

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Горелова Анна Андреевна

**ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ УРЕТРОПЛАСТИКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫМИ  
КОНСТРУКЦИЯМИ**

(экспериментальное исследование)

14.01.17 – «хирургия»

14.01.23 – «урология»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Пётр Казимирович Яблонский,

кандидат медицинских наук

Александр Николаевич Муравьев

Санкт – Петербург, 2020

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>		
		Стр.
Введение		5
Глава 1. Обзор литературы		14
1.1	Патологии уретры, требующие хирургического лечения	14
1.2	Реконструктивные хирургические вмешательства на мочеиспускательном канале: обзор основных методик	16
1.3	Тканевая инженерия в хирургии уретры	20
	1.3.1 Разновидности скаффолдов, применяемых для реконструкции уретры	21
	1.3.2 Типы клеток, применяемых в тканевой инженерии уретры	25
	1.3.3 Применение факторов роста и биоактивных молекул в составе тканеинженерных конструкций	28
	1.3.4 Применение тканеинженерных конструкций для уретропластики	29
Глава 2. Материалы и методы		33
2.1	Общая характеристика материалов и методов исследования	33
2.2	Характеристика лабораторных животных	35
2.3	Первый этап исследования – изучение механических свойств скаффолдов и их биодegradации	36
	2.3.1 Приготовление скаффолдов	36
	2.3.2 Оценка механических характеристик скаффолдов	37

	2.3.3.	Изучение биодegradации скаффолдов	38
2.4		Второй этап исследования – создание и имплантация ТИК на модели острой травмы уретры экспериментальным животным	40
	2.4.1.	Выделение, культивирование и интернализация наночастиц клетками	40
	2.4.2.	Заселение скаффолдов клетками	44
	2.4.3	Протокол хирургического вмешательства	45
	2.4.4	Период наблюдения, эвтаназия и исследуемые данные (морфологические, уретрографии, исследование криосрезов)	47
	2.4.5	Статистический анализ	49
Глава 3. Результаты исследования			50
3.1		Результаты первого этапа исследования – изучения механических свойств скаффолдов и их биодegradации	50
3.2		Результаты второго этапа исследования – создания и имплантации ТИК на модели острой травмы уретры экспериментальным животным	54
	3.2.1	Исследования тканеинженерных конструкций	54
	3.2.2	Оценка длительности операций	59
	3.2.3	Оценка динамики массы тела	59
	3.2.4	Результаты уретрографии	62
	3.2.5	Макроскопическая оценка зоны имплантации	63
	3.2.6	Результаты морфологических и морфометрических исследований	66
		Результаты конфокальной микроскопии криосрезов	78
Заключение			81
Выводы			88

Практические рекомендации	90
Перспективы дальнейшей разработки темы исследования	90
Список сокращений и условных обозначений	91
Список использованной литературы	92

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Ряд патологий мочеиспускательного канала у мужчин требует реконструктивных вмешательств, которые направлены как на улучшение мочеиспускания, так и на повышение общего качества жизни пациента. К наиболее частым патологиям уретры у мужчин, при которых показано хирургическое лечение, относят аномалии развития, такие как гипоспадии, и приобретенные дефекты – стриктуры уретры (Versteegden L.R.M. et al., 2017). Эти заболевания в ряде случаев требуют нестандартных подходов в планировании и технике выполнения операции, в том числе использования различных трансплантатов для замещения или аугментации уретры.

В качестве трансплантируемого материала используют крайнюю плоть полового члена, пенильную кожу, влагалищную оболочку яичка, слизистую оболочку щеки. Необходимо отметить, что применяют только плоские трансплантаты в связи с большим количеством отрицательных результатов при применении тубуляризованных графтов – более 50% (Mangera et al., 2011). Буккальная пластика в настоящее время имеет наилучшие результаты и признана «золотым стандартом» при протяженных стриктурах уретры, обеспечивая до 90% удовлетворительных отдаленных результатов (Barbagli G. et al., 2014; Gallegos M.A., Santucci R.A., 2016). Однако, недостатками этого вида пластики являются осложнения в донорской зоне, составляющие от 16 до 32% (Dublin N., Stewart L.H., 2004), дефицит тканей для пластики, особенно при протяженных, рецидивных стриктурах, и увеличение времени операции в связи с необходимостью получения лоскута или трансплантата (Глыбочко П.В. и др., 2014; Atala A. et al., 2015).

Помимо традиционных лоскутов и трансплантатов в настоящее время разрабатываются альтернативные материалы с использованием тканевой инженерии для заместительной уретропластики, целью которых является

исключение перечисленных выше недостатков классических хирургических вмешательств (Versteegden L.R.M. et al., 2017).

Для реконструкции мочеиспускательного канала применяют децеллюляризованные тканевые матрицы, а также *de novo* синтезированные материалы естественного (например, коллаген) или синтетического (например, поли-L,L,-лактид) происхождения (Mangera A., Chapple C.R., 2013). В настоящее время изучается возможность использования в качестве трансплантата различных скаффолдов, заселенных аутологичными или аллогенными клетками, а также бесклеточных скаффолдов (Shafiee A., Atala A., 2017). В состав тканеинженерной конструкции (ТИК) включают различные типы клеток: кератиноциты, уротелиальные клетки (Ур), гладкомышечные клетки мочевого пузыря, фибробласты, мезенхимные стволовые клетки (МСК) (Atala A. et al., 2017). При этом оптимальная биосовместимая ТИК для уретропластики имеет трехмерную структуру с соответствующими прочностными характеристиками, обладает эластичностью, а также непроницаема для мочи (Vaegler M. et al., 2015). Создание ТИК, отвечающей всем требованиям является очень сложной и труднореализуемой задачей, решением которой занято большое число ученых. В большинстве доклинических и клинических исследований, посвященных тканеинженерной реконструкции уретры, наиболее широко представлено использование бесклеточных скаффолдов (Versteegden L.R.M. et al., 2017). Однако, многие авторы отмечают существенное преимущество использования для уретропластики ТИК, заселенных клетками, в сравнении с бесклеточными ТИК (Bharadwaj S. et al., 2013; Liu Y. et al., 2017). В единичных работах применялись синтетические скаффолды, заселенные аутологичным уротелием (Fu W.J. et al., 2009; Zhang K. et al., 2015). В связи с тем, что на данный момент слизистая ротовой полости является оптимальным материалом для уретропластики, включение клеток буккального эпителия (КБЭ) в состав ТИК является обоснованным. Кроме того, применение ТИК с КБЭ показало свою эффективность в ряде работ (Bhargava S. et al., 2008; Mikami H. et al., 2012; Ram-Liebig G. et al., 2017). На сегодняшний день самым крупным является

многоцентровое, проспективное исследование, включившее 98 пациентов. В данной работе применялся тканеинженерный аутологичный буккальный графт. Положительные результаты уретропластики оценивались через год и различались от 0% до 85,7% (среднее значение 67,3%) (Ram-Liebig G. et al., 2017). Такие противоречивые данные указывают на необходимость дальнейших исследований в этой области (Versteegden L. R. M. et al., 2017; Chapple C., 2019).

Собственный опыт применения МСК-содержащих тканеинженерных конструкций для замещения дефектов мочевого пузыря показывает способность МСК к формированию структур, сходных с уротелием (Муравьев А.Н. и др., 2015; Yudiniceva N.M. et al., 2016), что позволяет расширить область их применения.

Наше исследование посвящено разработке новых тканеинженерных конструкций для пластики уретры с использованием клеток различного тканевого происхождения и биополимеров, что является актуальной проблемой современной медицины.

### **Степень разработанности темы исследования**

Проведен патентный поиск по базам Федерального Института Промышленной собственности (ФИПС), Google Patent, EPATIS, Patentscope. Глубина поиска – 20 лет. Поиск проведен в сентябре 2017 года. Выявлено 11 объектов интеллектуальной собственности, относящихся к способам тканеинженерной реконструкции или репарации тканей уретры, из них к биомедицинским клеточным продуктам можно отнести 6. Не выявлено изобретений, формула которых была бы схожа с разрабатываемыми в рамках диссертационного исследования ТИК.

К наиболее близким можно отнести изобретения, в которых для реконструкции тканей и органов предлагается применять клетки и белки или структуры, полученные из внеклеточного матрикса (патент WO 2014/039429, патентообладатель АНТРОДЖЕНЕЗИС КОРПОРЕЙШН, США);

децеллюляризованных матриц (патент RU 2010 125 983 А, патентообладатель Огенодженесис, Инк. (США) и DE2007000368 патентообладатель – UROTEC GMBH); синтетические матрицы (патент 7811332 – действует на территории США, патентообладатель – Children's Medical Center Corporation, США). Большая часть из выявленных объектов интеллектуальной собственности не действует на территории России. Среди отечественных изобретений наиболее близки к тематике проекта следующие: «Способ создания клеточноинженерной и тканеинженерной конструкции» (RU 2016 140 178А, патентообладатель – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России), в котором описан вариант композиции сетки-матрикса и живых соматических или стволовых клеток. Коллектив авторов (Файзулин А.К. и др., 2015) предлагают способ пластики уретры у детей с гипоспадией с использованием аутологичных кератиноцитов на биodeградируемом матриксе.

Принципиальным отличием разработанного нами продукта от указанных изобретений являются использование многослойного биodeградируемого матрикса определенного состава и свойств, который предотвращает пагубное воздействие внутренней среды уретры на клетки имплантата и обладает высокой биосовместимостью. Другим отличием является использование мультипотентных мезенхимных клеток или клеток букального эпителия в качестве клеточного компонента.

**Цель работы:** Экспериментальное обоснование возможности применения тканеинженерных конструкций для замещения дефектов уретры.

#### **Задачи исследования**

1. Исследовать физико-химические свойства и биологическую совместимость комбинированных скаффолдов с клеточными культурами *in vitro*;
2. Изучить биodeградацию разработанных скаффолдов и созданных на их основе тканеинженерных конструкций после имплантации модельным животным;

3. Оценить морфофункциональные особенности мочеиспускательного канала в зоне хирургического вмешательства на различных сроках после имплантации сгенерированных тканеинженерных конструкций;
4. Провести сравнительную оценку результатов заместительной уретропластики с применением тканеинженерных конструкций и буккального графта в эксперименте.

### **Научная новизна**

Впервые изучены механические свойства и биodeградация скаффолда на основе поли-L-лактид-капролактона (ПЛК) (70/30) и поли-L-лактид-гликолида (ПЛГ) (85/15), поли- (D, L)-лактида (ПЛ) и поликапролактона (ПК).

Созданы тканеинженерные конструкции на основе: поли-L-лактид-капролактона (70/30) и поли-L-лактид-гликолида (85/15), содержащие клетки буккального эпителия, поли- (D, L)-лактида (ПЛ) и поликапролактона (ПК), содержащие мезенхимные стволовые клетки.

На экспериментальной модели острой травмы уретры обоснована возможность применения данных тканеинженерных конструкций для замещения дефектов уретры.

Доказана возможность применения изученных нами тканеинженерных конструкций в качестве альтернативы буккальному графту при уретропластике.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате проведенного экспериментального исследования разработаны тканеинженерные конструкции, содержащие мезенхимные стволовые или буккальные клетки, которую можно применять в качестве материала для реконструктивно-восстановительных операций на мочеиспускательном канале. Данный клеточный продукт является стерильным, биосовместимым и биodeградируемым, а также обладает рядом преимуществ по сравнению с буккальным графтом, наиболее широко применяемом на сегодняшний день в

реконструктивной хирургии уретры. К преимуществам разработанного продукта мы относим меньшее фиброзирование окружающей ткани и уменьшение объема и травматичности хирургического вмешательства.

### **Методология и методы исследования**

При подготовке и реализации диссертационной работы использованы лабораторные, инструментальные, научные аналитические и статистические методы исследования. По дизайну исследование является экспериментальным, проспективным, базируется на изучении результатов хирургического вмешательства на 41 лабораторном животном.

Исследование одобрено решением независимого этического комитета при федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России) (протокол № 48 от 28.06.2018 г., выписка № 48.2).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Сcafфолды из поли- (D, L)-лактида и поликапролактона, а так же из поли-L-лактид-капролактона и поли-L-лактид-гликолида обладают водонепроницаемостью за счет гидрофобных свойств, достаточной прочностью и растяжимостью, что обеспечивает возможность эффективной накладки первичного хирургического шва без прорезывания лигатур толщиной 0,7 Ph. Eur. (6-0). Материал биосовместим, обеспечивает высокую выживаемость клеток в контакте с ним.

2. Время биодegradации скаффолдов из поли- (D, L)-лактида/поликапролактона, а также поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида и тканеинженерных конструкций, сформированных на их основе, достаточно для эпителизации и структурно-функционального восстановления уретры.

3. Применяемые тканеинженерные конструкции обладают гистосовместимостью, обеспечивают поддержание просвета уретры, создающего условия для адекватной уродинамики, сохраняют жизнеспособность в течение 3 месяцев после трансплантации в дефект уретры.

4. Использование разработанных тканеинженерных конструкций в условиях моделированной острой травмы уретры имеет преимущества по сравнению с имплантацией буккального графта в виде меньшего фиброзирования тканей в области хирургического интереса, а также уменьшения травматичности и длительности хирургического вмешательства.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Достоверность проведённого исследования определяется достаточным числом наблюдений (41 лабораторных животных) и применением адекватных методов статистического анализа.

Результаты исследования внедрены в учебную деятельность ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России: основные положения диссертационной работы используются в образовательных программах высшего профессионального образования – программах подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по дисциплине 14.01.17 «Хирургия» и ординатуре по специальности 31.08.67 «Хирургия»; в дополнительных образовательных программах – повышения квалификации и профессиональной переподготовки врачей-урологов, что позволяет повысить компетенции слушателей и сформировать самые современные знания о разработанных тканеинженерных конструкциях и возможностях их применения в качестве имплантируемого материала для заместительной уретропластики в эксперименте.

Результаты исследования внедрены в учебную деятельность кафедры хирургических болезней Частного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский медико-социальный институт» по учебной

дисциплине «Урология» направления подготовки 31.05.01 – «Лечебное дело», квалификация «врач-лечебник».

Основные положения диссертационного исследования используются в лекционных курсах для аспирантов федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН) по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки» и программам дисциплин «Введение в биологию стволовых клеток» и «Клеточная биология, цитология, гистология».

Результаты работы доложены и обсуждены: на II Российско-китайской урологической конференции (30 марта – 1 апреля 2018 года, Харбин, КНР), VI Российском конгрессе по эндоурологии и новым технологиям (27-29 сентября 2018 года, Санкт-Петербург), 11th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine (16-21 октября 2018 года, Рим, Италия), XVIII Конгрессе Российского Общества Урологов (8-10 ноября 2018 года, Екатеринбург), VII Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров с международным участием (15-17 ноября 2018, Санкт-Петербург), международном Евразийском конгрессе урологов (24-25 мая 2019 года, Уфа), VII всероссийской конференции с международным участием (10-11 июня 2019 года, Санкт-Петербург), XIII и XIV междисциплинарной научно-практической конференции «Актуальные вопросы урологии и гинекологии» (3 декабря 2018 года и 4 декабря 2019 года, Санкт-Петербург).

По теме диссертационного исследования опубликовано 14 печатных работ, из них 2 в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук по специальностям 14.01.17 – хирургия и 14.01.23 – урология, 1 – в зарубежном журнале, входящем в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus.

### **Личный вклад автора в исследование**

Автор лично принимала участие в поиске и анализе литературы, определении цели и задач работы, разработке ее дизайна, во всех этапах выполнения диссертационной работы: обследовании и ведении лабораторных животных, включая участие в исследованиях *in vitro* и в хирургических вмешательствах у всех животных, вошедших в исследование, наборе и обработке данных, а также их интерпретации.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы исследования и списка литературы (146 источника), включающих 31 отечественных и 115 зарубежных публикаций. Работа иллюстрирована 3 таблицами и 28 рисунками.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Патологии уретры, требующие хирургического лечения

Ряд патологий мочеиспускательного канала у мужчин требует реконструктивных вмешательств, которые направлены как на улучшение мочеиспускания, так и на повышение общего качества жизни пациента. Самыми частыми нозологиями являются стриктуры уретры, травмы мочеиспускательного канала, а также аномалии развития, такие как гипоспадия уретры (Rothberg M.B., Atala A., 2018). Гипоспадии встречаются с частотой 1 на 300 новорожденных мальчиков, а их хирургическое лечение подразумевает различные варианты пластик уретры, проводящихся в детском возрасте (Gallentine M.L. et al., 2001; Fossum M., Nordenskjöld A., 2010). Хирургическое лечение гипоспадий остается непростой задачей, особенно при тяжелых формах, когда нередки послеоперационные осложнения (Snodgrass W., Bush N., 2016).

Стриктура уретры – это нефизиологическое сужение её переднего отдела, окруженного спонгиозным телом и сопровождающееся спонгиофиброзом различной степени выраженности (Latini J. M. et al., 2014). Частота стриктур уретры среди мужского населения составляет 1 случай на 2000 (Andrich D.E., Mundy A.R. 2008), распространенность стриктур уретры, по данным R. A. Santucci и соавторов (2007) составляет 229-627 случаев на 100 000 населения, при этом рост заболеваемости отмечается после 55 лет. Однако, истинная частота данного заболевания не известна (Lazzeri M. et al., 2016). В целом, различные патологии мочеиспускательного канала могут привести к нарушению целостности его слизистой, экстравазации мочи с последующим воспалением и образованием стриктуры (Abbas T. O. et al., 2019).

К наиболее частым причинам, приводящим к формированию стриктур уретры, относят ятрогенные (38,6%) и идиопатические (35,8%), тогда как инфекционный генез встречается значительно реже (Palminteri E. et al., 2013). Причина, по которой ятрогенные повреждения встречаются в наше время все

чаще, связана с увеличением количества трансуретральных диагностических манипуляций и хирургических вмешательств (Lumen N. et al., 2009; Alhajeri F. et al., 2020). Кроме того, фактором риска формирования стриктуры является и длительное стояние уретрального катетера. По данным N.F. Davis и соавторов (2016), частота повреждения уретры как следствие катетеризации составила 6,7/1000 случаев, при этом в 11% возникла стриктура.

Все чаще урологи в развитых странах сталкиваются и с осложнениями хирургического лечения гипоспадий, что связано с ростом оперативных вмешательств по поводу данной патологии (Lazzeri M. et al., 2016). Кроме того, можно отдельно выделить постлучевые стриктуры, а также стриктуры, вызванные воздействием агрессивных химических веществ (Котов С.В., 2018).

К формированию стриктуры уретры может приводить такое заболевание, как лихен склероз (ЛС). Данное заболевание возникает у мужчин репродуктивного возраста и поражает, как правило, сначала кожу полового члена, затем меатус и далее (в 20% случаев) – уретру, что впоследствии приводит к формированию стриктуры (Chung A. S. J., Suarez O. A., 2019).

Отдельно выделяют посттравматические стриктуры, которые возникают как следствие травм промежности, мошонки и полового члена. При переломе костей таза, как правило, травмируется мембранозный отдел мочеиспускательного канала с возможным формированием distractionного дефекта (Котов С.В., 2018).

Стриктуры инфекционного генеза встречаются в развитых странах достаточно редко, что связано в первую очередь с активной работой кампаний, направленных на профилактику инфекций, передающихся половым путем (ИППП) и своевременным и адекватным лечением уретритов (Lazzeri M. et al., 2016).

К основным клиническим проявлениям стриктуры уретры относят симптомы нижних мочевых путей (Коган М. И., 2010). Наиболее часто встречаются такие

симптомы, как вялая струя мочи, дизурия и чувство неполного опорожнения мочевого пузыря, а также острая задержка мочеиспускания (Bayne D.V. et al., 2017).

Традиционно для определения ширины и протяженности стриктуры выполняют ретроградную уретрографию в сочетании с микционной цистоуретрографией (Angermeier K.W. et al., 2014). Данный метод позволяет определить приблизительное местоположение стриктуры и степень сужения, свищевые и ложные ходы, камни, однако не всегда дает информацию о протяженности и глубине спонгиоза (Mangera A. et al., 2016). Чувствительность ретроградной уретрографии колеблется от 75% до 100%, а специфичность от 72 до 97 % в сравнении с данными уретроцистоскопии и хирургического вмешательства (Angermeier K.W., et al., 2014). Также высокоинформативным методом диагностики, позволяющим с точностью установить диагноз стриктура уретры, является уретроцистоскопия. Основным ограничением данного метода при значительном сужении является невозможность прохождения уретроскопа через стриктуру (Maciejewski S., Rourke K., 2015). К дополнительным методам обследования относят уретросонографию, компьютерную и магнитно-резонансную томографии (КТ и МРТ), что в отдельных случаях обеспечивает выбор оптимального лечения (Angermeier K. W. et al., 2014).

## **1.2. Реконструктивные хирургические вмешательства на мочеиспускательном канале: обзор основных методик**

Еще античными врачами Римской империи осуществлялись попытки восстановления проходимости уретры с использованием трансуретрального доступа, о чем свидетельствуют данные раскопок города Помпеи, где были обнаружены бронзовые бужи (Русаков В.И., 1991). Длительное время бужирование являлось основной методикой лечения стриктур уретры, и только с конца XIX и начала XX веков началось активное развитие уретральной хирургии (Нестеров С.Н. и др., 2016).

Основным методом лечения патологий мочеиспускательного канала является хирургический, в том числе в ряде случаев требующий нестандартных подходов в планировании и технике выполнения операции (Комяков Б.К., 2018). Основным вариантом лечения непротяженных стриктур уретры является резекция пораженного участка и анастомоз конец в конец, тогда как при протяженных стриктурах выполняется уретропластика с применением аутотрансплантатов (Levy M. E., Elliott S. P., 2017). Существует множество вариантов заместительных и аугментационных уретропластик, выбор которых зависит от локализации патологического процесса, этиологии и протяженности поражения. В качестве имплантируемого материала используют собственные ткани: кожные лоскуты из крайней плоти, кожи полового члена, мошонки, промежности, лоскуты влагалищной оболочки яичка, трансплантаты из слизистой щеки, слизистой мочевого пузыря (Cheng L. et al., 2018).

В 1894 году российский хирург К.М. Сапежко в журнале «Хирургическая летопись» опубликовал статью о впервые выполненной уретропластике с использованием слизистой полости рта. Долгое время данная методика не применялась, только в 1992 году была опубликована статья R.A. Bürger и соавторов (1992), посвященная использованию буккального графта в качестве заместительного материала для уретропластики. Данная публикация дала толчок для развития нового направления в хирургии уретры. В настоящее время буккальная пластика признана «золотым стандартом» при протяженных стриктурах уретры, обеспечивая 80-90% удовлетворительных отдаленных результатов (Gallegos M.A., Santucci R.A., 2016). Преимущество использования слизистой щеки связано с тем, что слизистая ротовой полости в отличие от кожи адаптирована к влажной среде, не имеет волосяных фолликулов и может быть использована при лихен склерозе. Другие же виды слизистых, например, мочевого пузыря или толстой кишки, широко не применяются в связи со сложностью и инвазивностью забора материала (Chapple C., 2019).

В зависимости от позиционирования графта слизистой ротовой полости можно выделить следующие методики:

- Ventral onlay – при этой методике производят разрез по вентральной поверхности спонгиозного тела и слизистой уретры, графт фиксируют к краям разреза, а вторым слоем ушивают спонгиозное тело. Данная операция показана при коротких стриктурах бульбозного отдела уретры (Gallegos M.A., Santucci R.A., 2016). К преимуществам методики ventral относят лучшую визуализацию зоны хирургического интереса и наиболее простой доступ к проксимальной части мембранозного отдела уретры, а также возможность выполнения вентральной спонгиопластики (Wessells H., 2016).
- Методика dorsal onlay – в ходе операции, которую впервые описал G. Barbagli в 1996 году, циркулярно выделяется уретра со спонгиозным телом, производится разрез по дорсальной поверхности, а слизистая щеки фиксируется к белочной оболочке кавернозных тел и к краям уретры (Barbagli G. et al., 1996). Основными показаниями к этой методике являются протяженные пенильные стриктуры и дистально расположенные стриктуры бульбозного отдела (Gallegos M.A., Santucci R.A., 2016). Кроме того, данную методику предпочтительно применять при узкой (менее 1см) уретральной площадке (Spilotros M. et al., 2019).
- S Kulkarni же предложил модифицировать операцию: мобилизовать уретру по одной полуокружности и рассекать ее дорзолатерально (Kulkarni S. et al., 2009). Преимуществом этой методики является меньшая мобилизация уретры, соответственно сохранение кровоснабжения в данной зоне (Spilotros M. et al., 2019).
- Dorsal inlay – впервые данную методику описал H.S. Asopa в 2001 году, при которой разрез производят по вентральной поверхности, вскрывая просвет уретры, затем по дорсальной поверхности рассекают слизистую уретры и фиксируют к краям слизистой графт. Затем ушивают вентральный дефект (Asopa H.S. et al., 2001). Операция выполняется как правило при пенильных

стриктурах. При данной методике не требуется отделять спонгиозное тело от кавернозных тел, что является неоспоримым преимуществом в связи с сохранением кровоснабжения данной области (Marshall S.D. et al., 2015; Котов С.В., 2018).

Выбор метода зависит от этиологии и локализации поражения, ширины уретральной площадки и предпочтений хирурга (Spilotros M. et al., 2019).

Кроме того, существуют комбинации дорзальных и вентральных методик при протяженных стриктурах и сужениях, близких к облитерации (Joshi P. et al., 2016). При пануретральных стриктурах S. Kulkarni предложил операцию, при которой половой член инвагинируют в промежностный доступ, выделяют уретру со спонгиозным телом с левой стороны, дорзолатерально рассекают уретру и выполняют буккальную пластику (Kulkarni S. et al., 2009).

Двухэтапные операции применяются при тяжелых формах лихен склероза, полной облитерации уретры, выраженном спонгиофиброзе и после неудачных операций по поводу гипоспадии (Gallegos M.A., Santucci R.A., 2016). Первым этапом выполняется иссечение рубцовой ткани и формирование уретральной площадки, вторым же этапом, проводящимся не ранее чем через 6 месяцев, является тубуляризация уретры (Котов С.В., 2018).

После любых хирургических вмешательств по поводу стриктуры уретры требуется длительное наблюдение за пациентом на предмет рецидива заболевания. Не существует единой схемы обследования данной группы пациентов, применяются различные опросники, урофлоуметрия, а также ретроградная уретрография и уретроскопия (Wayne D.V. et al., 2017).

Несмотря на множество преимуществ, применение буккального графта сопряжено и с рядом проблем, таких как недостаточный размер трансплантата, увеличение объема хирургического вмешательства и осложнения в донорской зоне, в том числе нарушение чувствительности и саливации, болевой синдром (Dublin N., Stewart L. H., 2004). Помимо традиционных лоскутов и графтов в

настоящее время разрабатываются альтернативные материалы с использованием тканевой инженерии для уретропластики, целью которых является исключение перечисленных выше недостатков классических хирургических вмешательств (Versteegden L.R.M. et al., 2017).

### **1.3. Тканевая инженерия в хирургии уретры**

Тканевая инженерия является относительно новым междисциплинарным направлением в медицине, которое использует живые клетки, биосовместимые материалы, биохимические (например, фактор роста) и физические факторы (циклические механические нагрузки), их сочетания для создания тканеподобных структур (Berthiaume F. et al., 2017). Термин «тканевая инженерия» был предложен в 1987 г. (Meyer U., 2009). Для реконструкции уретры применяют непосредственно скаффолды, скаффолды в сочетании с факторами роста или биологически-активными молекулами и скаффолды с эпителиальными, мышечными или стволовыми клетками (Mangir N. et al., 2019; Orabi H., Martins F.E., 2020).

