовое недержание мочи, проявляющееся подтеканием мочи при увеличении внутрибрюшного давления при кашле и физических нагрузках вследствие недостаточности сфинктерного механизма [20]. Согласно имеющимся данным, СВФ, содержащая ММСК, способствует регенерации мышечной ткани и может рассматриваться в качестве альтернативного способа лечения заболевания [14].

ММСК-ЖТ могут быть имплантированы в поврежденные ткани или органы в качестве источника новых функциональных компонентов, а также могут оказывать сильное противовоспалительное, противогрибковое или иммуномодулирующее действие через паракринные или аутокринные пути (через сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор гранулоцитарного / макрофагального колониестимулирующего фактора, стромальный фактор-1 альфа и фактор роста гепатоцитов) [21,22].

Было показано, что ММСК-ЖТ обладают более сильными противовоспалительными и иммуномодулирующими функциями, чем мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга (ММСК-КМ) [23]. ММСК-КМ уже показали свою эффективность в многочисленных доклинических и клинических исследованиях [24,25], однако их использование связано с некоторыми трудностями при получении клеточного материала, в частности из-за высокой инвазивности процедуры аспирации костного мозга и небольшого количества получаемых клеток [26]. Комплекс данных факторов дал толчок к поиску новых источников ММСК, в частности подкожной жировой клетчатки.

Наиболее часто используемым методом выделения является метод, разработанный Р. А. Zuk с соавторами. Он основан на обработке липоаспирата раствором кол-

лагеназы I типа при температуре 37°C в течение 30 мин с последующим центрифугированием получившейся суспензии. После центрифугирования в супернатанте находятся адипоциты, а в осадке - СВФ с примесью эритроцитов [27]. Осадок очищается с помощью буферного раствора и повторно центрифугируется [28,29]. Однако данный метод имеет некоторые недостатки, в частности длительность процедуры и высокий риск нарушения стерильности процесса, что может приводить к контаминации полученного материала. В нашем исследовании выделение осуществлялось механическим (неферментным) методом. Неферментный метод выделения менее трудозатратный, но достаточно эффективный, кроме того, осуществляется внутри операционной, что подходит для клинических целей.

Аутотрансплантация жировой ткани является перспективным и популярным направлением, поскольку жировая ткань может быть использована для восстановления объема мягких тканей, а также тканей, поврежденных при заболеваниях или травмах и представляет собой основной источник стволовых клеток взрослого организма.

Таким образом, в нашем исследовании продемонстрировано, что трансплантация аутологичной жировой ткани, обогащенной клетками СВФ, представляется эффективным и безопасным методом лечения пациентов с недержанием мочи легкой и средней степени тяжести. Клиническое исследование будет продолжено для получения статистически значимых выборок, а также будет детально охарактеризован субпопуляционный состав СВФ для уточнения механизмов ее терапевтического действия. ■

Павлов Валентин Николаевич, Ректор ФГБОУ ВО БГМУ МЗ РФ, Курбангулов Ильдар Раисович, Доцент кафедры хирургических болезней и новых технологий с курсом ИДПО, Измайлов Адель Альбертович, Профессор кафедры урологии с курсом ИДПО, Данилко Ксения Владимировна, Доцент кафедры биологии, старший научный сотрудник ЦНИЛ, Слесаренко Яна Сергеевна, Младший научный сотрудник ЦНИЛ, Максимова Серафима Юрьевна, Клинический ординатор кафедры урологии с курсом ИДПО, Фарганов Амир Рафисович, Аспирант кафедры урологии с курсом ИДПО Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа, Оливер Фельтхаус,

Научный сотрудник исследовательской лаборатории, Виланд Вольф Фердинанд, Профессор кафедры урологии, Лукас Прантль, Заведующий отделением пластической

и реконструктивной хирургии, Университетская клиника города Регенсбург, Автор, ответственный за переписку — Павлов Валентин Николаевич, pavlov@bashgtmu.ru

Литература:

1. Dominik D., Anna L., Robert C. /Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells. // *J Transl Med.* 2016 May 6;14(1):126.
2. Stoltz J .F., Li Y.P. /Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. // *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 734731.
3. Nie C., Yang D., Xu J. et al. /Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis // *Cell Transplant.* 2011. Vol. 20. P. 205-216.
4. Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. /Adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery // *Stem. Cells Transl. Med.* 2012. Vol. 1. № 3. P. 230-236.
5. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L., Dominici M., Katz A.J. /Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). // *Cytotherapy.* – 2013. – Vol. 15. - № 6. - P. 641-648.
6. Basu J, Genheimer CW, Guthrie KI, Sangha N, Quinlan SF, et al. /Expansion of the human adipose-derived stromal vascular cell fraction yields a population of smooth muscle-like cells with markedly distinct phenotypic and functional properties relative to mesenchymal stem cells. // *Tissue Eng Part C Methods* 17: 843-860.
7. Laliberte M., Blleloch S., Ratanshi I., Safneck J., Buchel E. /Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Differentially Expands Breast Progenitors in Tissue Adjacent to Tumors Compared to Healthy Breast Tissue Sumanta Chatterjee// *Plast Reconstr Surg.* 2015 Oct;136(4):414e-25e.
8. You D., Jang M.J., Lee J., Suh N., Jeong I.G., et al. /Comparative analysis of periprostatic implantation and intracavernosal injection of human adipose tissue-derived stem cells for erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury.// *Prostate.* 2013 Feb 15;73(3):278-86.
9. Bagno L.L., Werneck-de-Castro J.P., Oliveira P.F., Cunha-Abreu M.S., Rocha N.N., /Adipose-derived stromal cell therapy improves cardiac function after coronary occlusion in rats.// *Cell Transplant.* 2012;21(9):1985-96.
10. Brown, N. K., Z. Zhou, J. Zhang, R. Zeng, J. Wu, et al. /Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models.// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:1621–1630.
11. Farini A., Sitzia C., Erratico S., Meregalli M. /Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. // *Stem Cells Int.* – 2014. – Vol. 2014. - P. 306573.
12. Zhao W, Zhang C, Jin C, Zhang Z, et al./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. // *Eur Urol.* 2010, 59: 155-163.
13. Wiafe B., Metcalfe P.D., Adesida A.B. /Stem Cell Therapy: Current Applications and Potential for Urology.// *Curr Urol Rep.* 2015 Nov;16(11).
14. Tokunori Yamamoto, Momokazu G., Ryohei H., Toriyama K. /Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. // *International Journal of Urology* (2010) 17, 75–82
15. Boissier R, Magalon J, Sabatier F, Veran J, Giraudo L, Giusiano S, /Histological and Urodynamic Effects of Autologous Stromal Vascular Fraction Extracted from Fat Tissue with Minimal Ex Vivo Manipulation in a Porcine Model of Intrinsic Sphincter Deficiency. // *J Urol.* 2016 Sep;196(3):934-42. doi: 10.1016/j.juro.2016.04.099. Epub 2016 Jun 2
16. Tran C., Damaser M.S./The potential role of stem cells in the treatment of urinary incontinence.// *Ther Adv Urol.* 2015 Feb;7(1):22-40
17. Strasser H. /Stem-cell urological treatment was not carried out illegally.// *Nature.* 2008 Jun 26;453(7199):1177
18. Kollhoff DM, Cheng EY, Sharma AK/Urologic applications of engineered tissue.// *Regen Med.* 2011 Nov;6(6):757-65
19. Salomon L., Droupy S., Yiou R., Soulié M./ Functional results and treatment of functional dysfunctions after radical prostatectomy.// *Prog Urol.* 2015 Nov;25(15).
20. Huixi Li, Guiting Lin./ Potential application of adipose tissue-derived stem cells for urological disease// *Translational Andrology and Urology, Vol 4, Supplement 1 (August 2015).*
21. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, et al./Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.// *Circulation* 2004, 109: 1292-1298.
22. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW/Adipose-derived cells. // *Cell Transplant,* 2007, 16: 963-970.
23. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, et al./ IFATS collection: in vivo therapeutic

- potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. // Stem Cells, 2008, 26: 2705- 2712.*
24. Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. /Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. // *B iosci. Rep.* 2015; 35(2): e00191.
 25. Bara J.J., Richards R.G., Alini M. et al. /Concise review: *B one marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. //Stem Cells* 2014; 32(7): 1713-23.
 26. Liao H.T., Chen C.T. /Osteogenic potential: *Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. //World J .Stem Cells* 2014; 6(3): 288-95.
 27. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al./ *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.// Tissue Eng .* 2001; 7(2): 211-28.
 28. Zhu M., Heydarkhan-Hagvall S., Hedrick M. et al./ *Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates.//J. Vis. Exp.* 2013; (79): e50585 .
 29. Qureshi A. T., Chen C., Shah F. et al./ *Human adipose-derived stromal stem cell isolation, culture, and osteogenic differentiation// Methods Enzymol .* 2014; 538: 67-88.