За последние 30 лет предложено множество различных материалов для заместительной уретропластики. За это время сформировались основные требования, которым должен отвечать данный продукт: материал должен быть биосовместимым, обеспечивать высокую выживаемость клеток в контакте с ним, обладать пористостью, которая необходима для построения трехмерной структуры, адекватным временем биodeградации, не быть токсичным, иметь хорошую гистосовместимость и не активировать фиброз подлежащих тканей (Орлова Н.В. и др., 2016; Агапова О.И., 2017; Васютин И.А. и др., 2017). Разрабатываемая конструкция должна обеспечивать поддержание необходимого просвета уретры в течение длительного времени, чтобы создать условия для адекватной уродинамики; обладать физическими характеристиками (эластичность, растяжимость), позволяющими сохранять функцию не только отведения мочи, но и копулятивную, а также иметь прочностные характеристики, обеспечивающие возможность эффективной накладке первичного

хирургического шва без прорезывания лигатур, не активировать иммунные реакции против трансплантата (Гвасалия Б.Р. и др., 2011; Муравьев А.Н. и др., 2015; Ribeiro-Filho L.A., Sievert K.D., 2015). Синхронизация между процессами биодegradации скаффолда и увеличением клеточного компонента конструкции является важным фактором успеха имплантации (Abbas T. O. et al., 2019).

В качестве трансплантируемого материала применяют децеллюляризованные тканевые матрицы, а также *de novo* синтезированные материалы естественного или синтетического происхождения. (Mangera A., Chapple C.R., 2013; Yudintceva N.M. et al., 2016; Shafiee A., Atala A., 2017).

### **1.3.1. Разновидности скаффолдов, применяемых для реконструкции уретры**

В основе скаффолдов лежат различные материалы естественного или синтетического происхождения, а также децеллюляризованные ткани (Orabi H., Martins F.E., 2020). Природные биополимеры имеют преимущество перед синтетическими в связи с их отличной биосовместимостью (Glowacki J., Mizuno S., 2008). К природным биополимерам относят:

- Фиброин шелка – материал, получаемый из коконов шелкопряда *Bombyx mori* и родственных видов (Агапова О.И., 2017; Rashidbenam Z. et al., 2019). Фиброин шелка состоит на 90% из глицина, аланина и серина, данный материал обладает отличной биосовместимостью, низкими воспалительными свойствами, а также полностью деградирует под действием протеолитических ферментов. За счет пластических свойств этого материала возможно формирование различных конфигураций (Xie M. et al., 2013; Sack B.S. et al., 2016). Одним из современных методов получения скаффолдов из фиброина шелка является метод электроспиннинга, позволяющий добиться высокого отношения поверхности к объему, значительной пористости и хороших физико-механических свойств (Соколова А.И. и др., 2016).

- Спидроин – это каркасный шелк паутины паука *Nephila clavipes*, обладающий высокой биосовместимостью, прочностью и способностью к биодegradации. Существуют рекомбинантные аналоги спидроина, отличающиеся меньшей прочностью (Агапова О.И., 2017; Wang F. et al., 2014). Данный скаффолд обладает хорошими адгезивными свойствами, что было изучено в доклиническом исследовании по реконструкции мочевого пузыря (Steins A. et al., 2015).
- Коллаген – наиболее распространенный соединительнотканый белок млекопитающих (Валеева Н.Ш., Хасанова Г.Б., 2013). Материал является нетоксичным и обладает низкими антигенными свойствами, наиболее часто применяется коллаген I типа. Материал может быть в форме гидрогеля и в виде волокон с решетчатой организацией, при этом возможно изменение пористости материала (Glowacki J., Mizuno S., 2008). Кроме того, данный биодegradуемый материал легкодоступен и неиммуногенен (Isobe Y. et al., 2012). При введении в организм коллаген стимулирует репаративные процессы и обладает гемостатическими свойствами (Агапова О.И., 2017).
- Бактериальная целлюлоза синтезируется как правило, из *Acetobacter xylinum*, по химическому составу является полисахаридом (Митрофанов Р.Ю. и др., 2010). Целлюлоза обладает хорошей механической прочностью и биосовместимостью, высокой водоудерживающей способностью, однако данный материал не является биодegradуемым. Кроме того, у целлюлозы отсутствует внутренняя трехмерная пористая структура; для создания пор применяют биоразлагаемый желатин, что усиливает клеточную адгезию, пролиферацию и пенетрацию, а также процесс ревазуляризации (Huang J.W. et al., 2015).

К синтетическим полимерам относятся вещества, перечисленные ниже.

- Полигликолевая кислота (ПГА) – линейный алифатический полиэфир, широко применяется в качестве рассасываемого шовного материала.

Основными положительными свойствами этого полимера являются биосовместимость, термопластичность, легкость формирования биоконструкций с высокой пористостью (Gunatillake P.A., Adhikari R., 2003; Агапова О.И., 2017). Электроспиннинг является оптимальным методом получения скаффолдов из ПГА (Boland E.D. et al., 2001).

- Полилактид (ПЛА) – алифатический полиэфир, мономером которого является молочная кислота (Агапова О.И., 2017). Как и ПГА, этот полимер термопластичный, биосовместимый, биodeградируемый, может являться исходным материалом для 3D-печати (Guo S.Z. et al., 2014). В качестве тканеинженерной конструкции применяют L-изомер полимолочной кислоты, отвечающий необходимым требованиям для скаффолдов. Структура скаффолда, состоящего из данного изомера, зависит от метода синтеза, для реконструкции уретры создают пористый материал (La Carrubba V. et al., 2008).
- Политетрафторэтилен (ПТФЭ) – ароматический полиэфир, известный под торговыми названиями Gore-Tex, Teflon. Широко применим как материал для сосудистых протезов (Агапова О.И., 2017; Sabanegh Jr E.S. et al., 1996). Материал относят к небиodeградируемым – после 8 лет имплантации собакам, кроликам и человеку прочность сетки из ПТФЭ снижалась наполовину и изменений молекулярной массы практически не было (Розанова И.Б., 1999). В связи с этим, хотя материал биосовместим и механически прочен, ПТФЭ вызывал формирование эрозий, фистул и камнеобразование (Chen F. et al., 2000).

В качестве материала для заместительной уретропластики в экспериментальных исследованиях применялись и другие варианты с положительными результатами: полилактиновые сетчатые трубки, покрытые полигидроксимасляной кислотой (Olsen L. et al., 1992), бензиловый эфир гиалуроновой кислоты (Italiano G. et al., 1997), однако дальнейшего

распространения они не получили. В ряде исследований зарекомендовали себя сополимеры, такие как полилактид-ко-гликолид (ПЛГА) (Selim M. et al., 2011), сополи (L- лактид/ε-капролактон) в виде пленки или сетчатой трубки (Нащекина Ю.А., и др., 2018; Kanatani I. et al., 2007).

Во многих исследованиях применяются аллогенный или ксеногенный экстрацеллюлярные матриксы (децеллюляризованный, биосовместимый и биodeградируемый биоматериал) (Старо P.M. et al., 2011). Наиболее часто экстрацеллюлярный матрикс получают из свиных органов с помощью механической, химической и ферментативной обработок, чтобы полученный материал был наименее иммуногенен, но сохранил бы основные структурные свойства (Davis N. F. et al., 2018). Экстрацеллюлярный матрикс является продуктом секреции клеток определенной ткани, на его структуру влияют механические и биохимические факторы, а также непосредственно клетки. В состав матрикса входят функциональные и структурные белки (коллаген, фибронектин, ламинин), глюкозаминогликаны, гликопротеины и малые молекулы, формирующие специфичную для каждой ткани трехмерную структуру (Atala A., 2002; Badylak S.F., 2004). Кроме того, экстрацеллюлярные матриксы могут содержать эндогенные факторы роста, которые остаются в процессе приготовления матрикса (Hodde J.P. et al. 2001; Pokrywczynska M. et al., 2015). Данный материал биосовместим, способствует неоваскуляризации и регенерации уротелия и гладкой мышечной ткани (Davis N.F. et al., 2018). Применяют следующие разновидности экстрацеллюлярных матриксов:

- бесклеточный подслизистый матрикс мочевого пузыря (bladder acellular matrix, BAM), (Fu Q. et al., 2007; El Kassaby A.W. et al., 2008; Pokrywczynska M. et al., 2015);
- бесклеточный подслизистый тонкокишечный матрикс (small intestinal submucosa, SIS), (Mantovani F. et al., 2011; Palminteri E. et al., 2012; Orabi H. et al., 2013);
- бесклеточный матрикс губчатого тела (Feng C. et al., 2011);

- бесклеточный дермальный матрикс (Lin J. et al., 2005; Bhargava S. et al., 2008);
- бесклеточный уретральный матрикс (Hu Y.F. et al., 2009; Simões I.N. et al., 2017);
- бесклеточный сосудистый матрикс (Parnigotto P.P. et al., 2000; Глыбочко П.В. и др., 2015);

Наиболее часто в исследованиях применяют подслизистые матриксы из мочевого пузыря и из тонкой кишки.

Как правило ВАР получают из трупного человеческого или свиного мочевого пузыря. Данные матриксы сопоставимы по составу, строению и механическим свойствам. Благодаря пористой структуре, клетки хорошо адгезируют на поверхности, при этом матрикс обладает гидрофобными свойствами (Pokrywczynska M. et al., 2015).

Получают SIS из тонкой кишки свиней, оставляя в основном лишь 0,1 мм коллагеновую мембрану, образованную подслизистым слоем (Zhang Y. et al., 2000). SIS является достаточно растяжимым материалом (Kubricht W.S. et al., 2001), а биodeградация длится от четырёх до восьми недель (Badylak S. F. et al., 1998).

Однако применение экстрацеллюлярных матриксов имеют недостатки, связанные с возможностью сохранения в их структуре гетерогенных белковых молекул, которые являются иммуногенными и могут вызвать воспалительную реакцию и фиброзирование тканей (Davis N. F. et al., 2018).

### **1.3.2. Типы клеток, применяемых в тканевой инженерии уретры**

Включение клеточного компонента в состав тканеинженерных конструкций значительно улучшает результаты уретропластик (Mangir N. et al., 2019).

Существуют различные типы клеток, используемые в тканевой инженерии, со своими преимуществами и недостатками. Одним из наилучших методов получения клеток является забор аутологичных клеток у пациента с последующим их культивированием *in vitro*. Данный вариант не вызывает иммунного ответа после трансплантации, но могут возникать осложнения в области забора клеток, аутологичные клетки при ряде заболеваний и у пожилых пациентов могут быть не пригодны для трансплантации. Альтернативным вариантом является использование аллогенных клеток, однако серьезные ограничения, такие как передача инфекционных агентов, социальные, моральные и этические вопросы, резко уменьшили энтузиазм касательно данного направления (Heath С.А., 2000). В литературе встречаются следующие типы клеток, использующиеся как часть тканеинженерной конструкции для уретропластики:

- Мезенхимные стволовые клетки (МСК) первоначально были обнаружены в строме костного мозга, но затем найдены и в других органах, таких как плацента, пуповина, печень и жировая ткань (Лызиков А.Н. и др., 2015). МСК являются мультипотентными клетками и могут дифференцироваться в различные типы клеток. *In vitro* доказана способность МСК дифференцироваться в клетки, обладающие свойствами гладких миоцитов, уротелиальных и эндотелиальных клеток (Da Silva Meirelles L. et al., 2006). Кроме того, МСК секретируют большой спектр биоактивных макромолекул, как выполняющих регуляторную функцию, так и служащих для восстановления структуры поврежденной ткани (Tuan R.S. et al., 2003; Carlan A.I., 2007). МСК в культуре могут пролиферировать до 19 удвоений, не теряя при этом способности к пролиферации и дифференцировке (Шаманская Т.В. и др., 2009).
- Стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ) также применялись в ряде экспериментов (Li H. et al., 2014; Zhou S. et al., 2017). К преимуществам данных клеток можно отнести простоту и малую травматичность забора, а

также большой клеточный ресурс (Orabi H., Martins F. E., 2020). Кроме того, СКЖТ могут дифференцироваться в эпителиальную линию (Brzoska M. et al., 2005), а в прямой сокультуре с уротелиальными клетками СКЖТ экспрессируют специфичные для уротелия антигены – уроплакин Ib и уроплакин III (Liu J. et al., 2009).

- Стволовые клетки, выделенные из мочи (СКМ), имеют широкий дифференцировочный потенциал, могут дифференцироваться в уротелиальные и гладкомышечные клетки (Wu S. et al., 2011; Culenova M. et al., 2019), а также отмечена нейрогенная, эндотелиальная и слабые остеогенная, адипогенная и хондрогенная дифференцировки (Bharadwaj S. et al., 2013). В 75% случаев СКМ обладают теломеразной активностью. СКМ могут стать отличным клеточным ресурсом для тканевой инженерии уретры в связи с неинвазивным методом их забора, отсутствием онкогенного потенциала и простотой изоляции клеток (Abbas T.O. et al., 2020).
- Индуцированные стволовые плюрипотентные клетки уротелиального происхождения имеют большой потенциал последующей дифференцировки в уротелиальные клетки (Osborn S.L., Kurzrock E.A., 2015), что может применяться для использования их в составе тканеинженерных конструкций.
- Уротелиальные клетки получают, как правило, путем биопсии мочевого пузыря. Ткань, полученная при биопсии мочевого пузыря, позволяет получить как уротелиальные, так и гладкомышечные клетки, используемые в тканеинженерных конструкциях (Васютин И.А. и др., 2017). Ограничением к использованию данного типа клеток является несовершенство методик их культивирования, требующих дальнейшего изучения (клетки дают малое количество пассажей) (Abbas T.O. et al., 2020).

- Эпителиальные клетки слизистой оболочки щеки положительно зарекомендовали себя в ряде исследований по реконструкции уретры (Bhargava S. et al., 2008; Mikami H. et al., 2012).

Кроме вышеприведенных типов клеток, есть немногочисленные исследования по применению тканеинженерных конструкций, заселенных кератиноцитами, а также фибробластами (Atala A. et al., 2017). Кроме того, включение гладкомышечных клеток в состав тканеинженерной конструкции улучшает регенерацию и повышает эластичность тканей после имплантации (Arenas da Silva L. F. et al., 2014).

### **1.3.3. Применение факторов роста и биоактивных молекул в составе тканеинженерных конструкций**

Экстрацеллюлярные матриксы в своем составе могут содержать эндогенные факторы роста, которые благоприятно влияют на рост и дифференцировку клеточного компонента конструкции (Pokrywczyńska M. et al., 2015). Кроме того, применяют экзогенные факторы роста, биоактивные молекулы и генно-модифицированные клетки, экспрессирующие факторы роста (Guan Y. et al., 2008; Nuininga J. E. et al., 2010; De Kemp V. et al., 2015). Экзогенные факторы роста применяют для ускорения клеточного роста, васкуляризации и для подавления фиброобразования тканей. В исследовании J. Zhu и соавторов (2015) был изучен желатиновый скаффолд, содержащий эпидермальный фактор роста и митомицин C. При контролируемом высвобождении сначала выпущен эпидермальный фактор роста, который способствовал росту уротелиальных клеток, а затем происходила активация митомицина C, который подавлял рост фибробластов.

В другом исследовании в состав скаффолда на основе коллагена и поли(L-лактид-сокаприлактина) включали ингибитор Wnt пути (ICG-001), который препятствует фиброобразованию тканей путем воздействия на фактор некроза опухолей  $\beta$  (Zhang K. et al., 2015).

Все эти способы направлены на решение проблем, связанных с недостаточной метаболической активностью клеток, находящихся в условиях отсутствия сосудистой сети для доставки метаболитов и удаления продуктов жизнедеятельности.

#### **1.3.4. Применение тканеинженерных конструкций для уретропластики**

По строению тканеинженерные конструкции разделяются на две группы – трубчатые и в виде графта (Atala A. et al., 2017). При классической буккальной пластике уретры применяют только плоские имплантаты в связи с большим количеством отрицательных результатов при применении тубуляризованных графтов – более 50% (Mangera A. et al., 2011). Единственное клиническое исследование, в котором применялись трубчатые тканеинженерные конструкции, проводилось пяти мальчикам с травмами задней уретры, строение которой в корне отличается от передней губчатой части мочеиспускательного канала (Raya-Rivera A. et al., 2011).

Первые экспериментальные исследования по реконструкции уретры, в которых применялись ПТФЭ, силикон, дакрон, оказались неудачными. Как результат использования небиodeградируемых материалов происходило формирование эрозий, фистул, а также камней (Hakky S.I., 1977; Anwar H. et al., 1984).

Затем стали успешно изучать биodeградируемые материалы – полилактиновые сетчатые трубки, покрытые полигидроксимасляной кислотой в экспериментах на собаках. Через 12 мес уротелий регенерировал, а окружающие ткани сохранили жизнеспособность, просвет уретры был сохранен (Olsen L. et al., 1992).

Исследователи также изучали возможность использования ксеногенных тканей на основе коллагена для реконструкции уретры. Бесклеточный подслизистый тонкокишечный матрикс, применявшийся в 1980-х гг. в эксперименте в качестве сосудистого трансплантата, стал использоваться для

реконструкции уретры кроликов. Этот материал стимулировал неоваскуляризацию, а также регенерацию уротелия и гладкомышечного слоя (Kropp V.P. et al., 1998). В 1996 г. впервые у пациентов со стриктурной болезнью уретры или после неудачных операций по поводу гипоспадии использован бесклеточный подслизистый коллагеновый матрикс мочевого пузыря, достигнуты положительные отдаленные результаты (Atala A. et al., 1999). Было проведено рандомизированное исследование, сравнивающее применение буккальной пластики и бесклеточного подслизистого матрикса мочевого пузыря. Исследователи пришли к выводу, что если подлежащая лоскуту ткань не повреждена, то результаты в обоих случаях одинаково положительные; однако при поврежденной подлежащей ткани результаты применения бесклеточного матрикса отрицательные (El Kassaby A.W. et al., 2008).

В 2007 г. впервые были представлены результаты клинического исследования по применению бесклеточного подслизистого тонкокишечного матрикса. При медиане наблюдения пациентов 71 месяц в 76% случаев был достигнут успех, но при дефектах уретры более 4 см в 100% случаев результат оказался отрицательным (Palminteri E. et al., 2012).

В другом экспериментальном исследовании, опубликованном в 2008 году, было показано, что использование тубуляризованных экстрацеллюлярных матриксов оправдано, если требуется замещение не более 0,5 см уретры (Dorin R.P. et al., 2008).

В работе, опубликованной в 2017 году, в условиях эксперимента произвели сравнение имплантации в стенку уретры кроликов SIS, засеянных СКМ и без данных клеток. Исследование показало значительное преимущество заселения матрикса клетками, что минимизировало воспалительную реакцию и фиброзирование тканей в зоне имплантации. Кроме того, СКМ, согласно данным конфокальной микроскопии, дифференцировались в уротелиальные и гладкомышечные клетки (Liu Y. et al., 2017).

В 2002 г. исследователи на животных (кролики) впервые применили трубчатый децеллюляризованный матрикс мочевого пузыря, засеянный аутологичным уротелием (De Filippo R.E. et al., 2002). В последующем исследовании применялись биodeградируемые стенты из PLLA и уротелиальных клеток. Результатом этого исследования явилась полная регенерация уротелия в течение 24 недель (Fu W.J. et al., 2009).

Впервые тканеинженерная конструкция трубчатой формы с использованием аутологичных клеток была применена в 2005 г. Трубчатые скаффолды из ПЛГА, засеянные внутри уротелиальными, а снаружи гладкомышечными клетками трансплантировали пяти мальчикам с травмой задней уретры. Клинический результат был положительным, а медиана наблюдения составила 71 месяц (Raya-Rivera A. et al., 2011).

В 2017 г. Европейская ассоциация урологов опубликовала систематический обзор и метаанализ доклинических и клинических исследований, посвященных тканевой инженерии уретры. Были включены 80 доклинических и 23 клинических исследования, а метаанализ проводился в 63 и 13 исследованиях соответственно. Этот обзор показал, что клеточные тканеинженерные конструкции значительно снижают число отрицательных результатов. Тем не менее только в 4 из 23 клинических исследований применялись тканеинженерные конструкции, заселенные клетками. В доклинических исследованиях активно и успешно применялись синтетические биополимеры, тогда как в 21 из 23 клинических исследований были использованы бесклеточные матриксы. Результаты многих доклинических исследований не были использованы в клинических исследованиях (Versteegden L.R.M. et al., 2017).

Также в 2017 году Ram-Liebig et al. опубликовал самое крупное на сегодняшний день многоцентровое, проспективное, наблюдательное исследование, в котором был применен тканеинженерный аутологоичный буккальный графт с торговым названием MikoCell. Используя метод Каплана-Мейера, была произведена оценка результатов уретропластики по поводу

стриктуры уретры у 98 пациентов. Через один год у 67.3% (95% CI 57.6-77.0) пациентов не отмечалось развития рецидива стриктуры уретры, через два года – только у 58.2% (95% CI 47.7-68.7) (Ram-Liebig G. et al., 2017).

При выполнении буккальной уретропластики хирурги могут столкнуться с недостаточной длиной графта, а также с осложнениями в донорской зоне и увеличением продолжительности хирургического вмешательства. Поэтому актуальным направлением является создание тканеинженерной конструкции в качестве материала для уретропластики. Данное направление активно развивается, опубликован ряд доклинических и клинических исследований, но до сих пор тканеинженерные конструкции не транслируются в рутинную клиническую практику.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Общая характеристика материалов и методов исследования

Исследование двухэтапное, экспериментальное, контролируемое, выполнено на базе лаборатории экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Синтез скаффолдов и исследование их механических свойств, а также производство ТИК выполнялось на базе группы тканевой инженерии и лаборатории клеточных биотехнологий Центра клеточных технологий федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук совместно с кандидатом биологических наук, научным сотрудником Ю.А. Нащекиной и кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Н.М. Юдинцевой.

**На первом этапе** *in vitro* произведена оценка физико-химических свойств и биологической совместимости исследуемых скаффолдов, *in vivo* изучена их биодegradация у 10 половозрелых крыс-самцов линии Wistar, массой тела  $393,7 \pm 29,97$  г (350-444 г).

**На втором этапе** созданные тканеинженерные конструкции имплантировали на модели острой травмы уретры экспериментальным животным (кроликам). В данный этап исследования включены 31 половозрелый кролик-самец породы «шиншилла» массой тела  $3919,1 \pm 378,01$  г (3366-5145 г).

Схема исследования представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Схема исследования

Критерий исключения экспериментального животного из исследования: летальный исход в течение двух месяцев после хирургического вмешательства.

Методы оценки эффективности:

1. Выживаемость животных;
2. Оценка лучевых данных: уретрографии;
3. Макроскопическая оценка паренхиматозных органов и лимфатических узлов;
4. Макроскопическая оценка зоны хирургического вмешательства;
5. Морфологическая и морфометрическая оценка;
6. Сканирующая атомно-силовая микроскопия;
7. Конфокальная микроскопия криосрезов тканей в зоне хирургического вмешательства.

## 2.2. Характеристика лабораторных животных

В исследование включены 10 половозрелых крыс-самцов линии Wistar и 31 кролик породы «шиншилла» (федеральное государственное унитарное предприятие «Питомник лабораторных животных «Рапполово» федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»»). Животные содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России согласно СанПиН 2.2.1.3218 – 14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными»:

кролики – по одной особи в клетках из нержавеющей стали тип NYA K (S = 4200 см<sup>2</sup>), оборудованными кормушками и стандартными поилками;

крысы – в поликарбонатных клетках Charles River laboratories Inc тип 4H, S=1800 см<sup>2</sup>, по 3 особи, на подстиле, площадь пола в клетке содержания для одного животного составляла 600 см<sup>2</sup> (минимально допустимая площадь 150 см<sup>2</sup>). Клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением из нержавеющей стали, оборудованными кормушками и стандартными поилками. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура поддерживалась в пределах +23 – +25<sup>0</sup>С, относительная влажность – 50-70%. Воздухообмен поддерживался с помощью приточно-вытяжной вентиляции, стерилизация воздуха осуществлялась ежедневно путем кварцевания.

Исследования проводились согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», приказу N 512н от 8 августа 2018 года «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами», ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» и ГОСТ Р 33044-2014 «Принципы надлежащей

лабораторной практики». Животные включали в исследование после двухнедельного карантина, при отсутствии внешних признаков патологии, изменений в общеповеденческих реакциях.

## **2.3. Первый этап исследования – изучение механических свойств скаффолдов и их биодegradации**

### **2.3.1. Приготовление скаффолдов**

Приготовлено два типа скаффолдов:

- для МСК использовали пористую матрицу, состоящую из поли- (D, L)-лактида (ПЛ) и поликапролактона (ПК) (рис. 2А). Пористый слой двухслойной матрицы готовили методом выщелачивания: поли (D,L-лактид) с ( $\eta = 2.0$  дл/г) (Purasorb PL-20, Corbion Purac, Netherlands) растворяли в хлороформе (Реактив, Россия). Раствор в концентрации 2 мг/мл смешивали с солью хлористого натрия и оставляли сушиться до полного удаления растворителя. После испарения хлороформа, сверху наносили раствор поликапролактона (мол. масса  $M_n$  80,000) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA) в концентрации 2 мг/мл в хлороформе (Реактив, Россия). После испарения растворителя, матрицу извлекали из формы и промывали в большом количестве воды для растворения кристаллов хлористого натрия;
- для уретропластики с использованием КБЭ был изготовлен двухслойный скаффолд на основе полигидроксиэфиров (рис. 2Б). Внутренний слой, который будет контактировать с мочой сформировали из поли-L-лактид-капролактона (ПЛК) (70/30) ( $h=3,8$  дл/г, Purac). Сплошная и непроницаемая для жидкости структура, обеспечивающую барьерную функцию (от мочи) и механическую прочность всей конструкции. Второй слой, на который будут посеяны клетки, был приготовлен на основе поли-L-лактид-гликолида (ПЛГ) (85/15) ( $h=3,13$  дл/г, Purac). Полимеры растворяли в трихлорметане (Вектон, Россия) до конечной концентрации раствора 50 мг/мл и наносили на предметные стёкла. Сначала раствор объёмом 1 мл на основе ПЛК

равномерно наносили на покровное стекло и оставляли сушиться на 2 часа на воздухе. После полного испарения растворителя на слой полимера наносили раствор объемом 1 мл на основе ПЛГ и оставляли сушиться на воздухе. После испарения растворителя на воздухе скаффолды сушили при температуре + 37°C до постоянной массы.

Стерилизацию скаффолдов выполняли методом озонирования в режиме: концентрация газообразного озона 200 ед/млн в течение 120 мин при относительной влажности 80%. Для анализа строения скаффолда выполнялась сканирующая электронная микроскопия (SEM) (FE-SEM; JSM-6340F, JEOL, Tokyo, Japan).

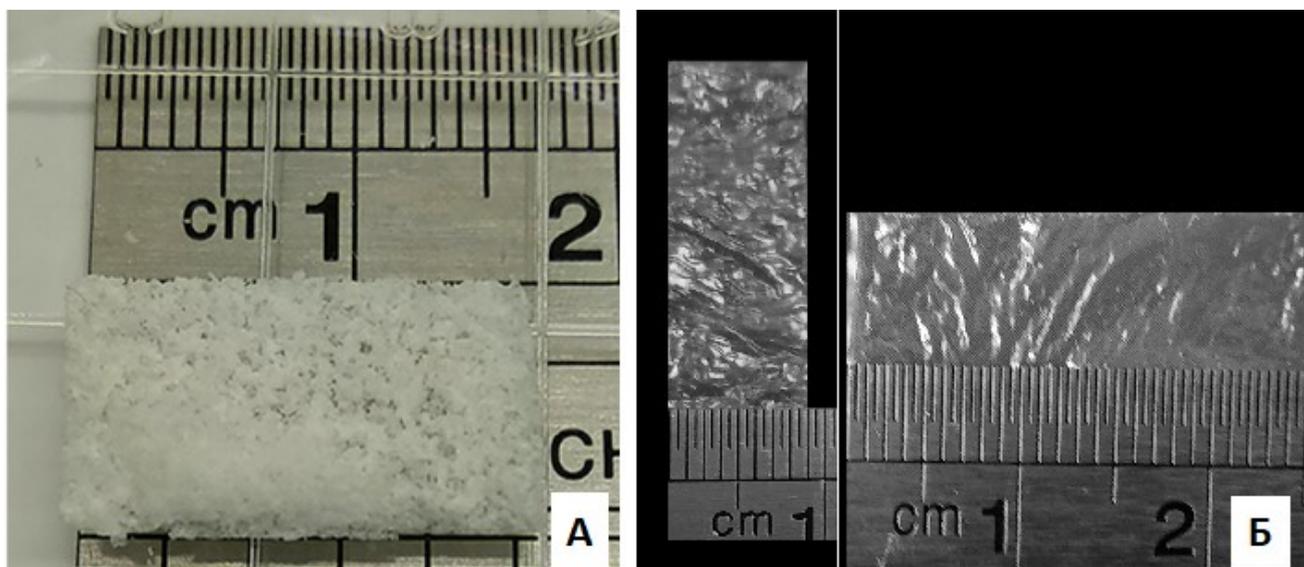


Рисунок 2 – Внешний вид скаффолдов: А – пористый двуслойный скаффолд из PLL+PLG; Б – плоский двуслойный скаффолд из PLLG+PLK

### 2.3.2. Оценка физико-химических характеристик скаффолдов

Механические испытания скаффолдов производились на аппарате Instron 1122 в следующем режиме: скорость растяжения – 10 мм/мин, базовая длина – 30 мм. Оценивались такие параметры, как прочность, удлинение при разрыве и модуль упругости. Кроме этого, учитывали такой параметр, как возможность наложения швов. Водопроницаемость определялась с использованием

сканирующей электронной микроскопии – визуализировалась наружная структура скаффолда.

### **2.3.3. Изучение биодegradации скаффолдов**

Изучение биодegradации применяемых скаффолдов произведено на 10 крысах-самцах линии Wistar. Подкожно крысам имплантированы скаффолды ПЛ+ПК и ПЛК+ПЛГ.

*Протокол хирургического вмешательства.* Под общей анестезией с использованием тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорида (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела внутримышечно и ксилазина гидрохлорида (Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1.0–1.5 мл внутримышечно) в области спины с обеих сторон от позвоночной линии выполнены 10 поперечных разрезов (по 5 с каждой стороны) протяженностью 1,0 см каждый (рис. 3). Первая пара разрезов – контроль, во вторую и третью пары разрезов подкожно имплантированы скаффолды ПЛ+ПК, в четвертую и пятую – скаффолды ПЛК-ПЛГ. Затем раны были ушиты, выполнена обработка послеоперационных ран раствором антисептика, асептическая повязка.



Рисунок 3 – Техника выполнения подкожной имплантации скаффолдов в область спины крысы

Крысы выводились из эксперимента через 1 и 4 недели (по 5 крыс в каждый срок соответственно) путем внутримышечного введения препаратов тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, France) и миорелаксанта ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в дозах, в 5 раз превышающих терапевтические. Макроскопическое исследование модельных животных проводилось путем осмотра зоны имплантации, срезы кожи в местах имплантации резецировались вместе с окружающими тканями. Образцы в течение 24 часов фиксировали в 10% растворе формалина (pH 7,4), методика гистологического исследования описана в главе 2.4.4.

## **2.4. Второй этап исследования – создание и имплантация ТИК на модели острой травмы уретры экспериментальным животным**

На данном этапе кролики были разделены на три группы в зависимости от используемого графта: группа №1 (n=9) – в уретру дорсо-латерально имплантирован скаффолд на основе ПЛ+ПК с МСК; группа № 2 (n=15) – имплантирован скаффолд на основе ПЛГ+ПЛК с КБЭ; группа № 3 (n=4) – выполнена буккальная пластика уретры.

### **2.4.1. Выделение, культивирование и интернализация наночастиц клетками**

*Животным группы № 1* сначала производилась трепан-биопсия подвздошной кости: под общей анестезией с использованием тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорида (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела внутримышечно и ксилазина гидрохлорида (Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1.0–1.5 мл внутримышечно). Выполняли прокол кожи в области гребня подвздошной кости шприцом с иглой диаметром 18 G, затем вращательными движениями игла вводилась в костную ткань, производился забор костного мозга, после чего игла извлекалась.

Из аспирата выделяли моноклеарные клетки, которые культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку и раствор гентамицина (Gibco, Великобритания) 50 мкг/мл. Все клетки помещали в инкубатор с увлажненным воздухом, содержанием CO<sub>2</sub> 5% и постоянной температурой 37° С. Клетки, которые не адгезировали, были удалены из культуры путем отмывания раствором фосфатно-солевого буфера PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7.4, 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 мМ KCl) с последующей заменой среды. Клетки выделяли в экспоненциальной фазе роста, а их жизнеспособность определяли путем окраски 0,4% раствором трипанового синего. МСК, полученные из третьего пассажа, были проверены на наличие остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировки (рис. 4) согласно ранее описанной в литературе методике (Reyes M. et al., 2001; Koltsova A.M. et al., 2016).

Клетки культивировали в течение трех недель с использованием специальных питательных сред для остеогенной, хондрогенной и адипозогенной дифференцировок.

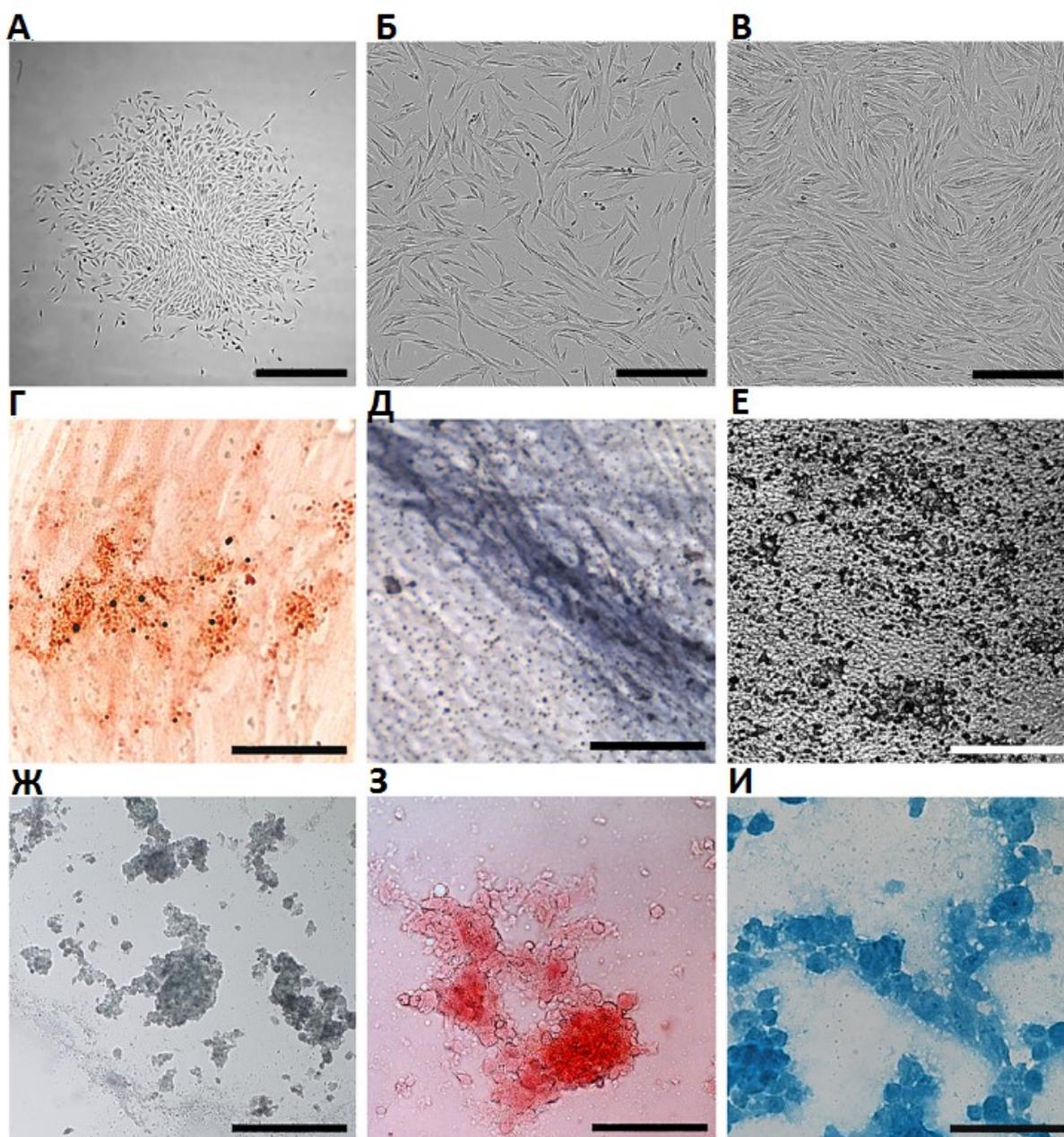


Рисунок 4 – Культура МСК кролика (А; Б; В) и различные направления дифференцировки (Г; Д; Е; Ж; З; И): А - через 1 сутки; Б – через 3 суток; В – через 7 суток (электронная микроскопия, 300 $\mu$ m); Г – адипогенная дифференцировка, окраска масляным красным; Д – остеогенная дифференцировка, окраска щелочной фосфатазой; Е – остеогенная дифференцировка, реакция фон Косса; Ж– хондрогенная дифференцировка, окраска толуидиновым синим; З – хондрогенная дифференцировка, окрашивание сафранином; И – хондрогенная дифференцировка, окрашивание альциановым синим (электронная микроскопия, 100 $\mu$ m)

Для выполнения биопсии слизистой щеки *животных группы № 2* в условиях операционной под общей анестезией с использованием тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорида (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела внутримышечно и ксилазина гидрохлорида (Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1.0–1.5 мл внутримышечно), после обработки слизистой ротовой полости 0.05% водным раствором хлоргексидина острым путем произведен забор биоптата слизистой оболочки щеки размером 3×5 мм, гемостаз.

Ткань транспортировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей раствор гентамицина (Gibco, Великобритания) в рабочей концентрации 100 мкг/мл. Затем биоптат в условиях ламинарной скамьи переносили в новую пробирку и трижды отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера PBS с использованием реактивов квалификации ОСЧ (Helicon, США), содержащем смесь антибиотиков: пенициллина/стрептомицина (200 ед/мл и 200 мкг/мл), гентамицина и амфотерицина (200 мкг/мл) (Gibco, США). Выделение клеток выполняли по методу культивирования эксплантатов (Борзенков и др, 2019) с модификациями. Биоптат переносили в чашку Петри эпителиальной стороной вниз, с помощью микрохирургического пинцета и скальпеля отделяли подслизистую часть до появления белесоватой прослойки перед слоем эпителия. Измельчали биоптат на фрагменты размером 1 мм<sup>2</sup>. С целью предотвращения высыхания биоптата в ч. Петри вносили 50-100 мкл среды DMEM, содержащей гентамицин. Фрагменты эпителия переносили в лунки слайд-флаконов (IBIDI, Германия) так, чтобы белесоватая прослойка находилась на дне лунки. Планшет с открытой крышкой оставляли на 1-3 мин для первичного «присыхания» в условиях ламинарного бокса, затем на фрагменты наносили по 50 мкл питательной среды DMEM/F12 с 1,05 mM содержанием Ca (Sigma-Aldrich, США), 5% фетальной сыворотки (HyClone, США), инсулина (5 мкг/мл), гидрокортизона (5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США), эпидермального фактора роста (10 нг/мл) (ПанЭко, Россия), раствора гентамицина и помещали в стандартные условия CO<sub>2</sub>-

инкубатора на 2-3 ч. В каждую лунку аккуратно добавляли по 500 мкл питательной среды DMEM/F12.

Оценку миграции клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, Япония, фиксировали на фотокамеру. Смену питательной среды выполняли с момента появления первых мигрирующих клеток и далее через 1 сутки. После достижения клетками 80-90% конfluence выполняли пересев посредством обработки культуры 0.25% раствором трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания). В экспериментах использовали клетки 2-3 пассажей.

Для определения жизнеспособности и тканевой принадлежности проводили иммунофлуоресцентный анализ. Культуру КБЭ в слайд-флаконах трижды промывали раствором PBS и фиксировали раствором 10% нейтрального формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Для пермеабилзации клеточной мембраны вносили 0.1% раствор Тритон X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Трижды отмывали и для блокировки сайтов неспецифического связывания в течение 1 ч инкубировали в растворе 0.2% бычьего сывороточного альбумина. В качестве первичных антител в разведении 1:250 использовали антитела против виментина (Anti-Vimentin antibody [RV202] (Abcam, США) для выявления промежуточных филаментов, интегрин  $\beta 1$  (Anti-Integrin  $\beta 1$  Antibody, clone V3B11 (Merck, США) для окраски базальных клеток эпителия, APC anti-human Ki-67 (BioLegend, Германия) для оценки пролиферации. Инкубацию клеток с антителами проводили в течение ночи при температуре +4°C. В качестве вторичных антител в разведении 1:250 использовали Goat Anti-Mouse IgG (Abcam, США).

После трехкратной отмывки препаратов раствором PBS для окраски ядер КБЭ и МСК на 10 мин вносили краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, США), затем в лунки вносили раствор PBS. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, окрашенные только вторыми антителами.

Далее для последующей идентификации клеток в эксперименте *in vivo* МСК и КБЭ были мечены *суперпарамагнитными наночастицами оксида железа* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , SPION). SPION с размерами менее 50 нм были покрыты декстраном с целью повышения биосовместимости и снижения агрегации. Клетки, достигшие состояния монослоя, инкубировали с суперпарамагнитными наночастицами оксида железа с концентрацией 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  в течение 24 часов в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. После инкубации в культуре клеток была выполнена смена среды на свежую, а клетки, находящиеся на стеклах, были трижды отмыты раствором PBS. Оценку жизнеспособности клеток выполняли с помощью окраски красителем Трипановый синий (0,4%, Биолот, Россия). Дополнительно с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-метод) была проанализирована цитотоксичность наночастиц. Был использован набор Vybrant® МТТ в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, США).

Выявление иммунофлуоресценции выполняли с использованием диодного лазера (488 нм), ядра детектировали с помощью диодного лазера (405 нм), для анализа внутриклеточной локализации магнитных наночастиц применяли сканирование отраженным лазером (504 нм). В работе был использован конфокальный микроскоп (Olympus FV3000) с использованием конфокальной системы Olympus IX83 microscope (Olympus Corporation, Япония).

#### **2.4.2. Заселение скаффолдов клетками**

Скаффолд ПЛ+ПК обладает гидрофобными свойствами, поэтому за 24 часа до посева МСК помещался в 10% раствор фетальной бычьей сыворотки внутренним слоем сверху. Меченные наночастицами МСК ( $2 \times 1$  [Santucci et al., 2007] / млв 400 мкл среды) высевали на внутренний пористый слой скаффолда и инкубировали в увлажненном воздухе, с содержанием  $\text{CO}_2$  5% и постоянной температурой 37°C. Прикрепление клеток к скаффолду определяли путем просвечивающей электронной микроскопии. Тканеинженерная конструкция

помещалась на 5 дней в CO<sub>2</sub> инкубаторе в раствор из 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L глутамин и 50 мкг/мл раствор гентамицина.

Скаффолд ПЛК-ПЛГ помещали в чашку Петри (диаметр 35 см<sup>2</sup>) внутренним слоем (ПЛГ) вверх. Суспензию КБЭ в концентрации  $1 \times 10^6$  в объеме 200 мкл среды DMEM/F12, содержащей 5% фетальной сыворотки, инсулин, гидрокортизон, эпидермальный фактор роста, раствор гентамицина наносили на поверхность внутреннего слоя и помещали на 3-4 ч в условия CO<sub>2</sub>-инкубатора для адгезии. Оценку адгезии клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, Япония. После того как КБЭ адгезировали на поверхность скаффолда, аккуратно добавляли 1.5 мл среды и продолжали культивирование в течение 3 сут, не прикрепившиеся клетки удаляли при смене среды.

#### **2.4.3. Протокол хирургического вмешательства**

Ход хирургического вмешательства представлен на рисунке 4. Под общей анестезией (тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, France) в дозе 25 мг/кг массы тела внутримышечно ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1,0-1,5 мл внутримышечно) катетер Фолея №6 по уретре был заведен в полость мочевого пузыря, баллон раздут на 1,5 мл. Был произведен продольный разрез кожи полового члена длиной 3 см по вентральной поверхности, тупым и острым путем дорсо-латерально слева выделена уретра со спонгиозным телом, по дорсальной поверхности создан дефект слизистой 7×2 мм. Кроликам группы № 3 с помощью 0,1% раствора лидокаина была произведена гидропрепаровка слизистой щеки, а затем взят графт слизистой размерами 1,5×0,5 см. Буккальный графт был очищен от подлежащей клетчатки. Далее фиксирован к белочной оболочке кавернозных тел и к краям дефекта уретры узловыми викриловыми швами 6/0. У кроликов групп № 1 и 2 скаффолд фиксирован к краям дефекта и белочной оболочке кавернозных тел отдельными узловыми викриловыми швами 6/0. Гемостаз. Послойный шов раны. Уретральный катетер фиксирован к головке полового члена узловым викриловым

швом, 3/0, катетер отсечен на уровне меатуса. Обработка зоны операции антисептическим раствором. Асептическая наклейка.

За час до операции проводилась антибиотикопрофилактика: Цефазолин 10 мг/кг внутримышечно, в послеоперационном периоде также применялся Цефазолин 10 мг/кг 3 раза в сутки в течение 5 дней внутримышечно.

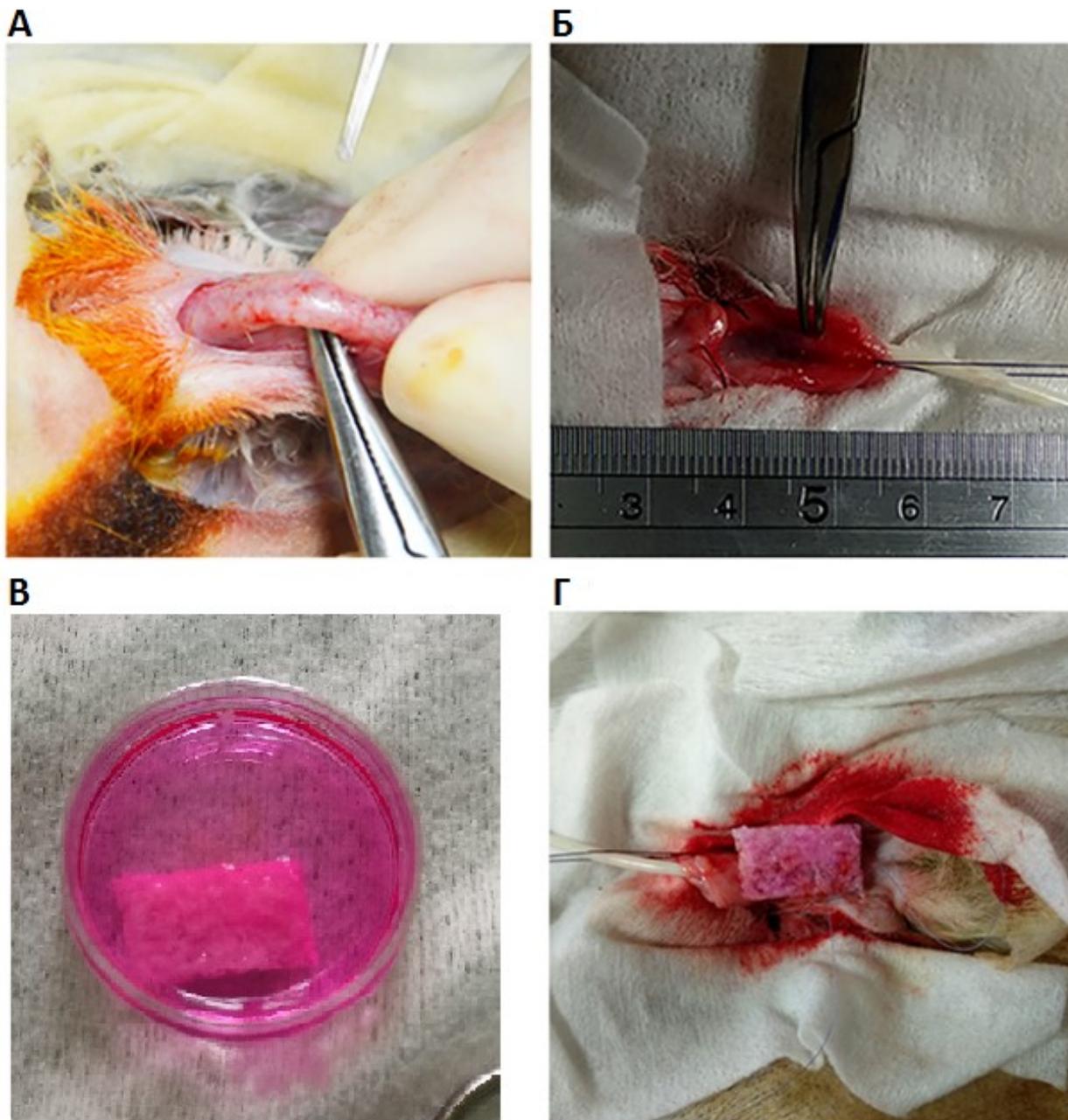


Рисунок 4 – Уретропластика с имплантацией ТИК, состоящей из ПЛ+ПК с МСК: А – уретра выделена дорсо-латерально; Б – вскрыт просвет уретры; В – ТИК с МСК; Г – сопоставление ТИК и краёв дефекта уретры

#### **2.4.4. Период наблюдения, эвтаназия и исследуемые данные (морфологические, уретрографии, исследование криосрезов)**

Контроль массы тела животных производился трехкратно: в день забора биоптата, в день проведения уретропластики и в день выведения животного из эксперимента. На третьи сутки удалялся уретральный катетер. Кролики выводились из эксперимента с использованием препаратов тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, France) и миорелаксант ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в дозах в 5 раз превышающих терапевтическую.

После эвтаназии всем животным проводилась ретроградная уретрография, при которой учитывались следующие параметры: проходимость уретры, наличие или отсутствие сужения, дивертикула, а также экстрavasации контрастного вещества. Исследование проводилось на аппарате рентгенографическом цифровом АРЦ- «ОКО» по ТУ 9442-024-11150760-2008 (производства ЗАО «НИПК «Электрон», Санкт-Петербург, Россия) с использованием контрастного вещества Омнипак 240 мг йода/мл.

Производилась макроскопическая оценка препарата – визуализация зоны имплантации и непосредственно ТИК, участка сужения, наличие дивертикула или свища.

После макроскопической оценки стенку уретры кроликов фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, далее материал проходил стандартную обработку в изопропиловом спирте и парафине для изготовления гистологических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3-5 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивались гематоксилином и эозином. При морфометрическом исследовании измерялись толщина эпителия, толщина слизистой оболочки уретры, производился подсчет количества сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм и диаметр просвета сосудов в подслизистой оболочке при помощи морфометрической линейки.

Полуколичественно оценивалась степень выраженности воспалительного инфильтрата лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Морфологическое исследование гистологических препаратов и препаратов, окрашенных гистохимическим методом, проводилось при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS при увеличении микроскопа 100 и 200. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320.

Гистологическое исследование выполнялось на базе патологоанатомического отделения федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России совместно с кандидатом медицинских наук Игорем Алексеевичем Самусенко.

Для обнаружения клеток, меченных наночастицами, образцы помещали в Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe BV, Alphen an den Rijn, Нидерланды) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Срезы (толщиной 5-7 мкм), полученные из этих блоков, устанавливали на предметные стекла Superfrost™ Plus (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Дополнительно срезы окрашивали, используя антитела специфические для клеток уротелия (Anti-cytokeratin AE1/AE3 antibody (Clone AE1/AE3), Abcam, США) и для гладкомышечных клеток ( $\alpha\text{SMA}$ , Abcam, США) в разведении 1:100. В качестве вторичных антител в разведении 1:250 использовали Rabbit anti-mouse FITC-labeled antibody (Sigma-Aldrich, США). Срезы дополнительно окрашивали DAPI. Флуоресцентные изображения были получены с использованием конфокальной системы (Olympus FV3000, Япония). Выявление иммунофлуоресценции выполняли с использованием диодного лазера (488 нм), ядра детектировали с помощью диодного лазера (405 нм), для анализа внутриклеточной локализации магнитных наночастиц применяли сканирование отраженным лазером (504 нм).

#### 2.4.5. Статистический анализ

Исследуемые данные подвергались статистической обработке методами вариационной статистики при помощи программ Microsoft Excel и SPSS Statistics Version 22 с определением показателей среднего значения ( $M$ ), ошибки среднего ( $m$ ), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента ( $t$ ) и уровня значимости ( $\alpha$ ), доверительного интервала ( $p$ ), различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Для оценки характера распределения количественных данных был применен критерий Колмогорова-Смирнова, при этом распределение данных рассматривалось как нормальное при уровне двусторонней значимости  $p > 0,05$ . Критерий Краскала-Уоллеса использовали при межгрупповом сравнении непараметрических данных с ненормальным распределением. Для оценки значимости различий при межгрупповом сравнении (возможность формирования свищевого хода в зависимости от типа имплантированного материала) использовался точный критерий Фишера.

### Глава 3. Результаты

#### 3.1. Результаты первого этапа исследования – изучения механических свойств скаффолдов и их биодegradации

В задачи нашего исследования входило изучение механических характеристик скаффолдов, которые описаны в табл. 1.

Таблица 1 - Механические свойства скаффолдов

Скаффолд	Ширина (мм)	Толщина (мм)	Прочность (МПа)	Удлинение при разрыве (%)	Модуль упругости (МПа)
ПЛ+ПК	3	1,2	0,19±0,09	15,9±3,4	1,68±0,09
ПЛГ+ПЛК	3	0,2	0,22±0,07	19,1±4,1	2,16±0,18
p			>0,05	> 0,05	< 0,05

Исходя из данных таблицы следует, что скаффолд на основе ПЛГ+ПЛК более упругий и прочный. При выполнении хирургических вмешательств ни в одном случае не было прорезывания швов. Полученные в результате проведенного исследования механо-прочностные характеристики скаффолдов, сопоставимы с соответствующими характеристиками нативной уретры кролика, описанными Feng C. и соавторами – модуль упругости  $1,98 \pm 0,73$  МПа, прочность  $0,20 \pm 0,07$  МПа (Feng C. et al., 2010).

По данным сканирующей электронной микроскопии поверхность изучаемых скаффолдов формировала сплошную структуру, непроницаемую для жидкости (рис. 5).

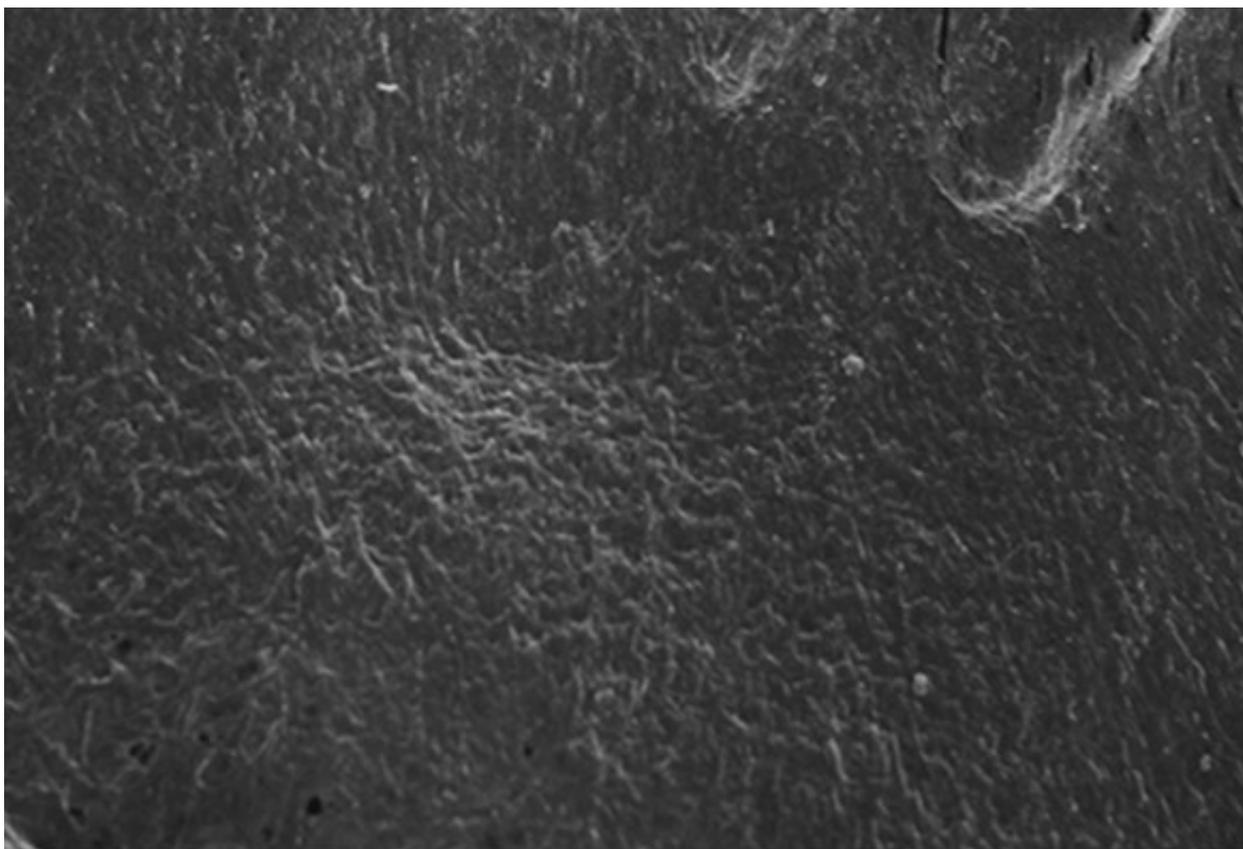


Рисунок 5 – Сканирующая электронная микроскопия: снимок наружной поверхности скаффолда из PLL+ПК (СЭМ, 100  $\mu\text{m}$ )

Снимок демонстрирует наличие гладкой, непроницаемой для воды поверхности скаффолда, обращенной к просвету уретры.

Для оценки токсичности *in vitro* материалов PLL+PLG и PLL+ПК, используемых в основе скаффолдов, определяли жизнеспособность стандартизированной культуры мезенхимных стволовых клеток в условиях их культивирования на синтезированных полимерных пленках (рис. 6).

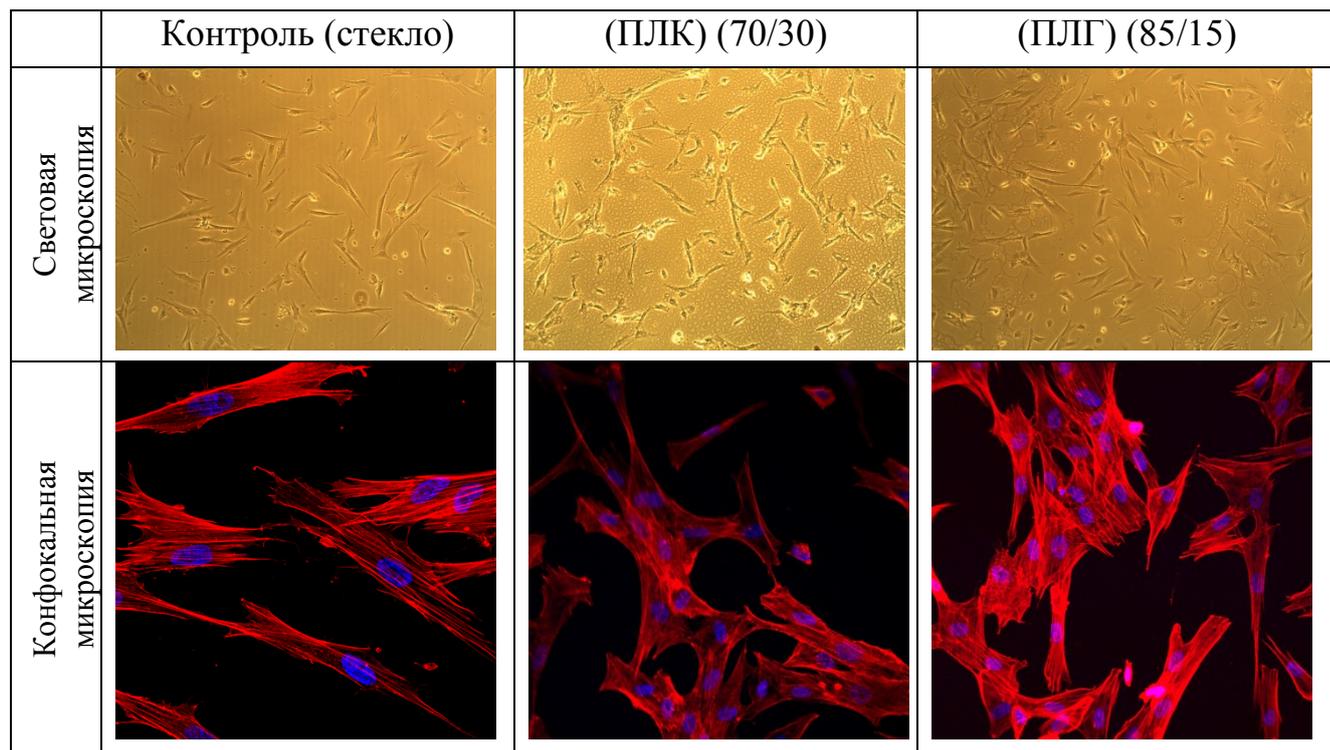


Рисунок 6 – Мезенхимные стромальные клетки костного мозга человека после 1 суток культивирования на полимерных пленках (световая микроскопия, увеличение×200, конфокальная микроскопия, 100 μm)

Фотографии, выполненные через сутки культивирования МСК, представленные на рисунке, показывают, что клетки сохраняют целостность, одинаково хорошо распластываются и адгезируются как на исследуемых материалах, так и на контрольном материале (стекло). Данные критерии свидетельствуют о жизнеспособности клеток и отсутствии токсичности материалов.

При изучении биodeградации скаффолдов при их подкожной имплантации крысам через 1 неделю определялась частичная биodeградация имплантатов, через 4 недели – полная (рис. 7). При этом макроскопически через 1 неделю большей деградации подвергся скаффолд на основе ПЛГ+ПЛК.

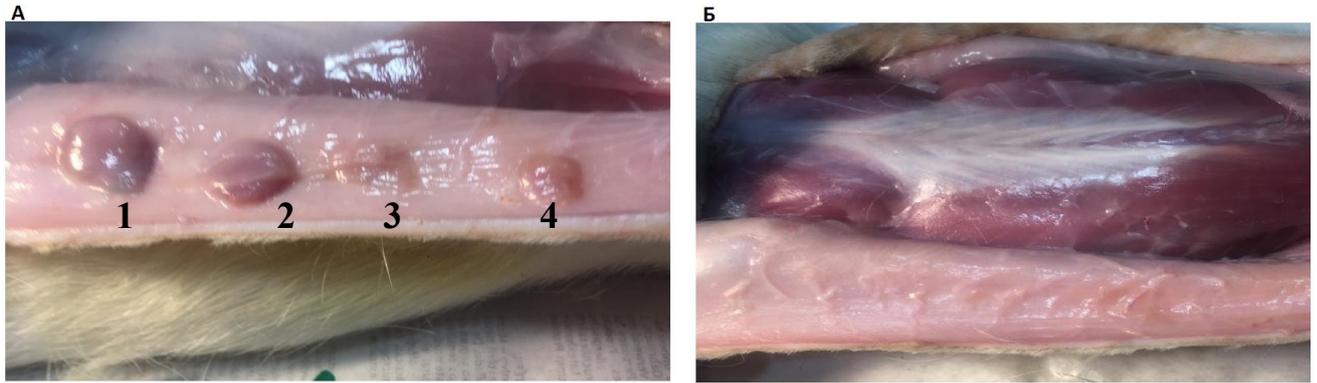


Рисунок 7 – Биодegradация исследуемых скаффолдов при подкожной имплантации крысам (1,2 – ПЛ+ПК, 3,4 – ПЛК+ПЛГ): А – зона имплантации через 1 неделю; Б – зона имплантации через 4 недели

При гистологическом исследовании препаратов тканей из зон имплантаций через 1 неделю определялась инфильтрация фибробластами, макрофагами и лимфоцитами. Через 4 недели биополимеры не определялись, в зоне инфильтрации выявлялась тонкая фиброзная капсула, толщиной в случае имплантации ПЛ+ПК –  $24 \pm 3,7 \mu\text{m}$ , ПЛК+ПЛГ –  $26 \pm 2,3 \mu\text{m}$  ( $p > 0,05$ ), небольшая лимфоцитарная инфильтрация, вокруг исследуемых зон отмечался неангиогенез, количество сосудов на  $1 \text{ мм}^2$  составило: в случае имплантации ПЛ+ПК –  $20,3 \pm 1,8$ , ПЛК+ПЛГ –  $17,5 \pm 1,2$ . Отторжения имплантата ни в одном наблюдении не определялось.

Таким образом, изучение новых скаффолдов на основе поли-L-лактид-капролактона и поли-L-лактидгликолида показало, что эти матрицы имеют хорошие механические характеристики. Однако при их сравнении скаффолды на основе ПЛГ+ПЛК обладают большей прочностью и упругостью. Изучение биодegradации показало, что все скаффолды к 4-й неделе полностью рассасываются. При их сравнении процесс биодegradации быстрее происходит у скаффолдов на основе ПЛГ+ПЛК.

## **3.2. Результаты второго этапа исследования – создание и имплантация ТИК на модели острой травмы уретры экспериментальным животным**

### **3.2.1. Исследования тканеинженерных конструкций**

Операцию по забору биоптатов слизистой щеки и трепан-биопсию все лабораторные животные перенесли удовлетворительно. Местных и общих осложнений не наблюдали.

Для имплантации в стенку уретры кроликов группы № 1 был синтезирован скаффолд ПЛ+ПК размерами 15×10×2 мм (рис. 2А).

По данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) был визуализирован внутренний пористый слой, необходимый для адгезии МСК. Диаметр пор данного слоя составил 250-300 мкм (рис. 8).

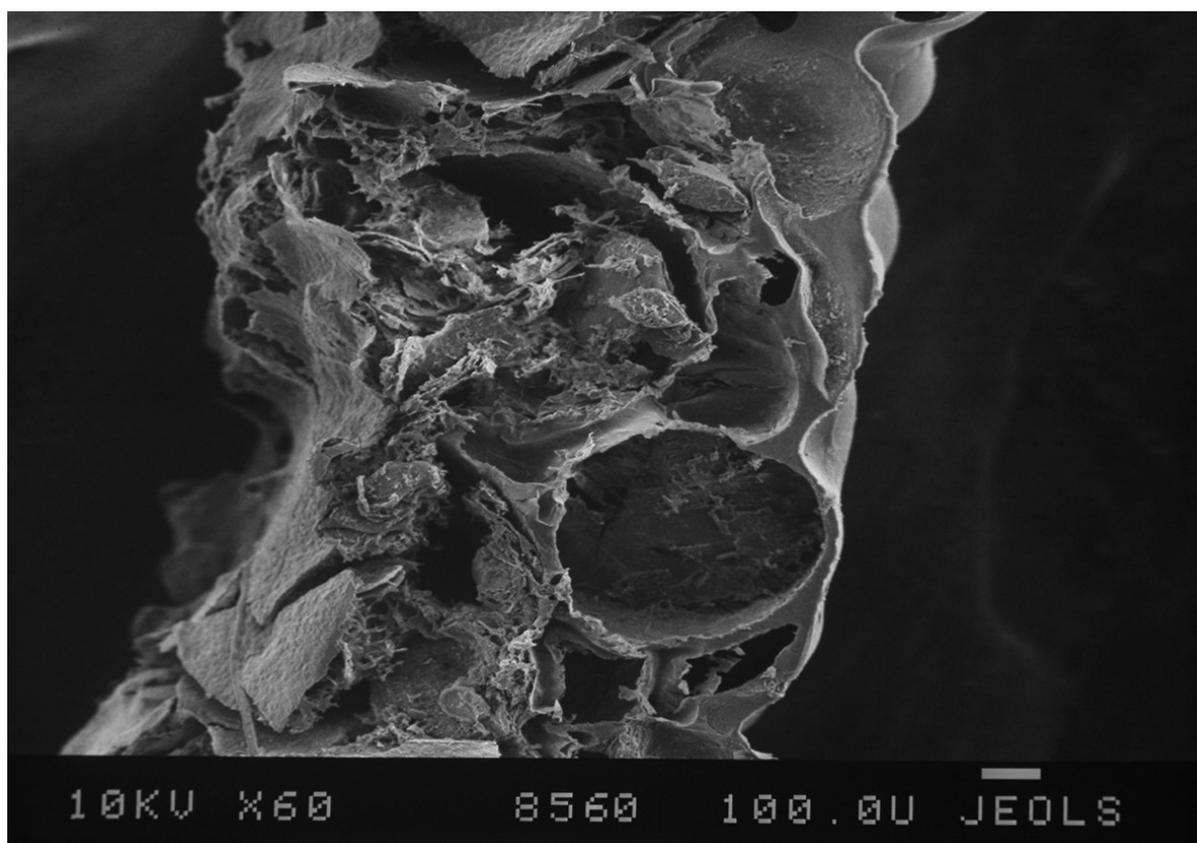


Рисунок 8 – Скаффолд из ПЛ+ПК, внутренний слой (СЭМ, 100 μm)

Наружный слой из ПК, созданный для защиты внутреннего слоя от цитотоксического действия мочи, был непористый (рис. 5). Внутренний и наружный слои плотно контактировали друг с другом. После посева МСК по данным сканирующей электронной микроскопии определялась нормальная морфология клеток и формирование мультислоев в порах. После инкубации ТИК в течение 48 часов цитотоксического эффекта не наблюдалось (рис. 9).

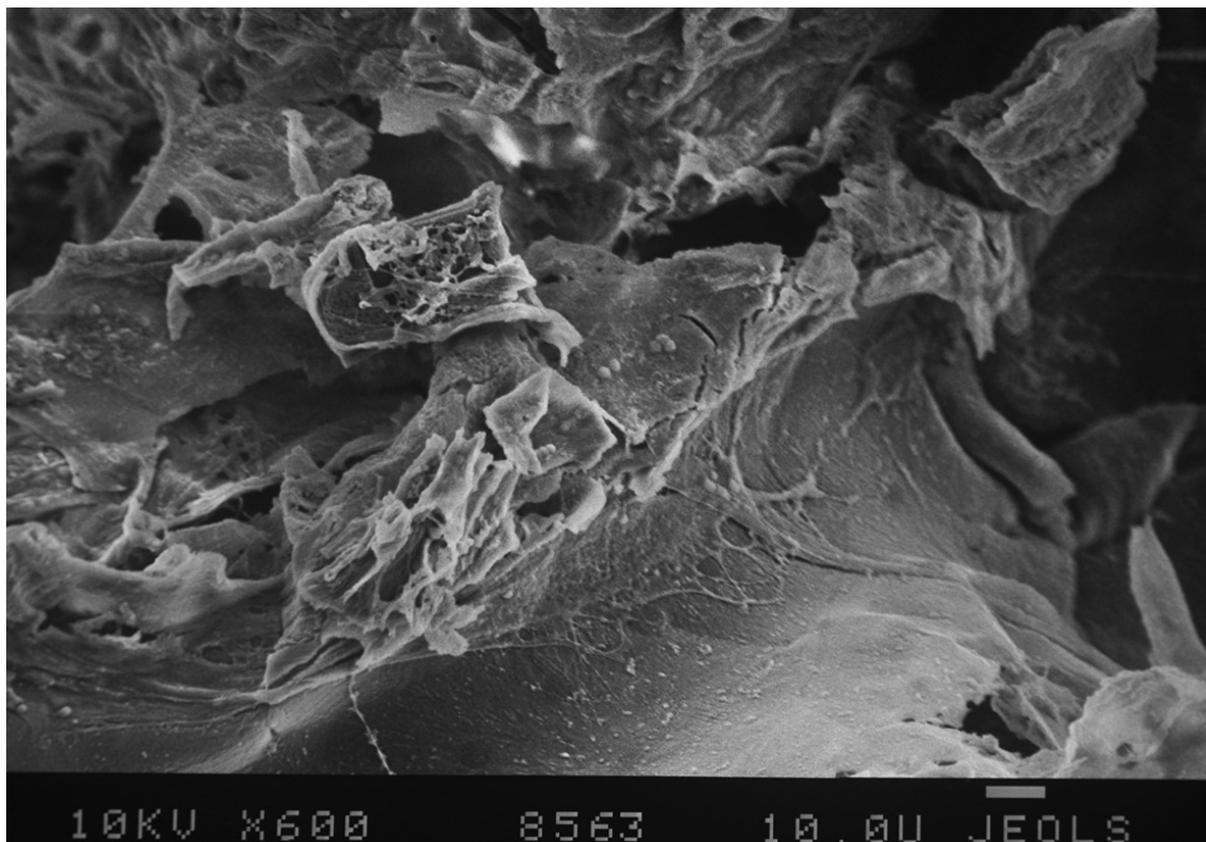


Рисунок 9 – Тканеинженерная конструкция на основе ПЛ+ПК с МСК, формирующими мультислои (СЭМ, 10  $\mu\text{m}$ )

По данным конфокальной микроскопии определялась высокая интернализация наночастиц МСК – визуализировалось как зеленое свечение в цитоплазме клеток (рис. 10).

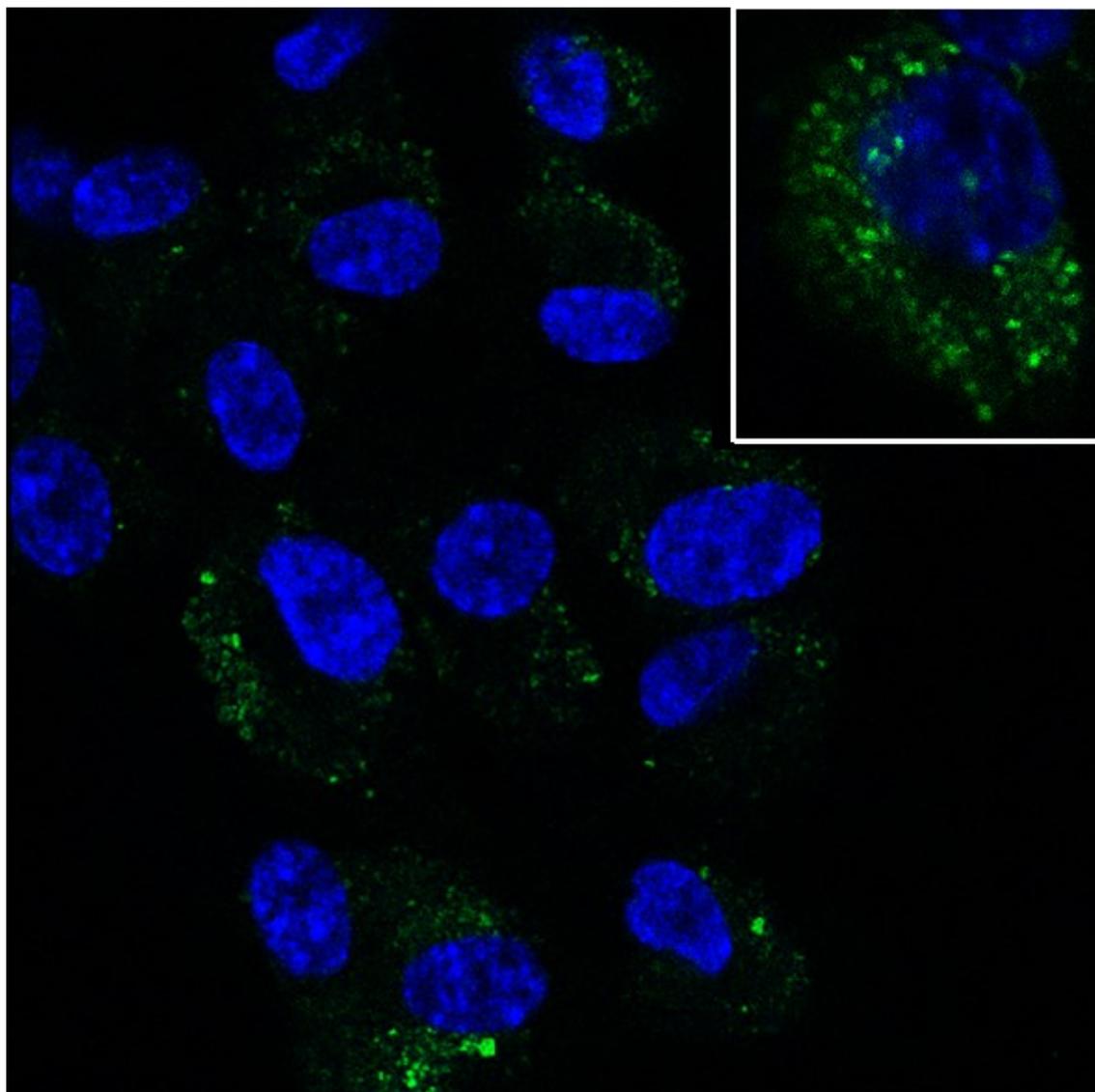


Рисунок 10 – Визуализация наночастиц в цитоплазме МСК (конфокальная микроскопия, 100  $\mu\text{m}$ )

В группе №2 через 3-5 сут. после начала культивирования начиналась миграция КБЭ из фрагментов ткани (рис. 11А). Морфология пролиферирующих клеток соответствовала классическому – по типу «булыжной мостовой» (рис. 11Б). В связи с прозрачностью приготовленного скаффолда присутствовала возможность визуальной оценки характера адгезии КБЭ, посеянных на его внутренний слой. После 24 ч культивирования клетки распластывались и формировали монослой (рис. 11В).

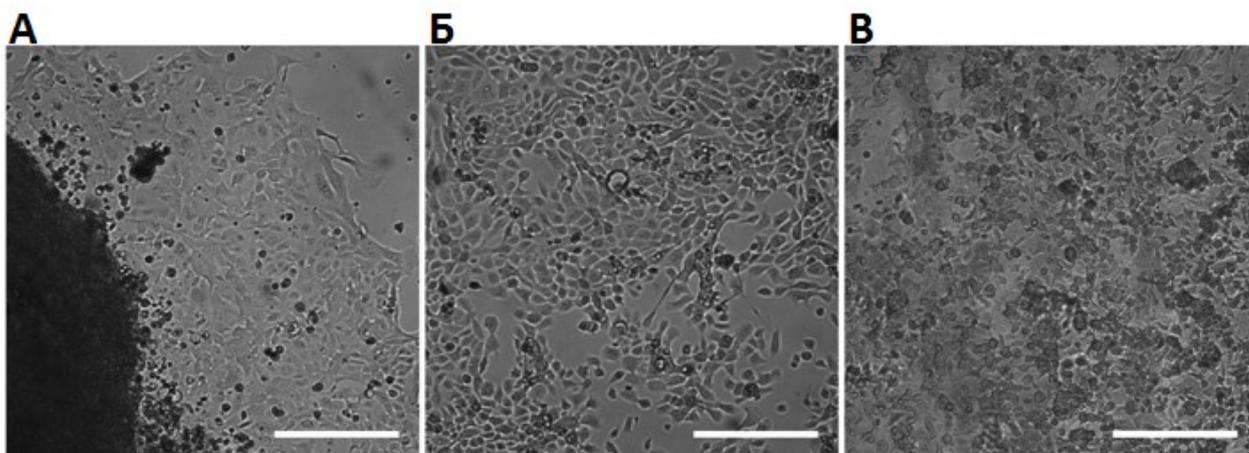


Рисунок 11 – Культивирование КБЭ (электронная микроскопия, 200μm): А – миграция клеток буккального эпителия; Б – пролиферирующие клетки, формирующие «булыжную мостовую»; В – монослой КБЭ

В первичной культуре КБЭ была отмечена экспрессия виментина (рис. 12А) и интегрин  $\beta 1$ , свидетельствующие о присутствии в культуре клеток базального эпителия (рис. 12Б), а также активная пролиферация клеток (рис.12В). После того как КБЭ образовывали монослой в питательную среду добавляли наночастицы с концентрацией 150 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч. Результаты конфокальной микроскопии продемонстрировали высокий уровень интернализации клетками наночастиц. Поглощенные наночастицы располагались в цитоплазме клеток, окружая, но не проникая в ядро (рис. 12Г). Цитотоксическое влияние наночастиц на КБЭ после совместной инкубации в течение 24 часов отсутствовало.

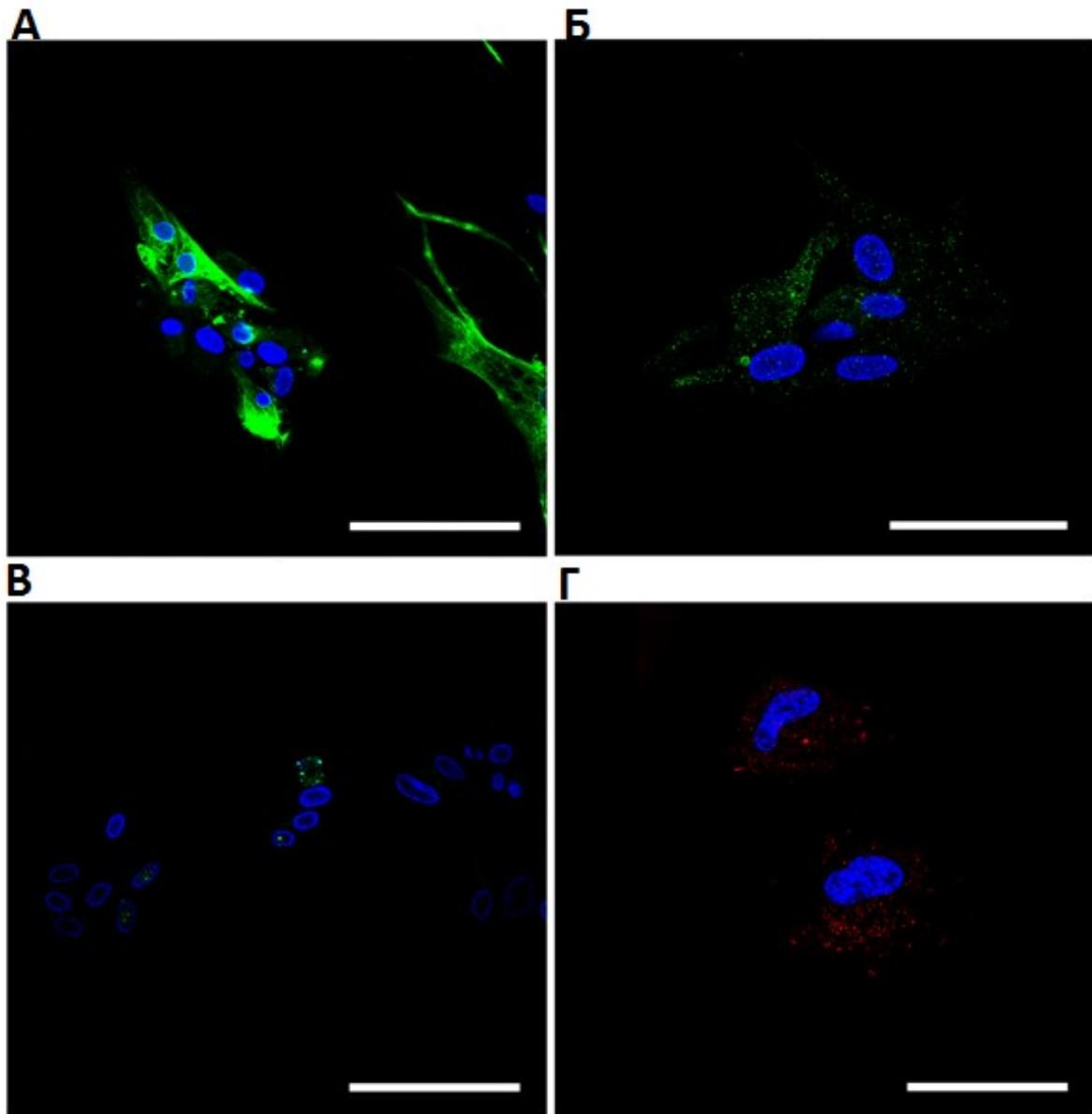


Рисунок 12 – Первичная культура клеток буккального эпителия (КБЭ) (конфокальная микроскопия, 100  $\mu\text{m}$ ): А – экспрессия виментина КБЭ; Б – экспрессия интегрина  $\beta 1$ КБЭ; В – активная пролиферация КБЭ (ki-67); Г – наночастицы в цитоплазме КБЭ

Культивируемые клетки буккального эпителия были посеяны на не контактирующий с мочой слой скаффолда, состоящего из ПЛГ. Культура клеток адгезировала на поверхность скаффолда, а через трое суток, после окончания инкубации, тканеинженерная конструкция на основе ПЛК+ПЛГ, содержащая КБЭ, была готова к имплантации модельным животным группы № 2. Наблюдение за культивированием и адгезией клеток осуществлялось с использованием инвертированной микроскопии.

Подводя итог, можно заключить, что синтезированные скаффолды на основе ПЛ+ПК и ПЛК+ПЛГ позволяют мезенхимным стволовым клеткам и клеткам буккального эпителия сохранять жизнеспособность и пролиферировать на их поверхности, что указывает на нетоксичность данных продуктов.

### 3.2.2. Оценка длительности операций

Учитывая малое количество наблюдений ( $n=4$ ) в группе “буккальной пластики”, для сравнения продолжительности операции при межгрупповом сравнении использовался критерий Краскала-Уоллеса (рис. 13).

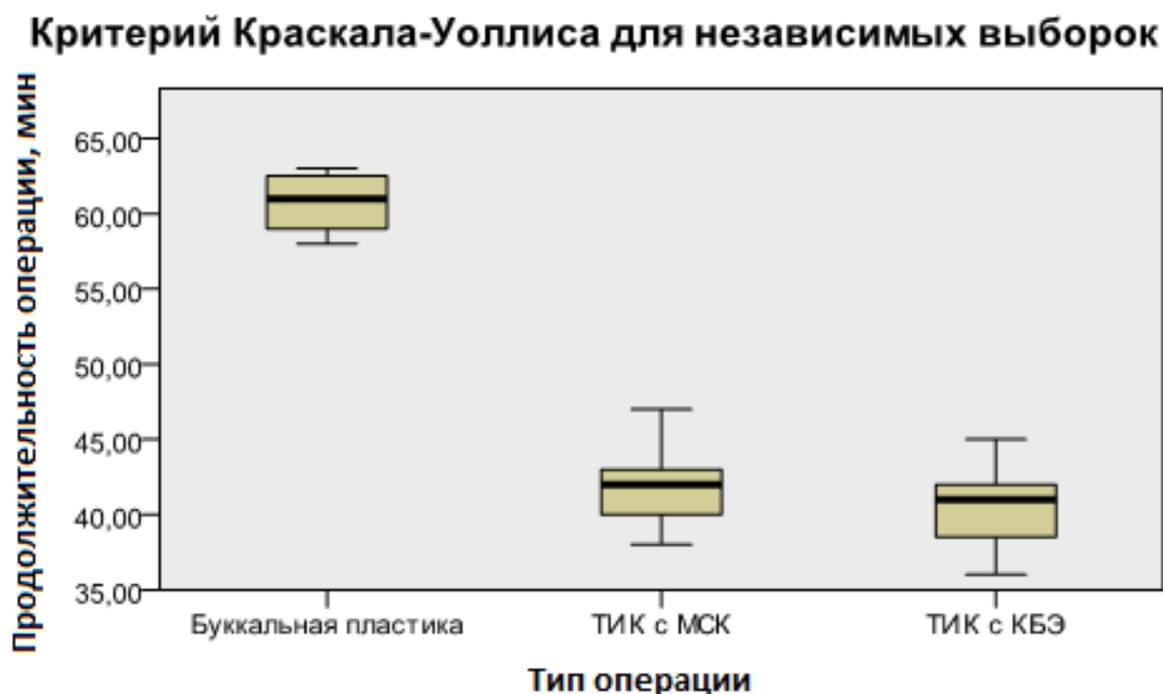


Рисунок 13 – Длительность операций в разных группах наблюдения

Продолжительность операции в группе № 3, которым была выполнена буккальная пластика статистически значимо было больше, чем в группах № 1 и № 2, в которых были использованы изучаемые тканеинженерные конструкции ( $p=0,004$ ).

### 3.2.3. Оценка динамики массы тела

Все животные удовлетворительно перенесли имплантацию ТИК в сформированный дефект стенки уретры. Отклонений в общем состоянии не

наблюдалось. Однако, у двух кроликов группы № 2 через 2 недели после операции были выявлены уретро-кожные свищи.

Для исключения в группах катаболического синдрома, после хирургического вмешательства в день аутопсии проведено повторное взвешивание животных.

Динамика изменения средней массы тела животных в группах по типам ТИК представлена на рисунках 14, 15 и 16.

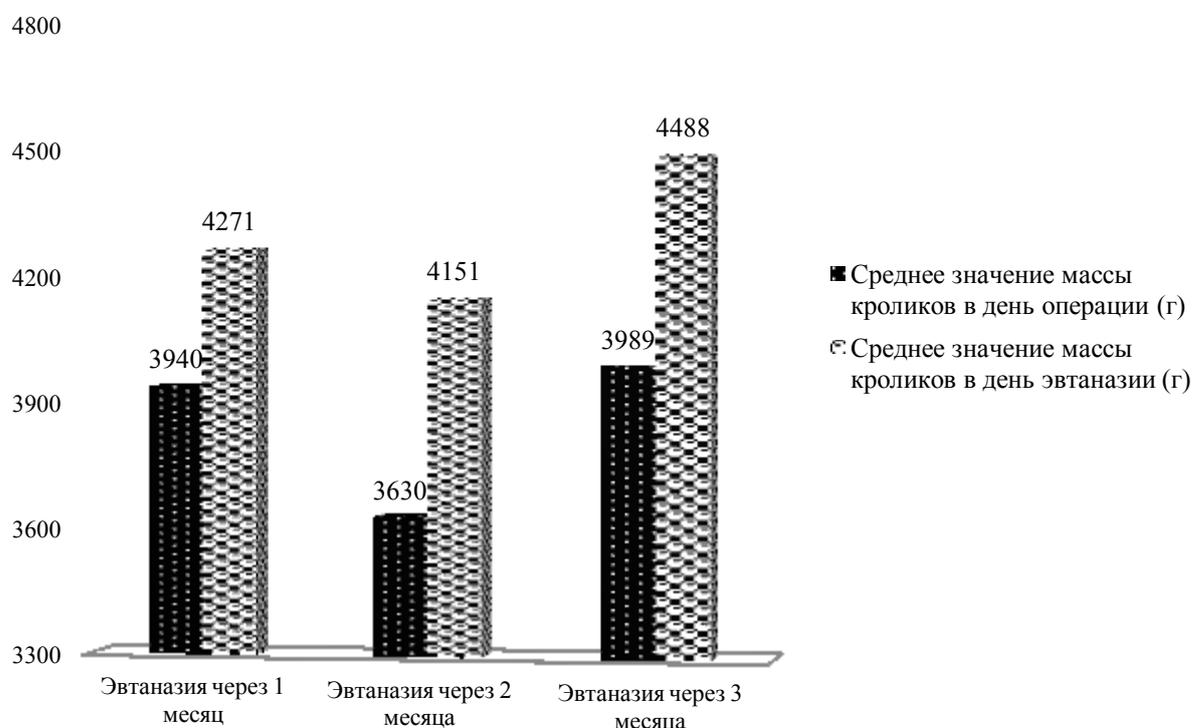


Рисунок 14 – Динамика массы тела животных группы № 1

Как следует из диаграммы, у всех животных группы №1, которым была выполнена имплантация ТИК, содержащая МСК, в послеоперационном периоде от 1 до 3 месяцев регистрировали увеличение массы тела.

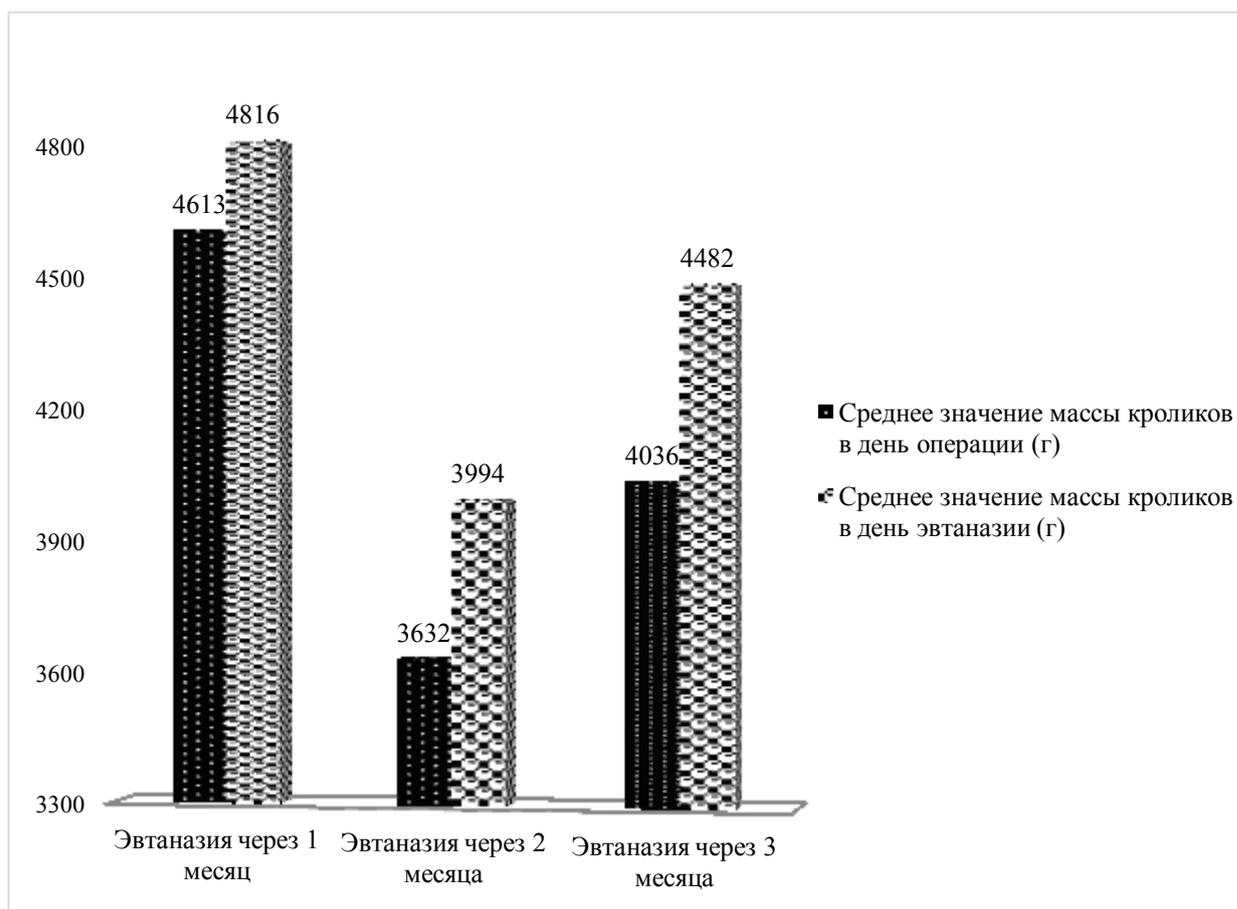


Рисунок 15 – Динамика массы тела животных в группе № 2

В группе № 2 (имплантация ТИК с клетками буккального эпителия) все кролики так же, как и животные группы № 1, в течение трех месяцев прибавляли в массе.

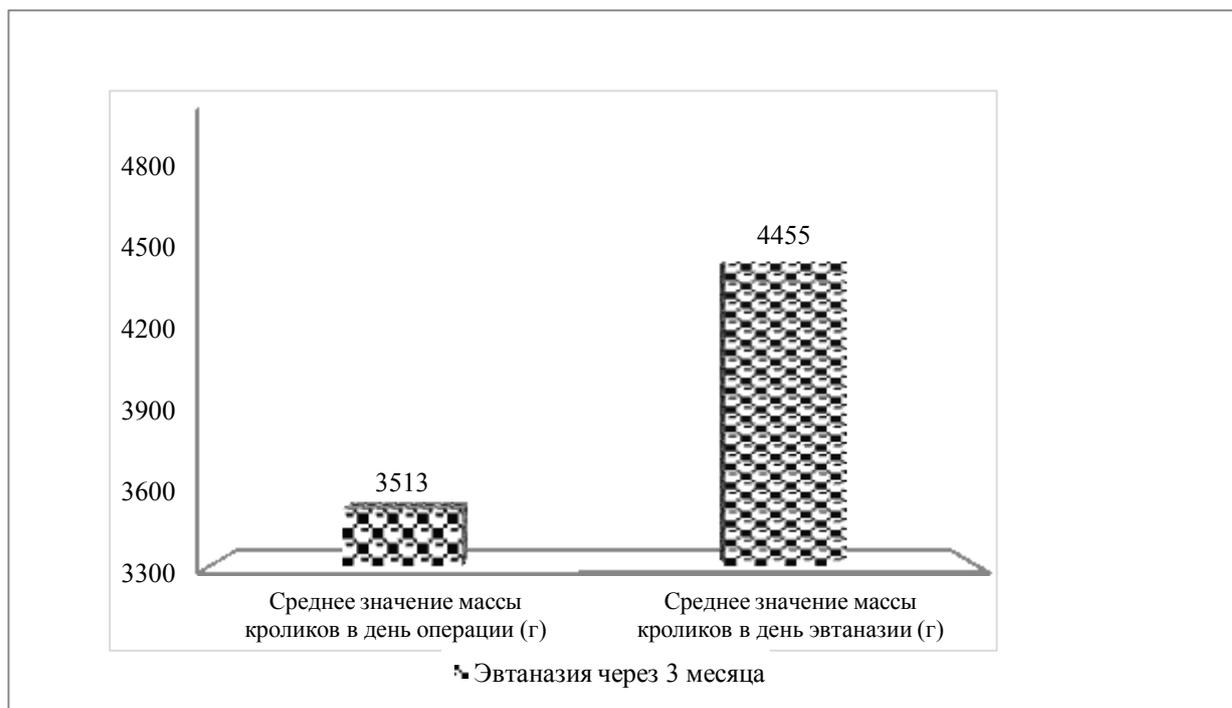


Рисунок 16 – Динамика массы тела животных в группе № 3

В группе № 3, где была выполнена буккальная пластика уретры, несмотря на более длительное и травматичное хирургическое вмешательство, через три месяца у животных отмечалась значительная прибавка в массе.

Полученные результаты демонстрируют, что использование изучаемых ТИК и буккального графта вероятно не приводит к развитию катаболического синдрома.

#### 3.2.4. Результаты уретрографии

Для оценки состояния уретры в послеоперационном периоде всем кроликам после эвтаназии была выполнена ретроградная уретрография (рис. 17). У животных всех трех групп проходимость уретры была сохранена.



Рисунок 17 – Ретроградные уретрограммы: А – просвет уретры сохранен, Б – экстравазация контрастного вещества за пределы просвета уретры

Уретрограммы демонстрируют полную проходимость уретры, сужений и дивертикулов не выявлено (рис. 17 а, б). У двух кроликов, у которых ранее был диагностирован уретро-кожный свищ (группа № 2), визуализировалась экстравазация контрастного вещества за пределы просвета уретры (рис. 17 б).

Таким образом, независимо от типа имплантированного для заместительной уретропластики материала, один из самых важных показателей – просвет уретры – был сохранен.

### **3.2.5. Макроскопическая оценка зоны имплантации**

После подготовки макропрепаратов уретры произведена оценка зоны имплантации, результаты которой представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Макроскопическая характеристика зоны имплантации

Группы (кол-во)	Сроки аутопсии (мес.)	Визуализация зоны имплантации (абс, %)	Отторжение имплантата (абс, %)	Визуализация имплантата (абс, %)	Дивертикул (абс, %)	Сужение (абс, %)	Свищ (абс, %)
№1 (9)	1	3 (100)	0	0	0	0	0
	2	3 (100)	0	0	0	0	0
	3	2 (66,7)	0	0	0	0	0
№2 (15)	1	3 (100)	0	0	0	0	0
	2	3 (100)	0	0	0	0	0
	3	8 (88,9)	0	0	0	0	2 (22,2)
№3 (4)	3	4 (100)	0	4 (100)	0	0	0

Данные, представленные в таблице, демонстрируют, что к третьему месяцу наблюдения у части животных, которым имплантировали тканеинженерные конструкции, происходило полное восстановление ткани уретры. Так, зону имплантации можно было визуализировать лишь у 66,7% и 88,9% экспериментальных животных групп 1 и 2 соответственно.

При макроскопической оценке зоны имплантации ни в одной группе не было выявлено отторжения имплантата, сужений и дивертикулов уретры (рис. 18).

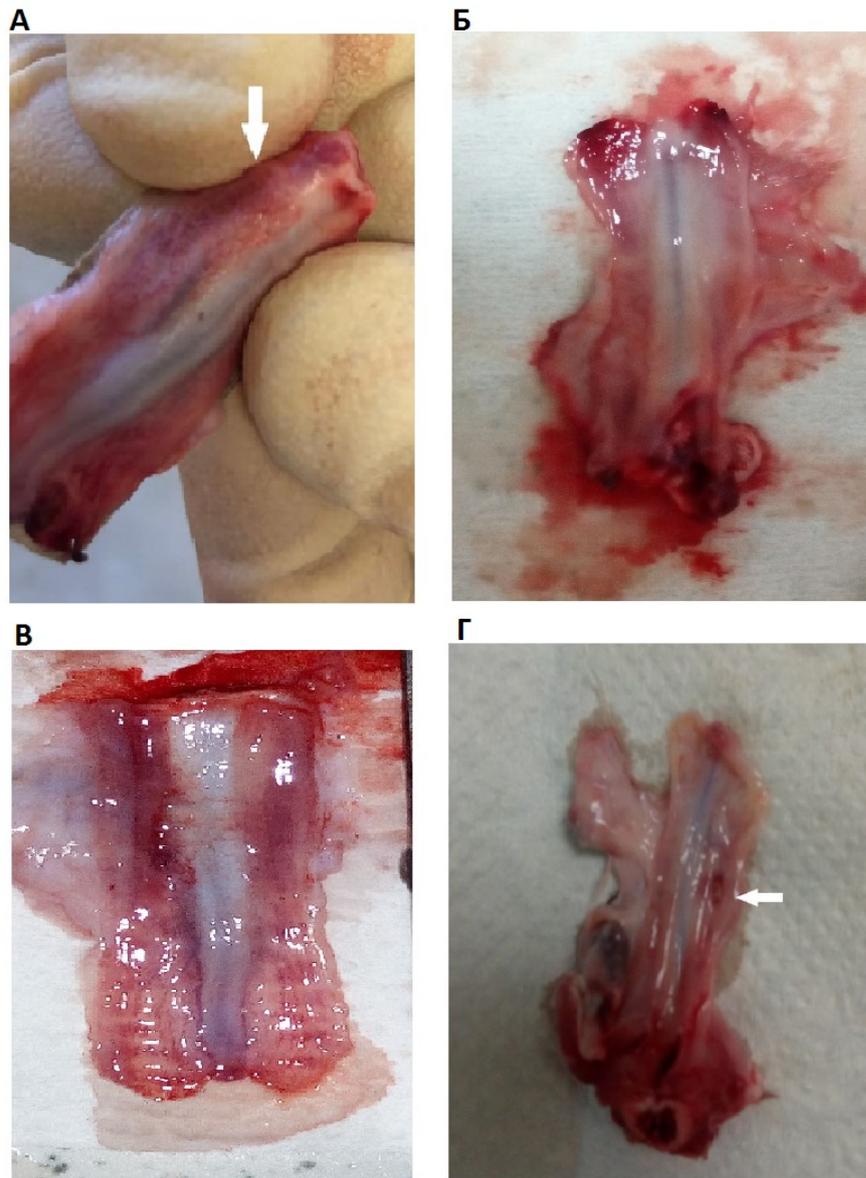


Рисунок 18 – Макропрепараты уретры кролика: А – визуализация зоны имплантации ТИК (группа № 1); Б – зона имплантации ТИК не визуализирована (группа № 2); В – визуализация буккального графта; Г – уретро-кожный свищ

В 1 и 2 группах через 1 и 2 месяца после хирургического вмешательства у всех кроликов визуализировали зону имплантации (рис. 18А). Однако через 3 месяца в 1 и 2 группах зона имплантации визуализирована в 66,7% и 88,9% соответственно (рис. 18Б). Буккальный графт отчетливо визуализировался у всех животных (рис. 18В). Два ранее описанных уретро-кожных свища выявлены в группе кроликов, которым были имплантированы ТИК на основе ПЛГ+ПЛК с клетками буккального эпителия (рис. 18Г). При статистическом анализе,

значимой корреляции между имплантированными материалами и возможностью формирования свищевого хода не выявлено (уровень значимости  $p$  точного критерия Фишера при межгрупповом сравнении  $> 0,05$ ).

### **3.2.6. Результаты морфологических и морфометрических исследований**

Для корректного изучения морфологии и проведения морфометрии зоны имплантации уретры на первом этапе проведены исследования интактной уретры у 3 кроликов. При морфологическом исследовании стенка уретры представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизирована и образована уротелием (переходным эпителием) и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $46,7 \pm 2,4$  мкм (табл. 3, рис. 19), толщина слизистой оболочки составляла  $276,7 \pm 13,2$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм их определялось  $10,3 \pm 0,2$ , а диаметр их просвета составлял  $28,3 \pm 2,4$  мкм (табл. 3). Мышечная оболочка представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее составляла  $2666,7 \pm 170,6$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки не определялся –  $0,0 \pm 0,0$  баллов, воспалительная инфильтрация отсутствовала.

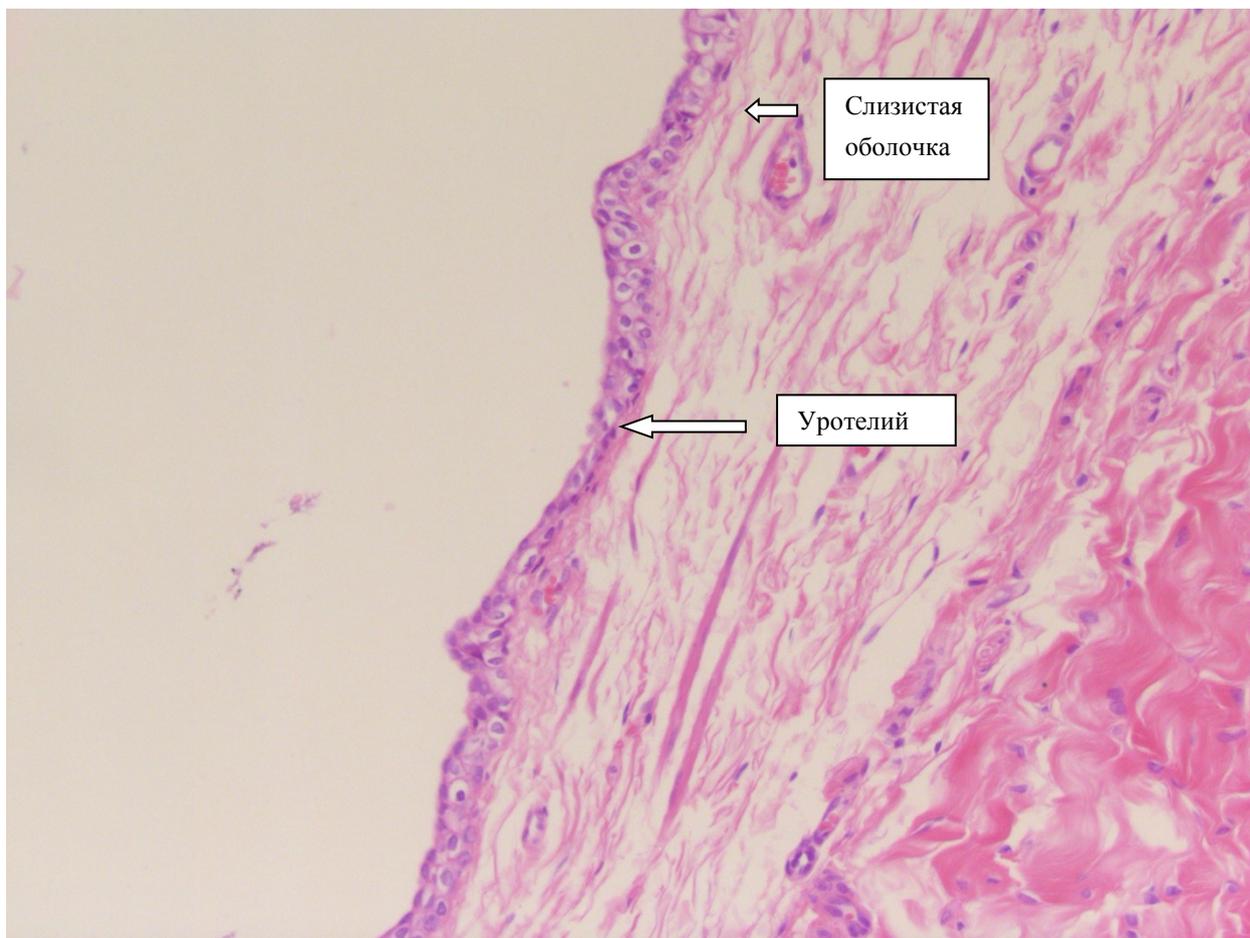


Рисунок 19 – Интактная уретра. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

В группе №1 (имплантация скаффолда на основе ПЛ+ПК с МСК) кролики в зависимости от сроков выведения через 1, 2 и 3 месяца после имплантации ТИК были разделены на три подгруппы соответственно.

При выведении животных группы № 1 из эксперимента через 1 месяц (подгруппа № 1) получены следующие данные. Стенка уретры представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизирована, складчатая и образована уротелием на протяжении 70%, на протяжении 30% многослойным плоским эпителием, а также на всем протяжении собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $46,3 \pm 3,1$  (табл. 3, рис. 20), толщина слизистой оболочки была увеличена и составляла  $616,7 \pm 62,6$  мкм, что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Внутриэпителиально наблюдались мелкие фокусы инфильтрации

нейтрофильными лейкоцитами и уротелия, и многослойного плоского эпителия. При подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не увеличено и составляло  $10,0 \pm 0,4$ . Диаметр просвета сосудов составлял  $30,0 \pm 2,9$  мкм (табл. 3), что не имело различий по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2566,7 \pm 155,2$  мкм (табл. 3). Фиброза слизистой оболочки не выявлено –  $0,0 \pm 0,0$  баллов. В собственной пластинке слизистой под эпителием имелась умеренно выраженная и выраженная лимфо-плазмоцитарная и гистиоцитарная инфильтрация (рис. 20), очаговая нейтрофильная лейкоцитарная инфильтрация от слабой до выраженной, фокусы формирования грануляционной ткани в пластинке слизистой.

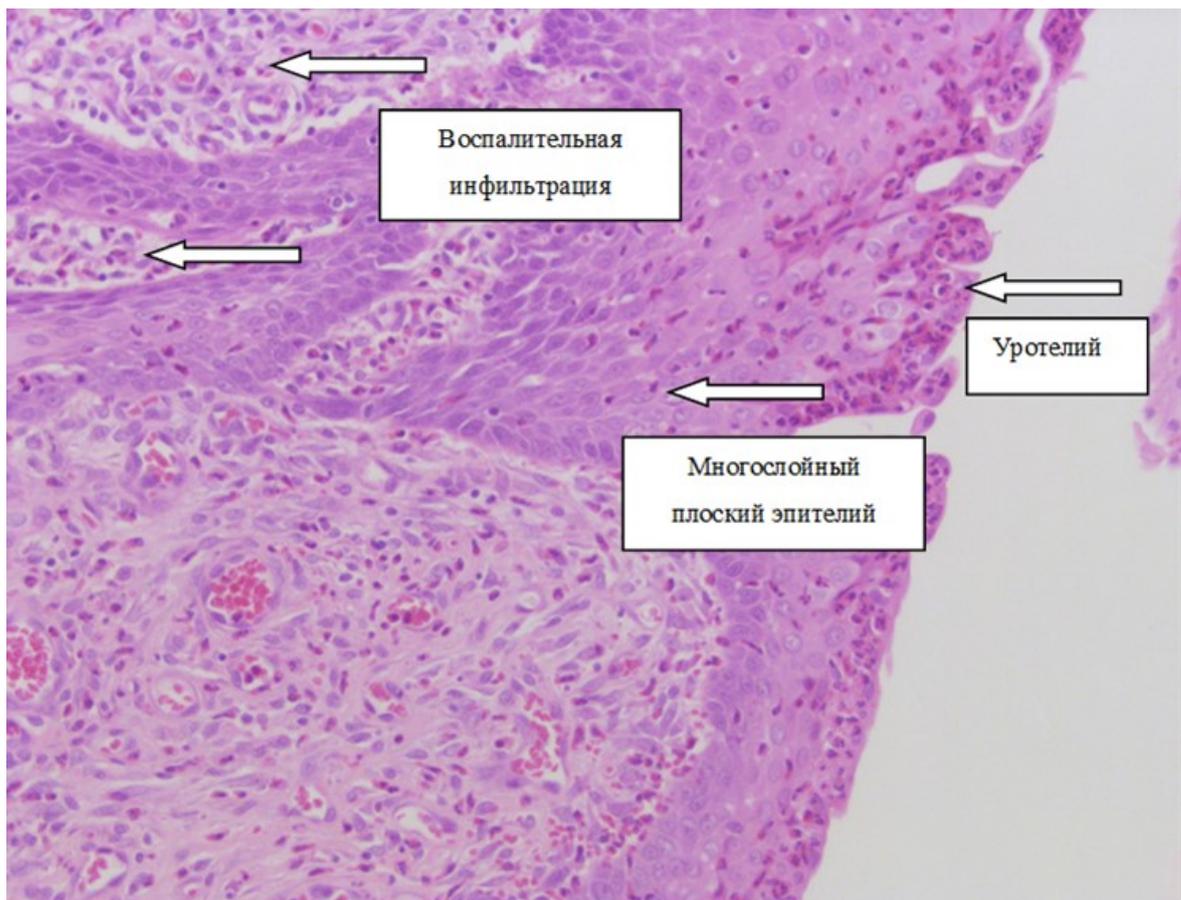


Рисунок 20 – Уретра кролика группы № 1, 1 мес. Эпителизированная поверхность многослойным плоским эпителием и уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Через 2 месяца после имплантации ТИК в группе № 1 (подгруппа № 2), стенка уретры представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизирована, без повреждения и образована уротелием (переходным эпителием) и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $40,0 \pm 5,4$  (табл. 3, рис. 21), толщина слизистой оболочки составляла  $445,7 \pm 31,2$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не увеличено и составляло  $10,7 \pm 0,2$ . Диаметр просвета сосудов не увеличен и составлял  $32,3 \pm 1,2$  мкм (табл. 3), что не имело достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2308,2 \pm 127,4$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки, как и в прошлой подгруппе, не определялся –  $0,0 \pm 0,0$  баллов, отсутствовала и воспалительная инфильтрация.

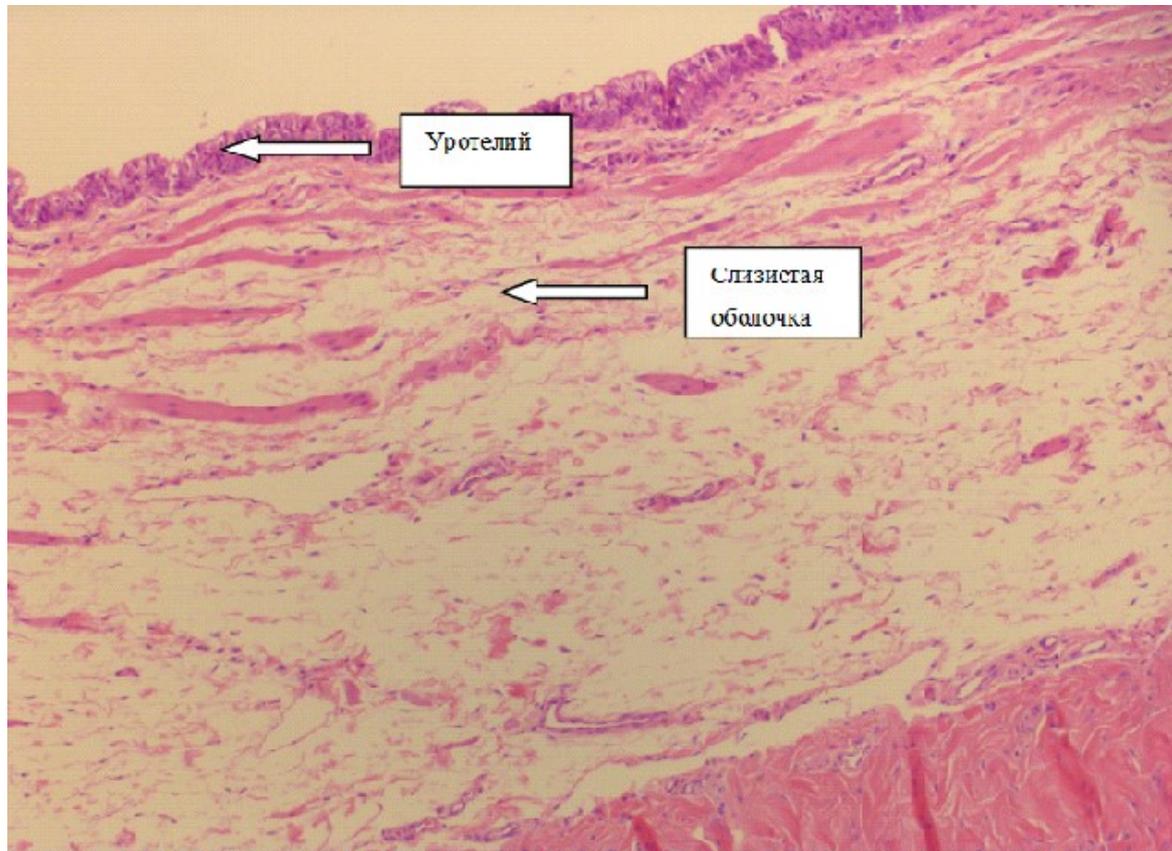


Рисунок 21 – Уретра кролика группы № 1, 2 мес. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

На сроке 3 месяца после хирургического вмешательства (группа № 1, подгруппа № 3) стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием (переходным эпителием) и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия была снижена и составляла  $30,0 \pm 2,0$  (табл. 3, рис. 22), что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Толщина слизистой оболочки составляла  $366,7 \pm 23,7$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их было не увеличено и составляло  $8,0 \pm 0,8$ . Диаметр просвета сосудов составлял  $35,0 \pm 5,4$  мкм (табл. 3), что не имело достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2533,3 \pm 62,6$  мкм (табл. 3). Воспалительной инфильтрации и фиброза тканей не определялось.

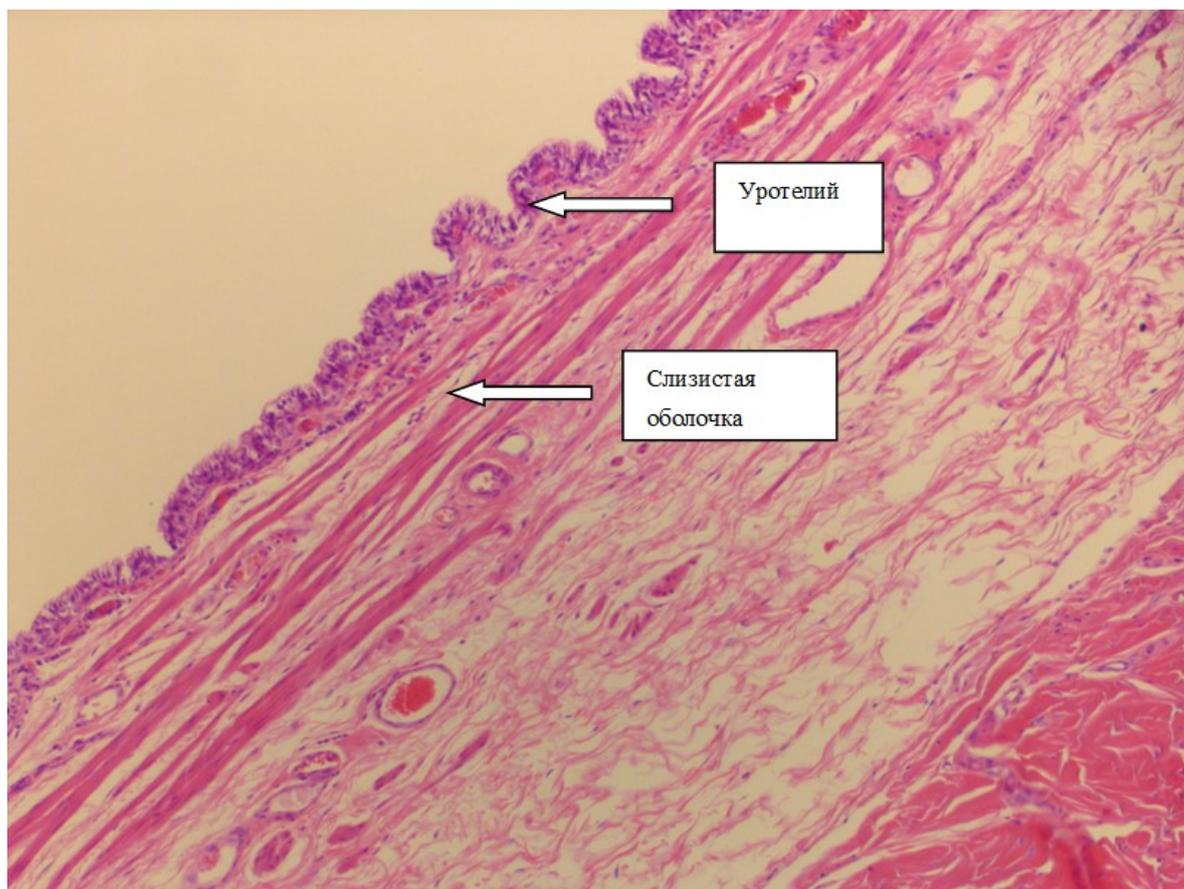


Рисунок 22 – Уретра кролика группы № 1, 3 мес. Эпителизированная поверхность уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

Кролики группы № 2 (ТИК на основе ПЛГ+ПЛК с КБЭ) так же были разделены на 3 подгруппы согласно срокам выведения – 1, 2 и 3 месяца.

Через 1 месяц после операции (группа № 2, подгруппа № 1) стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием с чередованием с мелкими фокусами многослойного плоского эпителия и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $43,8 \pm 1,0$  (табл. 3, рис. 23), толщина слизистой оболочки была значительно увеличена и составляла  $750,0 \pm 20,5$  мкм, что имело достоверные различия ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с группой интактных кроликов. Внутриэпителиально наблюдались мелкие фокусы инфильтрации нейтрофильными лейкоцитами. При подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их было достоверно

увеличено и составляло  $20,3 \pm 1,8$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $28,3 \pm 1,2$  мкм (табл. 3), что не имело достоверных различий ( $p \geq 0,05$ ) по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2366,7 \pm 118,3$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки отсутствовал, что составляло  $0,0 \pm 0,0$  баллов, наблюдалась слабо выраженная и очаговая умеренно выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками.

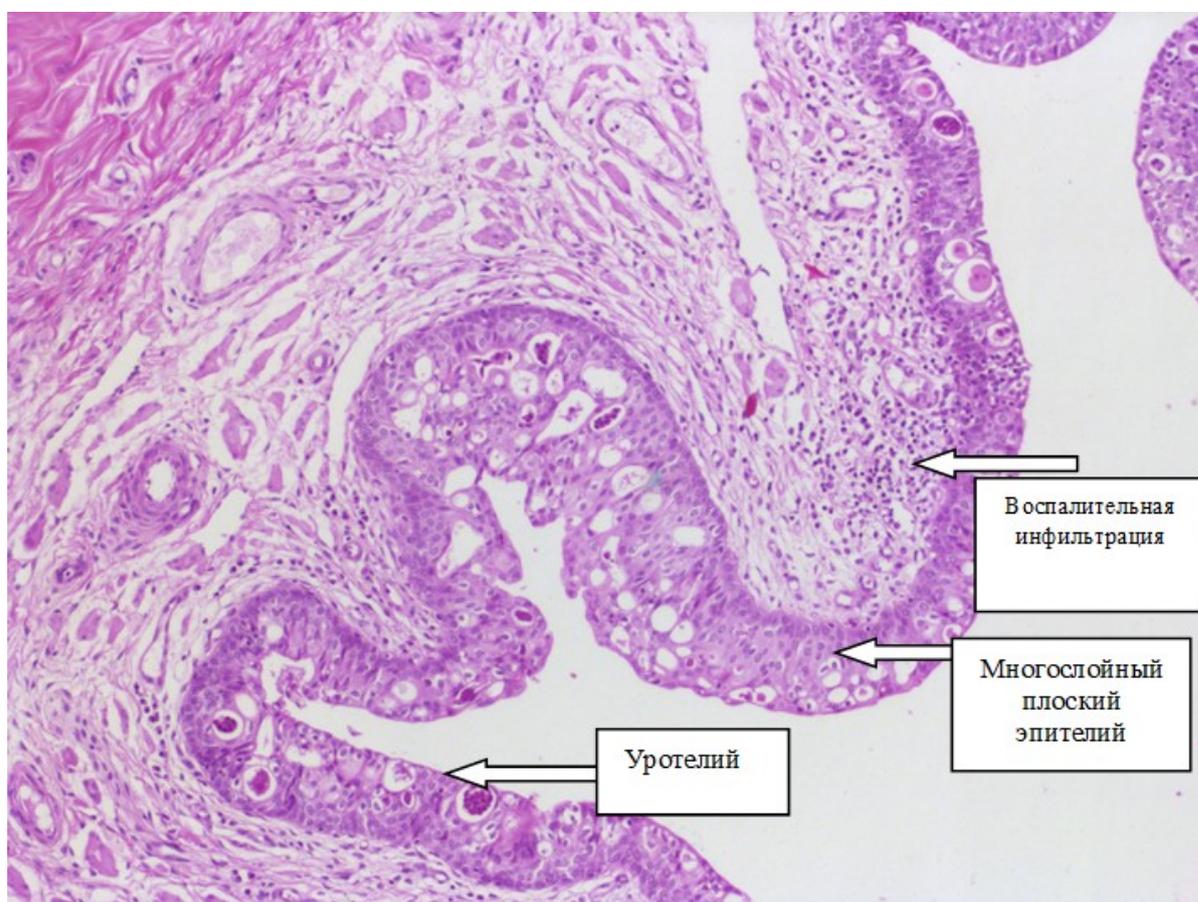


Рисунок 23 – Уретра кролика группы № 2, 1мес. Эпителизованная поверхность многослойным плоским эпителием и уротелием, умеренно выраженная воспалительная инфильтрация слизистой. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Стенка уретры у кроликов через 2 месяца после имплантации ТИК (группа № 2, подгруппа № 2) была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, складчатая и образована уротелием на протяжении 90-95%, на протяжении 5-10% – с фокусами плоскоклеточной дифференцировки уротелия, а также на всем протяжении собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $35,0 \pm 4,3$  (табл. 3, рис. 24), толщина слизистой оболочки составляла  $466,7 \pm 23,7$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их было достоверно увеличено и составляло  $17,3 \pm 0,2$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $41,7 \pm 3,3$  мкм (табл. 3), что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2216,7 \pm 112,9$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки был слабо выражен и составлял  $1,3 \pm 0,2$  баллов, наблюдалась слабо и умеренно выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами, плазматическими клетками, слабо выраженная инфильтрация нейтрофильными лейкоцитами.



Рисунок 24 – Уретра кролика группы № 2, 2 мес. Эпителизированная поверхность многослойным плоским эпителием и уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Через 3 месяца (группа № 2, подгруппа № 3) стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $41,0 \pm 2,7$  (табл. 3, рис. 25), толщина слизистой оболочки составляла  $433,3 \pm 62,6$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не было увеличено и составляло  $11,3 \pm 1,0$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $36,7 \pm 2,4$  мкм (табл. 3), что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $1666,7 \pm 118,3$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки был слабо

выражен и составлял  $1,0 \pm 0,0$  баллов, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками.

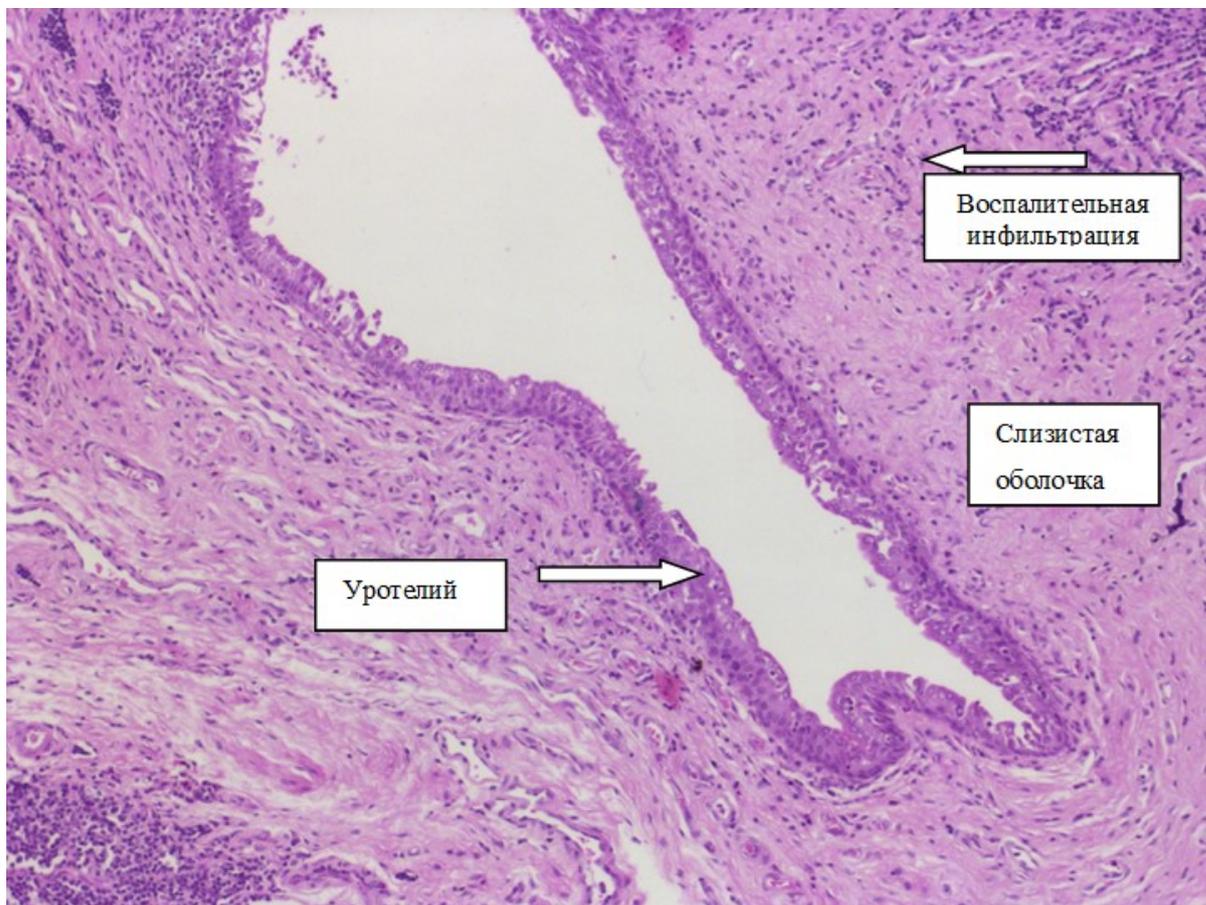


Рисунок 25 – Уретра кролика группы № 2, 3 мес. Эпителизированная поверхность уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Кроликам группы № 3 выполняли буккальную пластику уретры, через 3 месяца производилась оценка результатов хирургического вмешательства. Стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием и фокусом многослойного плоского эпителия в виде мелкого фиброзного полипа, собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. В одном случае под уротелием имелась выраженная гистиоцитарная и нейтрофильная лейкоцитарная инфильтрация с формированием мелкого абсцесса. Толщина переходного эпителия составляла  $46,3 \pm 2,7$  (табл. 3, рис. 26), толщина слизистой оболочки

составляла  $583,3 \pm 11,8$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не было увеличено и составляло  $10,7 \pm 0,5$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $45,0 \pm 2,0$  мкм (табл. 3), что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2016,7 \pm 72,0$  мкм (табл. 3). Фиброз слизистой оболочки был умеренно выражен и составлял  $2,0 \pm 0,4$  балла, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками.

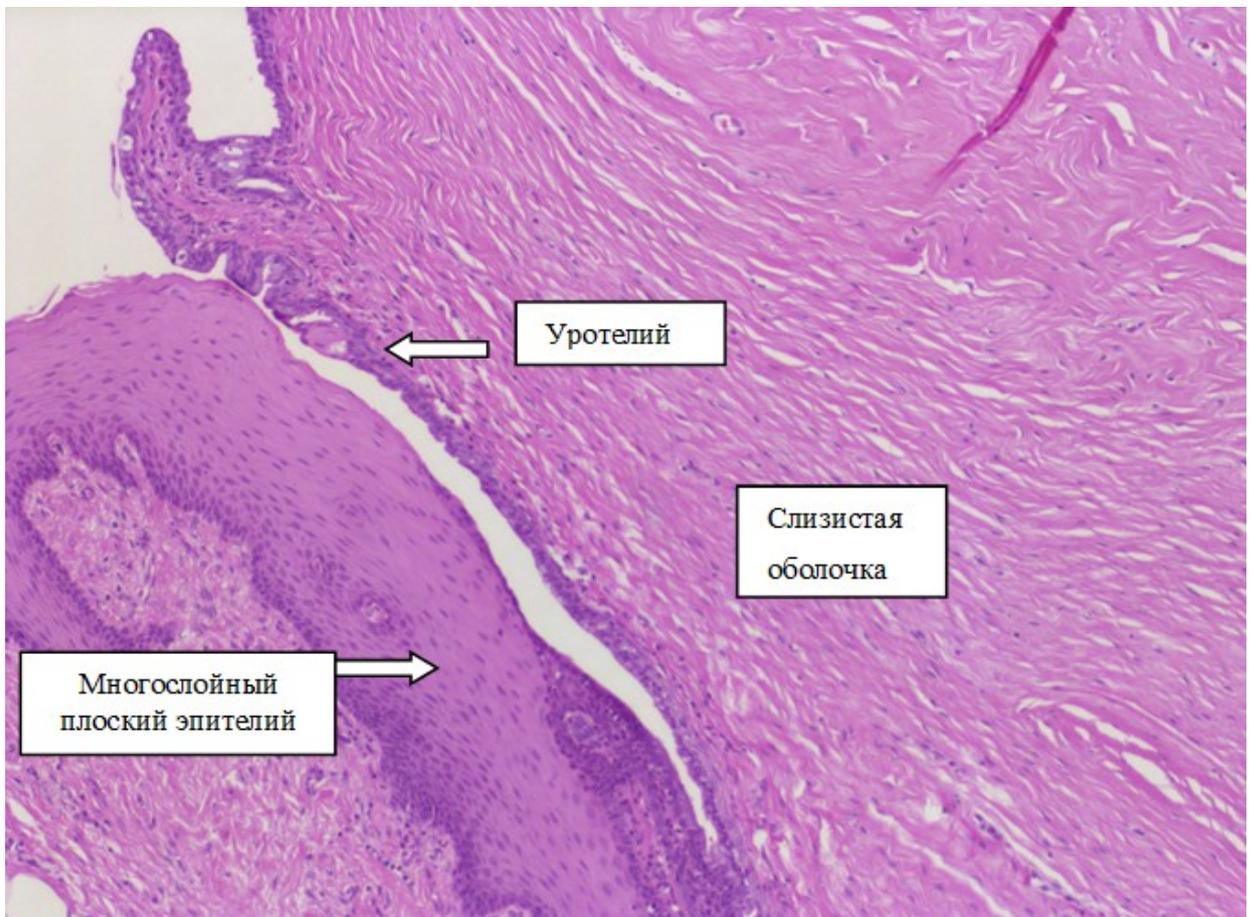


Рисунок 26 – Уретра кролика группы № 3, 3 мес. Эпителизированная поверхность многослойным плоским эпителием и уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$

Таблица 3 – Морфометрическая характеристика стенки уретры кроликов

Группа/показатель		Толщина эпителия (мкм)	Толщина слизистой оболочки (мкм)	Количество сосудов в слизистой оболочке на 1 кв. мм	Диаметр сосудов слизистой оболочки (мкм)	Толщина мышечной оболочки (мкм)	Степень фиброза (баллы)
Интактная уретра		46,7±2,4	276,7±13,2	10,3±0,2	28,3±2,4	2666,7±170,6	0,0±0,0
Группа №1 (ТИК МСК)	Через 1 мес.	46,3±3,1	616,7±62,*	10,0±0,4	30,0±2,9	2556,7±155,2	0,0±0,0
	Через 2 мес.	40,0±5,4	445,7±31,2*	10,7±0,2	32,3±1,2	2308,2±127,4	0,0±0,0
	Через 3 мес.	30,0±2,0	366,7±23,7	8,0±0,8	35,0±5,4	2533,3±62,6	0,0±0,0
Группа №2 (ТИК КБЭ)	Через 1 мес.	43,8±1,0	750,0±20,5*	20,3±1,8*	28,3±1,2	2366,7±118,3	0,0±0,0
	Через 2 мес.	35,0±4,3	466,7±23,7*	17,3±0,2*	41,7±3,3*	2216,7±112,9	1,3±0,2*
	Через 3 мес.	41,0±2,7	433,3±62,6*	11,3±1,0	41,0±3,0*	1666,7±118,3	1,0±0,0*
Группа №3 (буккальная пластика)	Через 3 мес.	46,3±2,0	583,3±11,8*	10,7±0,5	45,0±2,0*	2016,7±72,0	2,0±0,4*

Примечание: \* – различия достоверны по сравнению с группой интактных кроликов  $p \leq 0,05$

Таблица демонстрирует, что в конце срока наблюдения (через 3 месяца) наиболее близкие к интактной уретре морфометрические показатели зарегистрированы в 1 группе экспериментальных животных, которым имплантировалась МСК-содержащая тканеинженерная конструкция.

Таким образом, в исследовании показано:

1. В группах №1 и №2, в которых кроликам выполнена имплантация ТИК, содержащих МСК и КБЭ, дифференцировка замещающих дефект клеток шла в направлении многослойного плоского эпителия и уротелия. К третьему

месяцу у кроликов обеих групп наблюдалась дифференцировка в сторону уротелия («феномен пластичности»);

2. В группе № 2 (имплантация ТИК с КБЭ) в течении репаративного процесса на 1-ом и 2-ом месяце имела место выраженная васкуляризация слизистой оболочки уретры за счет неоангиогенеза, что, по-видимому, способствовало более быстрым темпам репарации дефекта эпителия;

3. В группе № 1 (имплантация ТИК с МСК) фиброз слизистой оболочки на всех этапах не определялся, наибольшая степень фиброза отмечена в группе № 3 (буккальная пластика).

### **3.2.7. Результаты конфокальной микроскопии криосрезов**

С целью выявления присутствия в биоптате клеток, меченных наночастицами, были приготовлены криосрезы. Производилась оценка SPION-меченных МСК в стенке мочеиспускательного канала на разных сроках после хирургического вмешательства (кролики группы 1). Интактная уретра использовалась в качестве контроля (рис. 27). Ядра окрашивали DAPI (синий) и выявляли с использованием диодного лазера (405 нм). SPIONs визуализировались как красное свечение при отраженном лазерном сканировании (504 нм). Дополнительно препараты были окрашены специфическими антителами (цитокератин AE1 / AE3) с вторичными антителами, мечеными FITC (зеленый) (рисунок 27, уротелий) и антителами против  $\alpha$ SMA (рис. 27, мышечный слой).

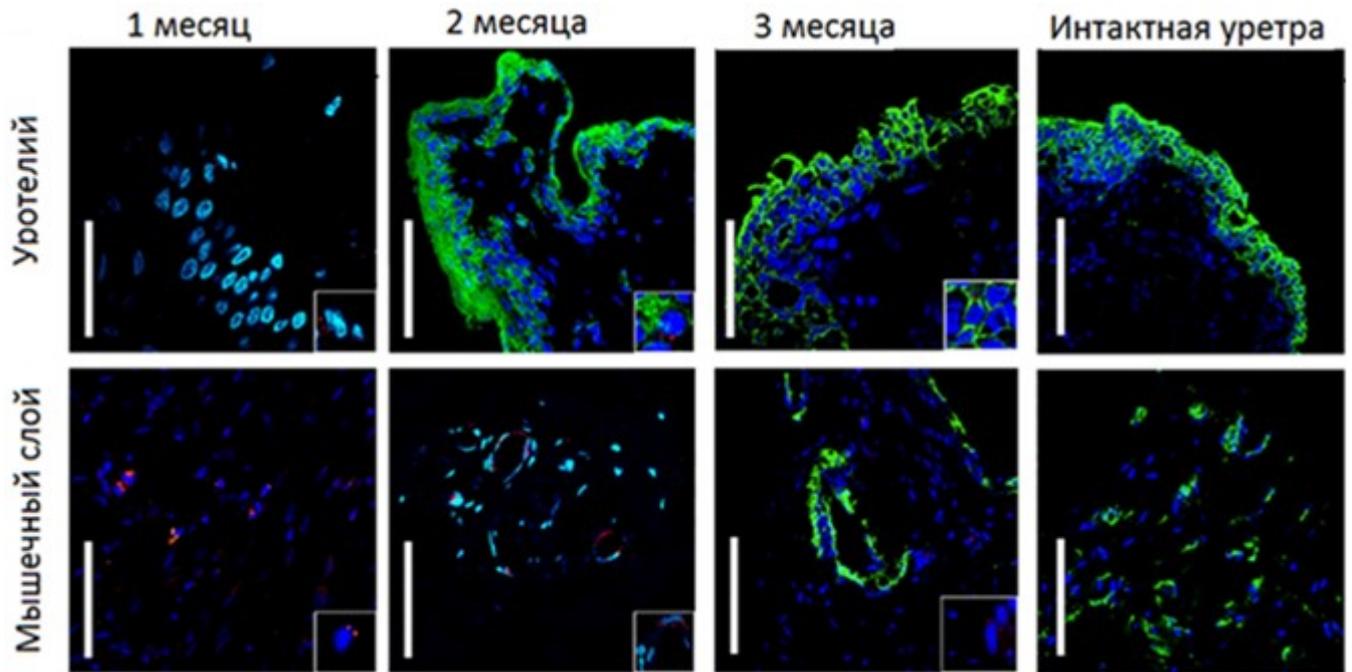


Рисунок 27 – Конфокальная микроскопия, визуализация наночастиц в слизистом слое на разных сроках после имплантации ТИК с МСК, 100µm

Рисунок 27 показывает сококализацию меченных наночастицами МСК с окрашенным цитокератином АЕ1 / АЕ3 уротелием, что доказывает возможность дифференцировки МСК в неуротелиальные клетки. В мышечном слое обнаружено присутствие меченных наночастицами МСК, однако сококализации их с окрашенными антителами против  $\alpha$ SMA гладкомышечными клетками не наблюдалось. Такое расположение меченных клеток свидетельствует о том, что МСК, входящие в состав тканеинженерной конструкции, имплантированной в уретру, принимают участие в формировании мышечного слоя, но не подвергаются дифференцировке в гладкомышечном направлении.

Оценка присутствия в биоптате меченных наночастицами клеток буккального эпителия у животных 2 группы проводилась с использованием тех же методик, что и у животных 1 группы (рис. 28).

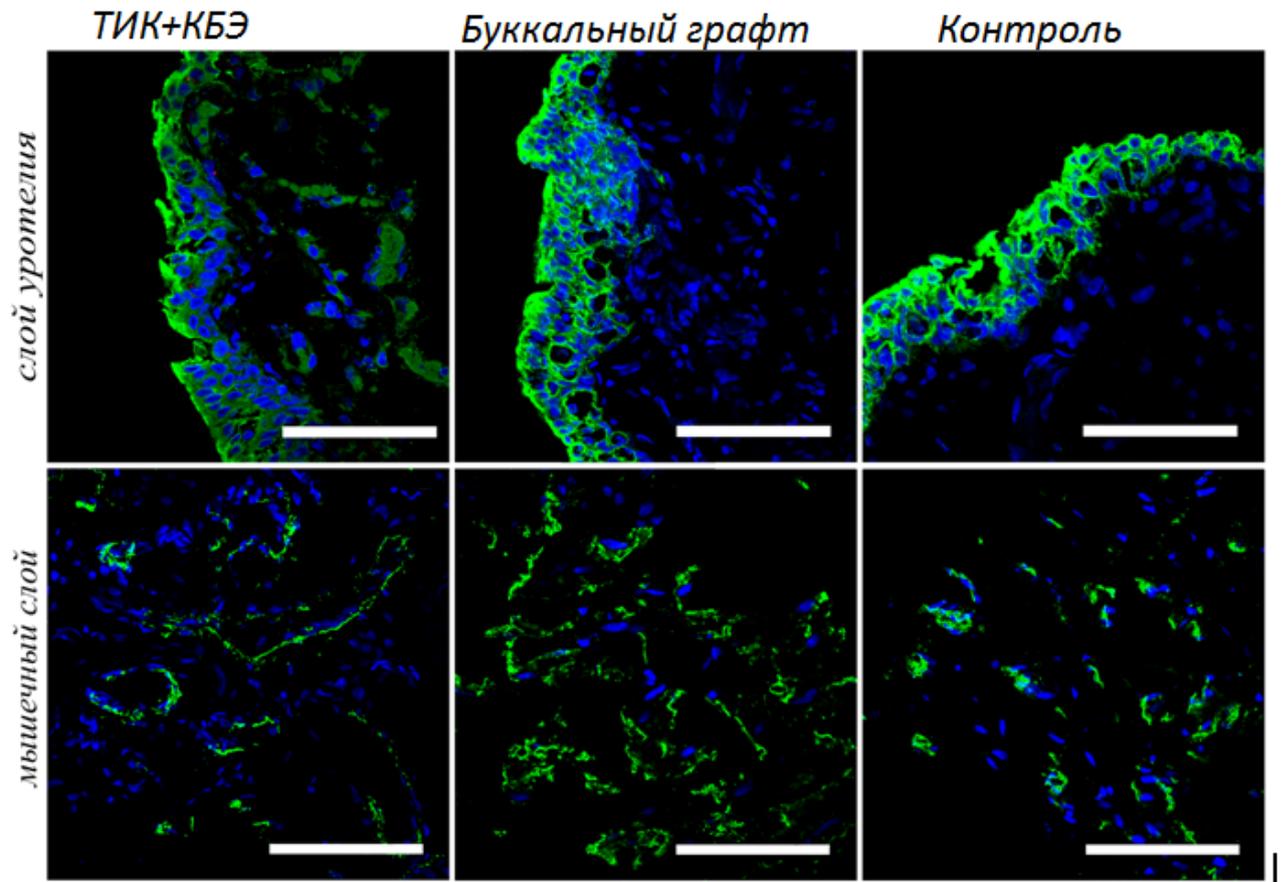


Рисунок 28 – Конфокальная микроскопия, визуализация наночастиц в слизистом слое через 12 недель после имплантации ТИК с КБЭ, 100µm

Солокализация окрашенных цитокератином АЕ1 / АЕ3 и содержащих наночастицы клеток буккального эпителия в группе 2 на сроке 12 недель также свидетельствует о возможной их дифференцировке в неуротелиальные клетки. Подобной солокализации в мышечном слое не обнаружено. В биоптатах группы №3 и в интактных тканях клеток, меченных наночастицами, не обнаружено.

Таким образом, полученные при конфокальной микроскопии данные убедительно показывают не только сохранение жизнеспособности клеток, используемых в составе тканеинженерных конструкций на протяжении 3 месяцев, но и приобретение ими свойств, характерных для уротелия.

## Заключение

Лечение больных со стриктурами и аномалиями мочеиспускательного канала остается сложной проблемой. При протяженных дефектах уретры, когда выполнить анастомотическую уретропластику не представляется возможным, используют различные варианты заместительной пластики за счет применения лоскутов и графтов. До сих пор буккальная пластика признается «золотым стандартом» при протяженных стриктурах уретры, обеспечивая до 90% удовлетворительных отдаленных результатов. Однако недостатками этого вида пластики являются осложнения в донорской зоне, составляющие от 16 до 32%, дефицит тканей для пластики, особенно при протяженных, рецидивных стриктурах, и увеличение времени операции в связи с необходимостью получения лоскута или трансплантата.

В последние десятилетия активно разрабатываются альтернативные материалы с использованием тканевой инженерии для заместительной уретропластики, целью которых является исключение перечисленных выше недостатков классических хирургических вмешательств.

В настоящее время изучается возможность использования в качестве трансплантата различных скаффолдов, заселенных аутологичными или аллогенными клетками, а также бесклеточных скаффолдов. В большинстве доклинических и клинических исследований, посвященных тканеинженерной реконструкции уретры, наиболее широко представлено использование бесклеточных скаффолдов. Однако, многие авторы отмечают существенное преимущество использования для уретропластики ТИК, заселенных клетками, в сравнении с бесклеточными ТИК. В единичных работах применялись синтетические скаффолды, заселенные аутологичным уротелием. В связи с тем, что на данный момент слизистая ротовой полости является оптимальным материалом для уретропластики, включение клеток буккального эпителия (КБЭ) в состав ТИК является обоснованным. Кроме того, применение ТИК с КБЭ

показало свою эффективность в ряде работ (Bhargava S. et al., 2008; Mikami H. et al, 2012; Ram-Liebig G. et al., 2017). На сегодняшний день самым крупным является многоцентровое, проспективное исследование, включившее 98 пациентов. В данной работе применялся тканеинженерный аутологичный буккальный графт. Положительные результаты уретропластики оценивались через год и разнились от 0% до 85,7% (среднее значение 67,3%) (Ram-Liebig G. et al., 2017).

Такие противоречивые данные указывают на необходимость дальнейших исследований в этой области.

Целью настоящей работы являлось экспериментальное обоснование возможности применения тканеинженерных конструкций для замещения дефектов уретры. Для реализации поставленной цели использованы лабораторные, инструментальные, научные аналитические и статистические методы исследования. По дизайну исследование является экспериментальным, проспективным, базируется на изучении результатов хирургического вмешательства на 41 лабораторном животном.

Исследование состоит из двух этапов:

- на первом этапе *in vitro* произведена оценка физико-химических свойств, биологической совместимости исследуемых скаффолдов и изучение их биодegradации после подкожной имплантации крысам линии Wistar (n=10);
- на втором этапе созданные тканеинженерные конструкции имплантировали на модели острой травмы уретры экспериментальным животным (кроликам). В данный этап исследования включены половозрелые кролики-самцы породы «шиншилла» (n=31) массой тела  $3919,1 \pm 378,01$  г (3366-5145 г).

Для реализации поставленной цели в исследовании были разработаны и приготовлены два типа скаффолдов. Для мезенхимных стволовых клеток

использовали пористую матрицу, состоящую из поли- (D, L) -лактида и поликапролактона. Для клеток буккального эпителия был изготовлен двухслойный скаффолд на основе полигидроксиэфиров. Внутренний слой, который будет контактировать с мочой сформировали из поли-L-лактид-капролактона (70/30, h=3,8 дл/г, Purac). Сплошная и непроницаемая для жидкости структура обеспечивает барьерную функцию (от мочи) и механическую прочность всей конструкции. Второй слой, на который высеваются клетки, приготовлен на основе поли-L-лактид-гликолида (85/15, h=3,13 дл/г, Purac).

Для изучения физико-химических характеристик скаффолдов оценивались такие параметры, как прочность, удлинение при разрыве и модуль упругости. Кроме этого, учитывали такой параметр, как возможность наложения швов. Водопроницаемость определялась с использованием сканирующей электронной микроскопии – визуализировалась наружная структура скаффолда.

Изучение биодegradации скаффолдов произведено на 10 крысах-самцах линии Wistar. Подкожно крысам были имплантированы скаффолды ПЛ+ПК и ПЛК+ПЛГ.

Для реализации второго этапа кролики разделены на три группы в зависимости от используемого графта:

- в группу №1 вошли 9 кроликов, которым в уретру дорсо-латерально был имплантирован скаффолд на основе ПЛ+ПК с МСК;
- группу № 2 составили 15 кроликов, которым был имплантирован скаффолд на основе ПЛГ+ПЛК с КБЭ;
- в группу № 3 вошли 4 кролика, которым была выполнена буккальная пластика уретры.

Мезенхимные стволовые клетки получали из пунктата костного мозга подвздошной кости. Клетки буккального эпителия получали из биоптата

слизистой щеки кролика. Для выполнения буккальной пластики уретры у кролика брался трансплантат из слизистой щеки.

Результаты первого этапа исследования показали, что новые скаффолды на основе поли-L-лактид-капролактона и поли-L-лактидгликолида имеют механические характеристики, сопоставимые с нативной уретрой кроликов. Однако скаффолды на основе ПЛК+ПЛГ обладают большим модулем упругости в сравнении с скаффолдом на основе ПЛ+ПК. Показано, что все скаффолды к 4-й неделе полностью биodeградируют, при этом процесс биodeградации быстрее происходит у скаффолдов на основе ПЛК+ПЛГ.

Изучение тканеинженерных конструкций *in vitro* показало, что после посева МСК на скаффолд ПЛ+ПК по данным сканирующей электронной микроскопии определялась нормальная морфология клеток и формирование мультислоев в порах. После инкубации ТИК в течение 48 часов цитотоксического эффекта не наблюдалось. По данным конфокальной микроскопии, определялась высокая интернализация наночастиц МСК. При изучении ТИК с клетками буккального эпителия было выявлено, что через 3-5 суток после начала культивирования начиналась миграция КБЭ из фрагментов ткани. Морфология пролиферирующих клеток соответствовала классическому – по типу «бульжной мостовой». В связи с прозрачностью приготовленного скаффолда присутствовала возможность визуальной оценки характера адгезии КБЭ, посеянных на его внутренний слой. После 24 часов культивирования клетки распластывались и формировали монослой.

Проведенное исследование показало, что стандартизованная культура мезенхимных стволовых клеток сохраняет жизнеспособность и пролиферативную активность на поверхности синтезированных скаффолдов на основе ПЛ+ПК и ПЛК+ПЛГ.

По данным статистического анализа с применением критерия Краскала-Уоллеса операции с применением буккального графта были достоверно

продолжительнее ( $p=0,004$ ) в сравнении с группами, где использовались тканеинженерные конструкции, что ожидаемо в связи с отсутствием этапа забора графта у групп с имплантацией ТИК.

При оценке массы тела животных во всех группах в течение трех месяцев после операции наблюдалась ее прибавка. Это позволяет говорить о том, что использование изучаемых тканеинженерных конструкций и буккального графта, вероятно, не приводят к катаболическим процессам.

Для оценки состояния уретры в послеоперационном периоде всем кроликам после эвтаназии была выполнена ретроградная уретрография. Во всех трех группах проходимость уретры была сохранена, сужений и дивертикулов не выявлено.

При макроскопической оценке зоны имплантации ни в одной группе не выявлено отторжения имплантата, сужений и дивертикулов уретры. В 1 и 2 группах через 1 и 2 месяца после хирургического вмешательства у всех кроликов визуализировали зону имплантации. Однако через 3 месяца в 1 и 2 группах зона имплантации была визуализирована в 66,7% и 88,9% соответственно. Буккальный графт отчетливо визуализировался у всех животных.

Перед оценкой морфологии зоны имплантации уретры были проведены исследования интактной уретры у трех кроликов. Морфометрические исследования показали: толщина переходного эпителия составляла  $46,7 \pm 2,4$  мкм, толщина слизистой оболочки –  $276,7 \pm 13,2$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм их определялось  $10,3 \pm 0,2$ , а диаметр их просвета составлял  $28,3 \pm 2,4$  мкм. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее составляла  $2666,7 \pm 170,6$  мкм. Фиброз слизистой оболочки не определялся –  $0,0 \pm 0,0$  баллов, воспалительная инфильтрация отсутствовала. Морфологические и морфометрические исследования в группах №1 и №2 проводились через 1, 2 и 3

месяца после хирургического вмешательства, а в группе №3 – только через 3 месяца после уретропластики.

В группе №1 (имплантация скаффолда на основе ПЛ+ПК с МСК) на сроке 3 месяца после хирургического вмешательства стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием (переходным эпителием) и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия была снижена и составляла  $30,0 \pm 2,0$  мкм, что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Толщина слизистой оболочки составляла  $366,7 \pm 23,7$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм их количество было не увеличено и составляло  $8,0 \pm 0,8$ . Диаметр просвета сосудов составлял  $35,0 \pm 5,4$  мкм, что не имело достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2533,3 \pm 62,6$  мкм. Фиброз слизистой оболочки не определялся –  $0,0 \pm 0,0$  баллов, воспалительная инфильтрация отсутствовала.

В группе №2 (ТИК на основе ПЛГ+ПЛК с КБЭ) через 3 месяца после уретропластики стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия составляла  $41,0 \pm 2,7$  мкм, толщина слизистой оболочки составляла  $433,3 \pm 62,6$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не было увеличено и составляло  $11,3 \pm 1,0$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $36,7 \pm 2,4$  мкм, что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным

слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $1666,7 \pm 118,3$  мкм. Фиброз слизистой оболочки был слабо выражен и составлял  $1,0 \pm 0,0$  баллов, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками.

Кроликам группы № 3 выполняли буккальную пластику уретры, через 3 месяца производилась оценка результатов хирургического вмешательства. Стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизирована, без повреждения и образована уротелием и фокусом многослойного плоского эпителия в виде мелкого фиброзного полипа, собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. В одном случае под уротелием имелась выраженная гистиоцитарная и нейтрофильная лейкоцитарная инфильтрация с формированием мелкого абсцесса. Толщина переходного эпителия составляла  $46,3 \pm 2,7$  мкм, толщина слизистой оболочки –  $583,3 \pm 11,8$  мкм; при подсчете сосудов микроциркуляторного русла на 1 кв. мм количество их не было увеличено и составляло  $10,7 \pm 0,5$ . Диаметр просвета сосудов был увеличен и составлял  $45,0 \pm 2,0$  мкм, что имело достоверные различия по сравнению с группой интактных кроликов. Мышечная оболочка была представлена внутренним продольным и наружным циркулярным мышечным слоями, толщина ее не имела достоверных различий по сравнению с группой интактных кроликов и составляла  $2016,7 \pm 72,0$  мкм. Фиброз слизистой оболочки был умеренно выражен –  $2,0 \pm 0,4$  балла, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая была представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками.

Проведенные морфологические исследования показали, что через 3 месяца после оперативного вмешательства при использовании буккального графта отмечался умеренный фиброз слизистой оболочки. При использовании тканеинженерной конструкции с клетками буккального эпителия –

слабовыраженный фиброз слизистой, а при использовании тканеинженерной конструкции с мезенхимными стволовыми клетками – фиброз отсутствовал.

В обеих группах, в которых использовались тканеинженерные конструкции, наблюдалась дифференцировка в сторону уротелия («феномен пластичности»).

В результате обработки имплантированных в скаффолды мезенхимных стволовых клеток и клеток буккального эпителия наночастицами появилась возможность визуализировать их при помощи конфокальной микроскопии. Результаты исследования показали наличие солокализации меченных наночастицами МСК с окрашенным цитокератином АЕ1 / АЕ3 уротелием, что доказывает возможность дифференцировки МСК в неоуротелиальные клетки. В мышечном слое солокализации не наблюдалось.

Солокализация окрашенных и содержащих наночастицы клеток буккального эпителия свидетельствует о возможной их дифференцировке в неоуротелиальные клетки. Подобной солокализации в мышечном слое не обнаружено. В биоптатах группы №3 и в интактных тканях клеток, меченных наночастицами, не обнаружено.

Таким образом, полученные при конфокальной микроскопии данные убедительно показывают не только сохранение жизнеспособности клеток, используемых в составе тканеинженерных конструкций на протяжении 3 месяцев, но и приобретение ими свойств, характерных для уротелия.

## Выводы

1. Комбинированные скаффолды, состоящие из поли- (D, L)-лактида/поликапролактона и поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида биосовместимы, обеспечивают выживаемость клеток, обладают прочностью и растяжимостью, сопоставимой с нативной тканью уретры кролика.

2. Скаффолды и тканеинженерные конструкции на основе поли- (D, L)-лактида/поликапролактона и поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида подвергаются биодegradации в течение 1 месяца после имплантации, что достаточно для эпителизации и структурно-функционального восстановления уретры.

3. Морфофункциональными особенностями зоны имплантации тканеинженерных конструкций является восстановление стенки уретры с поддержанием её просвета, необходимого для адекватного мочеиспускания, с присутствием в слизистом слое меченных наночастицами мезенхимных стволовых клеток/клеток буккального эпителия с признаками их дифференцировки в уротелиальном направлении.

4. Функциональные результаты применения тканеинженерных конструкций и буккальной пластики сопоставимы между собой. Преимуществами применения тканеинженерных конструкций являются уменьшение объема и продолжительности хирургического вмешательства, а в случае применения МСК-содержащей тканеинженерной конструкции – отсутствие фиброза тканей в зоне имплантации.

### **Практические рекомендации**

1. Для заместительной уретропластики в экспериментальных условиях рекомендуется использовать тканеинженерные конструкции на основе поли- (D, L)-лактида/поликапролактона или поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида, содержащие соответственно аутологичные мезенхимные стволовые клетки или клетки буккального эпителия.
2. Данные тканеинженерные конструкции можно использовать в качестве альтернативы буккальной уретропластике в эксперименте.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы исследования**

Проведенное исследование посвящено актуальной проблеме современной медицины, а именно поиску альтернативных материалов для реконструкции уретры взамен собственным тканям организма. Разработка и экспериментальное применение новых тканеинженерных конструкций для уретропластики явилось основной идеей данной работы.

В проведенном диссертационном исследовании экспериментально обоснована возможность применения тканеинженерных конструкций на основе поли- (D, L)-лактида/поликапролактона и поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида, содержащих соответственно мезенхимные стволовые клетки и клетки буккального эпителия, что является первой ступенью последующего внедрения данных композитов в клиническую практику. Необходимым этапом дальнейших исследований является применение данных тканеинженерных конструкций в экспериментах, моделирующих различные патологические процессы, требующие замещения пораженных тканей уретры.

Разработанные тканеинженерные конструкции на основе поли- (D, L)-лактида/поликапролактона и поли-L-лактид-капролактона/поли-L-лактид-гликолида, содержащие соответственно аутологичные мезенхимные стволовые клетки и клетки буккального эпителия, могут быть использованы для создания экспериментальных тканеинженерных аналогов полых эпителиальных органов.

**Список сокращений и условных обозначений**

КБЭ – клетки буккального эпителия

МСК – мезенхимные стволовые клетки

ПГА – полигликолевая кислота

ПК – поликапролактон

ПЛ – поли-L,L,-лактид

ПЛА – полилактид

ПЛГ – поли-L-лактид-гликолид

ПЛГА – полилактид-гликолид

ПЛК – поли-L-лактид-капролактона

СКЖТ – стволовые клетки жировой ткани

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТИК – тканеинженерная конструкция

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ВАМ – bladder acellular matrix

SIS – small intestinal submucosa

SPION – superparamagnetic iron oxide nanoparticles

### Список литературы

1. Агапова, О.И. Биоинженерные конструкции на основе фиброина шелка и спидроина для регенеративной медицины и тканевой инженерии (обзор) / О.И. Агапова // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 190-206.
2. Борзенко, С.А. Культивирование клеток эпителия слизистой губы человека для аутологичной трансплантации при двустороннем синдроме лимбальной недостаточности роговицы / С.А. Борзенко, М.Ю. Герасимов, Д.С. Островский, Б.Э. Малюгин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 3. – С. 111-120.
3. Валеева, Н.Ш. Биополимеры–перспективный вектор развития полимерной промышленности / Н.Ш. Валеева, Г.Б. Хасанова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 22. – С. 184-187.
4. Васютин, И.А. Реконструкция уретры с помощью технологий тканевой инженерии / И.А. Васютин, А.В. Ляндуп, А.З. Винаров [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 1. – С. 17-25.
5. Гвасалия, Б.Р. Тканевая инженерия в хирургии мочеиспускательного канала / Б.Р. Гвасалия, П.А. Щеплев, Н.Н. Гарин // Здоровье мужчины. – 2011. – № 2. – С. 184-185.
6. Глыбочко, П.В. Заместительная уретропластика с использованием тканеинженерной конструкции на основе децеллюляризированной сосудистой матрицы и аутологичных клеток слизистой оболочки щеки: первый опыт / П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, В.Н. Николенко [и др.] // Урология. – 2015. – № 3. – С. 4-10.
7. Глыбочко, П.В. Экспериментальное обоснование создания матрицы на основе децеллюляризированной сосудистой стенки с целью последующей заместительной уретропластики / П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, В.Н. Николенко [и др.] // Урология. – 2014. – № 6. – С. 41-46.

8. ГОСТ 33215-2014. Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными. – Москва: Стандартиформ, 2016.
9. ГОСТ 33216-2014. Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами. - Москва: Стандартиформ, 2016.
10. ГОСТ Р 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. - Москва: Стандартиформ, 2015.
11. ГОСТ ISO 10993-6-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. – Москва: Стандартиформ, 2013.
12. Коган, М.И. Стриктуры уретры у мужчин. Реконструктивно-восстановительная хирургия / М.И. Коган. - Москва: Практическая медицина, 2010. – 144 с. - ISBN 978-5-98811-049-1.
13. Комяков, Б.К. Урология: учебник / Б.К. Комяков. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 480 с. - ISBN 978-5-9704-4421-4.
14. Котов, С.В. Стриктуры уретры у мужчин. Выбор метода уретропластики / С.В. Котов. - Москва: АБВ-пресс, 2018. – 180 с. - ISBN 978-5-903018-61-1.
15. Лызиков, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н. Лызиков, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцов // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 3 (45). – С. 4-8.
16. Митрофанов, Р.Ю. Получение и свойства гель-пленки бактериальной целлюлозы / Р.Ю. Митрофанов, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – Т. 18, № 5. – С. 587-592.
17. Муравьев, А.Н. Тканевая инженерия в урологии, новые возможности для реконструкции мочевого пузыря / А.Н. Муравьев, Н.В. Орлова, М.И. Блинова, Н.М. Юдинцева // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 1. – С. 14-18.
18. Нащекина, Ю.А. Синтез сополимеров D, L-лактида-ε-капролактона и формирование на их основе пленок / Ю.А. Нащекина, К.Е. Курдюкова, И.М. Зорин [и др.] // Журнал прикладной химии. – 2018. – Т. 91, № 1. – С. 123-130.

19. Нестеров, С.Н. Хирургическое лечение пациентов со стриктурой уретры / С.Н. Нестеров, Б.В. Ханалиев, В.В. Володичев, Б.А. Бонецкий // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 84-89.
20. Орлова, Н.В. Экспериментальная реконструкция мочевого пузыря кролика с использованием аллогенных клеток различного тканевого происхождения / Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, Н.М. Блюм [и др.] // Медицинский альянс. – 2016. – №. 1. – С. 49-51.
21. Патент № 2461622 Российская Федерация, МПК C12N 5/00 (2006.01). Биоинженерный конструкт и способ изготовления биоинженерного конструкта: № 2010125983/10; заявл. 26.11.2008; опубл. 10.01.2012 / Ван Сяньянь (CN), Фэриа Кэтри К. (US); патентообладатель Огенодженесис, Инк. (US).
22. Заявка на выдачу патента на изобретение Российская Федерация, МПК C12N 5/077 (2010.01). Способ создания клеточноинженерной и тканеинженерной конструкции на её основе: № 2016140178; заявл. 12.10.2016; опубл. 12.01.2017 / Люндуп А.В., Ищенко А.И., Александров Л.С., Ищенко А.А., Крашенинников М.Е., Горбенко О.Ю., Сулина Я.Ю.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.
23. Патент № 2567975 Российская Федерация, МПК A61B 17/00 (2006.01), A61F 2/04 (2013.01), A61K 35/35 (2015.01). Способ пластики уретры у детей с проксимальными формами гипоспадии с использованием аутологичных кератиноцитов на биodeградирующем матрикс: № 2014148072/14; заявл. 28.11.2014; опубл. 10.11.2015 / Файзулин А.К., Кононов А.В., Колосова П.А., Роговая О.С., Терских В.В., Васильев А.В.; заявители и патентообладатели Файзулин А.К., Кононов А.В., Колосова П.А., Роговая О.С., Терских В.В., Васильев А.В.

24. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации N 512н от 8 августа 2018 года «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами».
25. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
26. Розанова, И.Б. Биодеструкция имплантатов / И.Б. Розанова // Биосовместимость / под. ред. В.И. Севастьянова. – М., 1999. – С. 212-242.
27. Русаков, В.И. Хирургия мочеиспускательного канала: монография / В.И. Русаков. – Москва: Медицина, 1991. – 272 с.
28. СанПиН 2.2.1.3218 – 14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».
29. Сапежко, К.М. К лечению дефектов уретры путем пересадки слизистой оболочки / К.М. Сапежко // Хирургическая летопись. – 1894. – Т. 4, кн. 5. – С. 775-784.
30. Соколова, А.И. Зависимость биологических свойств скаффолдов из фиброина шелка и желатина от состава и технологии изготовления / А.И. Соколова, М.М. Боброва, Л.А. Сафонова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 6-15.
31. Шаманская, Т.В. Технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток ex vivo для клинического использования / Т.В. Шаманская, Е.Ю. Осипова, С.А. Румянцев // Онкогематология. – 2009. – № 3. – С. 69-76.
32. Abbas, T.O. Urine as a main effector in urological tissue engineering—a double-edged sword / T.O. Abbas, T.A. Ali, S. Uddin // Cells. – 2020. – Т. 9, Iss. 3. – P. 538.
33. Abbas, T.O. From Acellular Matrices to Smart Polymers: Degradable Scaffolds that are Transforming the Shape of Urethral Tissue Engineering / T.O. Abbas, H.C. Yalcin, C.P. Pennisi // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, №. 7. – P. 1763.

34. Alhajeri, F. Etiology, Epidemiology, Demographic Differences in Urethral Strictures: A Worldwide Perspective / F. Alhajeri, A. Alwaal, M.A. Soebadi // Textbook of Male Genitourethral Reconstruction. – Cham: Springer, 2020. – P. 25-32.
35. Andrich, D.E. What is the best technique for urethroplasty? / D.E. Andrich, A.R. Mundy // European Urology– 2008. – Vol. 54, № 5. – P. 1031-1041.
36. Angermeier, K.W. SIU/ICUD Consultation on Urethral Strictures: Evaluation and follow-up / K.W. Angermeier, K.F. Rourke, D. Dubey [et al.] // Urology. – 2014. – Vol. 83, Iss. 3. – P. S8-S17.
37. Anwar, H. Replacement of partially resected canine urethra by polytetrafluoroethylene / H. Anwar, B. Dave, J.J. Seebode // Urology. – 1984. – Vol. 24, Iss. 6. – P. 583-586.
38. Arenas da Silva, L.F. Is there a need for smooth muscle cell transplantation in urethral reconstruction? / L.F. Arenas da Silva, L. Micol, D. Tiemessen [et al.] // Tissue Engineering – Part A. – 2014. – Vol. 20, Iss. 9-10. – P. 1542-1549.
39. Asopa, H.S. Dorsal free graft urethroplasty for urethral stricture by ventral sagittal urethrotomy approach / H.S. Asopa, M. Garg, G.G. Singhal [et al.] // Urology. – 2001. – Vol. 58, Iss. 5. – P. 657-659.
40. Atala, A. Experimental and clinical experience with tissue engineering techniques for urethral reconstruction / A. Atala // The Urologic Clinics of North America. – 2002. – Vol. 29, Iss. 2. – P. 485-492.
41. Atala, A. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies / A. Atala, M. Danilevskiy, A. Lyundup [et al.] // Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. – 2017. – Vol. 11, Iss. 1. – P. 3-19.
42. Atala, A. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair / A. Atala, L. Guzman, A.B. Retik // The Journal of Urology. – 1999. – Vol. 162, Iss. 3. – P. 1148-1150.

43. Badylak, S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction / S.F. Badylak // *Transplant Immunology*. – 2004. – Vol. 12, Iss. 3-4. – P. 367-377.
44. Badylak, S.F. Small intestinal submucosa: a rapidly resorbed bioscaffold for augmentation cystoplasty in a dog model / S.F. Badylak, B. Kropp, T. McPherson [et al.] // *Tissue Engineering*. – 1998. – T. 4. – Issue 4. – P. 379-387.
45. Barbagli, G. Dorsal free graft urethroplasty / G. Barbagli, C. Selli, A. Tosto, E. Palminteri // *The Journal of Urology*. – 1996. – Vol. 155, Iss. 1. – P. 123-126.
46. Barbagli, G. Long-term follow up and deterioration rate of anterior substitution urethroplasty / G. Barbagli, S.B. Kulkarni, N. Fossati [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2014. – Vol. 192, Iss. 3. – P. 808-813.
47. Bayne, D.B. Guidelines of guidelines: a review of urethral stricture evaluation, management, and follow-up / D.B. Bayne, T.W. Gaither, M.A. Awad [et al.] // *Translational Andrology and Urology*. – 2017. – Vol. 6, Iss. 2. – P. 288.
48. Berthiaume, F. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges / F. Berthiaume, T.J. Maguire, M.L. Yarmush // *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. – 2011. – Vol. 2. – P. 403-430.
49. Bharadwaj, S. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: Potential for therapeutic applications in urology / S. Bharadwaj, G. Liu, Y. Shi [et al.] // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31, Iss. 9. – P. 1840-1856.
50. Bhargava, S. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty—clinical outcomes / S. Bhargava, J.M. Patterson, R.D. Inman [et al.] // *European Urology*. – 2008. – Vol. 53, Iss. 6. – P. 1263-1271.
51. Boland, E.D. Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of poly (glycolic acid) electrospinning / E.D. Boland, G.E. Wnek, D.G. Simpson [et al.] // *Journal of Macromolecular Science, Part A*. – 2001. – Vol. 38, Iss. 12. – P. 1231-1243.
52. Brzoska, M. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells / M. Brzoska, H. Geiger, S. Gauer, P. Baer // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 330, Iss. 1. – P. 142-150.

53. Bürger, R.A. The buccal mucosal graft for urethral reconstruction: a preliminary report / R.A. Bürger, S.C. Müller, H. El-Damanhoury [et al.] // *The Journal of Urology*. – 1992. – Vol. 147, Iss. 3, (Part 1). – P. 662-664.
54. Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine / A.I. Caplan // *Journal of Cellular Physiology*. – 2007. – Vol. 213, Iss. 2. – P. 341-347.
55. Chapple, C. Tissue engineering of the urethra: where are we in 2019? / C. Chapple // *World Journal of Urology*. – 2019, 12 June. – P. 1-5.
56. Chen, F. Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction / F. Chen, J.J. Yoo, A. Atala // *World Journal of Urology*. – 2000. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 67-70.
57. Cheng, L. A brief review on anterior urethral strictures / L. Cheng, S. Li, Z. Wang [et al.] // *Asian Journal of Urology*. – 2018. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 88-93.
58. Chung, A.S.J. Current treatment of lichen sclerosus and stricture / A.S.J. Chung, O.A. Suarez // *World Journal of Urology*. – 2019, Dec. 5. – P. 1-7.
59. Crapo, P. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, Iss. 12. – P. 3233-3243.
60. Culenova, M. Cells involved in urethral tissue engineering: systematic review / M. Culenova, S. Ziaran, L. Danisovic // *Cell Transplantation*. – 2019. – Vol. 28, Iss. 9-10. – P. 1106-1115.
61. Da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. Da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi // *Journal of Cell Science*. – 2006. – Vol. 119, Iss. 11. – P. 2204-2213.
62. Davis, N.F. Tissue engineered extracellular matrices (ECMs) in urology: Evolution and future directions / N.F. Davis, E.M. Cunnane, F.J. O'Brien [et al.] // *The Surgeon*. – 2018. – Vol. 16, Iss. 1. – P. 55-65.
63. Davis, N.F. Incidence, cost, complications and clinical outcomes of iatrogenic urethral catheterization injuries: a prospective multi-institutional study / N.F.

- Davis, M.R. Quinlan, N.R. Bhatt [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2016. – Vol. 196, Iss. 5. – P. 1473-1477.
64. De Kemp, V. Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature / V. De Kemp, P. de Graaf, J.O. Fledderus [et al.] // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10, Iss. 2. – P. e0118653.
65. De Filippo, R.E. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices / R.E. De Filippo, J.J. Yoo, A. Atala // *The Journal of Urology*. – 2002. – Vol. 168, Iss. 4. – P. 1789-1793.
66. Dorin, R.P. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? / R.P. Dorin, H.G. Pohl, R.E. De Filippo [et al.] // *World Journal of Urology*. – 2008. – Vol. 26, Iss. 4. – P. 323-326.
67. Dublin, N. Oral complications after buccal mucosal graft harvest for urethroplasty / N. Dublin, L.H. Stewart // *BJU International*. – 2004. – Vol. 94, Iss. 6. – P. 867-869.
68. El Kassaby, A.W. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures / A.W. El Kassaby, T. AbouShwareb, A. Atala // *The Journal of Urology*. – 2008. – Vol. 179, Iss. 4. – P. 1432-1436.
69. Feng, C. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction / C. Feng, Y.M. Xu, Q.Fu [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2010. – Vol. 94, Iss. 1. – P. 317-325.
70. Feng, C. Reconstruction of three-dimensional neourethra using lingual keratinocytes and corporal smooth muscle cells seeded acellular corporal spongiosum / C. Feng, Y.M. Xu, Q. Fu [et al.] // *Tissue Engineering - Part A*. – 2011. – Vol. 17, Iss. 23-24. – P. 3011-3019.

71. Fossum, M. Tissue-engineered transplants for the treatment of severe hypospadias / M. Fossum, A. Nordenskjöld // *Hormone Research in Paediatrics*. – 2010. – Vol. 73, Iss. 2. – P. 148-152.
72. Fu, Q. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix / Q. Fu, C.L. Deng, W. Liu, Y.L. Cao // *BJU International*. – 2007. – Vol. 99, Iss. 5. – P. 1162-1165.
73. Fu, W.J. Biodegradable urethral stents seeded with autologous urethral epithelial cells in the treatment of post-traumatic urethral stricture: a feasibility study in a rabbit model / W.J. Fu, X. Zhang, B.H., Zhang [et al.] // *BJU International*. – 2009. – Vol. 104, Iss. 2. – P. 263-268.
74. Gallegos, M.A. Advances in urethral stricture management / M.A. Gallegos, R.A. Santucci // *F1000Research*. – 2016. – Vol. 5. – P. 2913.
75. Gallentine, M.L. Hypospadias: a contemporary epidemiologic assessment / M.L. Gallentine, A.F. Morey, I.M. Thompson // *Urology*. – 2001. – Vol. 57, Iss. 4. – P. 788-790.
76. Glowacki, J. Collagen scaffolds for tissue engineering / J. Glowacki, S. Mizuno // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 2008. – Vol. 89, Iss. 5. – P. 338-344.
77. Guan, Y. Tissue engineering of urethra using human vascular endothelial growth factor gene-modified bladder urothelial cells / Y. Guan, L. Ou, G. Hu [et al.] // *Artificial Organs*. – 2008. – Vol. 32, Iss. 2. – P. 91-99.
78. Gunatillake, P.A. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering / P.A. Gunatillake, R. Adhikari // *Eur. Cell Mater*. – 2003. – Vol. 5, Iss. 1. – P. 1-16.
79. Guo, S.Z. Properties of polylactide inks for solvent-cast printing of three-dimensional freeform microstructures / S.Z. Guo, M.C. Heuzey, D. Therriault // *Langmuir*. – 2014. – Vol. 30, Iss. 4. – P. 1142-1150.
80. Hakky, S.I. The use of fine double siliconised dacron in urethral replacement / S.I. Hakky // *BJU International*. – 1977. – Vol. 49, Iss. 2. – P. 167-171.
81. Heath C.A. Cells for tissue engineering / C.A. Heath // *Trends in Biotechnology*. – 2000. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 17-19.

82. Hodde, J.P. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix / J.P. Hodde, R.D. Record, H.A. Liang, S.F. Badylak // *Endothelium*. – 2001. – Vol. 8, Iss. 1. – P. 11-24.
83. Hu, Y.F. Reconstruction of rabbit urethra using urethral extracellular matrix / Y.F. Hu, S.X. Yang, L.L. Wang [et al.] // *Chinese Journal of Plastic Surgery*. – 2009. – Vol. 25, Iss. 1. – P. 54-57.
84. Huang, J.W. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model / J.W. Huang, X.G. Lv, Z. Li [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2015. – T. 10, Iss. 5. – P. 055005.
85. Isobe, Y. Oriented collagen scaffolds for tissue engineering / Y. Isobe, T. Kosaka, G. Kuwahara [et al.] // *Materials*. – 2012. – Vol. 5, Iss. 3. – P. 501-511.
86. Italiano, G. Reconstructive surgery of the urethra: a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts / G. Italiano, G. Abatangelo, A. Calabro [et al.] // *Urological Research*. – 1997. – Vol. 25, Iss. 2. – P. 137-142.
87. Joshi, P. Approach to bulbar urethral strictures: Which technique and when? / P. Joshi, C. Kaya, S. Kulkarni // *Turkish Journal of Urology*. – 2016. – Vol. 42, Iss. 2. – P. 53.
88. Kanatani, I. Fabrication of an optimal urethral graft using collagen-sponge tubes reinforced with copoly (L-lactide/  $\epsilon$ -caprol actone) fabric / I. Kanatani, A. Kanematsu, Y. Inatsugu [et al.] // *Tissue Engineering*. – 2007. – Vol. 13, Iss. 12. – P. 2933-2940.
89. Koltsova, A.M. Characterization of a novel mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells / A.M. Koltsova, V.V. Zenin, T.K. Yakovleva, G.G. Poljanskaya // *Cell and Tissue Biology*. – 2016. – Vol. 10, Iss. 1. – P. 1-9.
90. Kropp, B.P. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts / B.P. Kropp, J.K. Ludlow, D. Spicer [et al.] // *Urology*. – 1998. – Vol. 52, Iss. 1. – P. 138-142.
91. Kubricht, W.S. Tensile strength of cadaveric fascia lata compared to small intestinal submucosa using suture pull through analysis / W.S. Kubricht, B.J.

- Williams, J.A. Eastham [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2001. – Vol. 165, Iss. 2. – P. 486-490.
92. Kulkarni, S. One-sided anterior urethroplasty: a new dorsal onlay graft technique / S. Kulkarni, G. Barbagli, S. Sansalone, M. Lazzeri // *BJU international*. – 2009. – Vol. 104, Iss. 8. – P. 1150-1155.
93. La Carrubba, V.V. PLLA/PLA scaffolds prepared via Thermally Induced Phase Separation (TIPS): tuning of properties and biodegradability / V.V. La Carrubba, F.C. Pavia, V. Brucato, S. Piccarolo // *International Journal of Material Forming*. – 2008. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 619-622.
94. Latini, J.M. SIU/ICUD consultation on urethral strictures: epidemiology, etiology, anatomy, and nomenclature of urethral stenoses, strictures, and pelvic fracture urethral disruption injuries / J.M. Latini, J.W. McAninch, S.B. Brandes [et al.] // *Urology*. – 2014. – Vol. 83, Iss. 3. – P. S1-S7.
95. Lazzeri, M. Incidence, causes, and complications of urethral stricture disease / M. Lazzeri, S. Sansalone, G. Guazzoni [et al.] // *European Urology Supplements*. – 2016. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 2-6.
96. Levy, M.E. Graft use in bulbar urethroplasty / M.E. Levy, S.P. Elliott // *Urologic Clinics*. – 2017. – T. 44. – Iss. 1. – P. 39-47.
97. Li, H. Epithelial-differentiated adipose-derived stem cells seeded bladder acellular matrix grafts for urethral reconstruction: an animal model / H. Li, Y. Xu, H. Xie [et al.] // *Tissue Engineering - Part A*. – 2014. – Vol. 20, Iss. 3-4. – P. 774-784.
98. Lin, J. Homologous dermal acellular matrix graft for urethral reconstruction in man (report of 16 cases) / J. Lin, J.R. Hao, J. Jin [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. – 2005. – Vol. 85, Iss. 15. – P. 1057-1059.
99. Liu, J. Cell-to-cell contact induces human adipose tissue-derived stromal cells to differentiate into urothelium-like cells in vitro / J. Lin, J. Huang, T. Lin [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 390, Iss. 3. – P. 931-936.

100. Liu, Y. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model / Y. Liu, W. Ma, B. Liu [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8, Iss. 1. – P. 63.
101. Lumen, N. Etiology of urethral stricture disease in the 21st century / N. Lumen, P. Hoebeke, P. Willemsen [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2009. – Vol. 182, Iss. 3. – P. 983-987.
102. Maciejewski, C. Imaging of urethral stricture disease / C. Maciejewski, K. Rourke // *Translational Andrology and Urology*. – 2015. – Vol. 4, Iss. 1. – P. 2-9.
103. Mangera, A. Tissue engineering in urethral reconstruction – an update / A. Mangera, C.R. Chapple // *Asian Journal of Andrology*. – 2013. – Vol. 15, Iss. 1. – P. 89.
104. Mangera, A. Evaluation and management of anterior urethral stricture disease / A. Mangera, N. Osman, C.R. Chapple // *F1000Research*. – 2016. – Vol. 5, Iss. 153. – P. 153.
105. Mangera, A. A systematic review of graft augmentation urethroplasty techniques for the treatment of anterior urethral strictures / A. Mangera, J.M. Patterson, C.R. Chapple // *European Urology*. – 2011. – T. 59, Iss. 5. – P. 797-814.
106. Mangir, N. Current state of urethral tissue engineering / N. Mangir, K.J. Wilson, N.I. Osman, C.R. Chapple // *Current Opinion in Urology*. – 2019. – Vol. 29, Iss. 4. – P. 385-393.
107. Mantovani, F. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS): evolution of the grafting technique and results of 10-year experience / F. Mantovani, E. Tondelli, G. Cozzi [et al.] // *Urologia Journal*. – 2011. – Vol. 78, Iss. 2. – P. 92-97.
108. Marshall, S.D. Dorsal inlay buccal mucosal graft (Asopa) urethroplasty for anterior urethral stricture / S.D. Marshall, V.T. Raup, S.B. Brandes // *Translational Andrology and Urology*. – 2015. – Vol. 4, Iss. 1. – P. 10.

109. Meyer, U. The history of tissue engineering and regenerative medicine in perspective / U. Meyer // *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative medicine*. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. – P. 5-12.
110. Mikami, H. Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells / H. Mikami, G. Kuwahara, N. Nakamura [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2012. – Vol. 187, Iss. 5. – P. 1882-1889.
111. Nuininga, J.E. Urethral reconstruction of critical defects in rabbits using molecularly defined tubular type I collagen biomatrices: key issues in growth factor addition / J.E. Nuininga, M.J. Koens, D.M. Tiemessen [et al.] // *Tissue Engineering - Part A*. – 2010. – Vol. 16, Iss. 11. – P. 3319-3328.
112. Olsen, L. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device: an experimental study / L. Olsen, S. Bowald, C. Busch [et al.] // *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. – 1992. – Vol. 26, Iss. 4. – P. 323-326.
113. Orabi, H. The use of small intestinal submucosa graft for hypospadias repair: Pilot study / H. Orabi, A.S. Safwat, A. Shahat, H.M. Hammouda // *Arab Journal of Urology*. – 2013. – Vol. 11, Iss. 4. – P. 415-420.
114. Orabi, H. *Tissue Engineering in Urethral Reconstruction* / H. Orabi, F.E. Martins // *Textbook of Male Genitourethral Reconstruction*. – Cham: Springer, 2020. – P. 437-445.
115. Osborn, S.L. Production of urothelium from pluripotent stem cells for regenerative applications / S.L. Osborn, E.A. Kurzrock // *Current Urology Reports*. – 2015. – T. 16, Iss. 1. – P. 466.
116. Palminteri, E. Long-term results of small intestinal submucosa graft in bulbar urethral reconstruction / E. Palminteri, E. Berdondini, F. Fusco [et al.] // *Urology*. – 2012. – Vol. 79, Iss. 3. – P. 695-701.
117. Palminteri, E. Contemporary urethral stricture characteristics in the developed world / E. Palminteri, E. Berdondini, P. Verze [et al.] // *Urology*. – 2013. – Vol. 81, Iss. 1. – P. 191-197.

118. Parnigotto, P.P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix / P.P. Parnigotto, M.T. Conconi, P.G. Gamba, P. Midrio // *Urological research*. – 2000. – Vol. 28, Iss.1. – P. 46-51.
119. Pokrywczyńska, M. Application of Bladder Acellular Matrix in Urinary Bladder Regeneration: The State of the Art and Future Directions / M. Pokrywczyńska, I. Carayon, G. Drewa, T. Drewa // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-11.
120. Ram-Liebig, G. Results of use of tissue-engineered autologous oral mucosa graft for urethral reconstruction: a multicenter, prospective, observational trial / G. Ram-Liebig, G. Barbagli, A. Heidenreich [et al.] // *EBioMedicine*. – 2017. – Vol. 23. – P. 185-192.
121. Rashidbenam, Z. Overview of Urethral Reconstruction by Tissue Engineering: Current Strategies, Clinical Status and Future Direction / Z. Rashidbenam, M.H. Jasman, P. Hafez [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. Vol. 16, Iss. 4. – P. 1-20.
122. Raya-Rivera, A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study / A. Raya-Rivera, D.R. Esquiliano, J.J. Yoo [et al.] // *The Lancet*. – 2011. – Vol. 377, Iss. 9772. – P. 1175-1182.
123. Reyes, M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells / M. Reyes, A. Dudek, B. Jahagirdar [et al.] // *Blood. The Journal of the American Society of Hematology*. – 2001. – Vol. 98, Iss. 9. – P. 2615-2625.
124. Ribeiro-Filho L.A. Acellular matrix in urethral reconstruction / L.A. Ribeiro-Filho, K.D. Sievert // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 82. – P. 38-46.
125. Rothberg, M.B. History and Development of Regenerative Medicine and Tissue Engineering in Urology / M.B. Rothberg, A. Atala // *The History of Technologic Advancements in Urology*. – Cham: Springer, 2018. – P. 289-317.

126. Sabanegh Jr, E.S. Long-segment ureteral replacement with expanded polytetrafluoroethylene grafts / E.S. Sabanegh Jr, J.R. Downey, A.L. Sago // *Urology*. – 1996. – Vol. 48, Iss. 2. – P. 312-316.
127. Sack, B.S. Silk fibroin scaffolds for urologic tissue engineering / B.S. Sack, J.R. Mauney, C.R. Estrada // *Current Urology Reports*. – 2016. – Vol. 17, Iss. 2. – P. 16.
128. Santucci, R.A. Male urethral stricture disease / R.A. Santucci, G.F. Joyce, M. Wise // *The Journal of Urology*. – 2007. – Vol. 177, Iss. 5. – P. 1667-1674.
129. Selim, M. Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra / M. Selim, A.J. Bullock, K.A. Blackwood [et al.] // *BJU International*. – 2011. – Vol. 107, Iss. 2. – P. 296-302.
130. Shafiee, A. Tissue engineering: Toward a new era of medicine / A. Shafiee, A. Atala // *Annual Review of Medicine*. – 2017. – Vol. 68. – P. 29-40.
131. Simões, I.N. Acellular urethra bioscaffold: decellularization of whole urethras for tissue engineering applications / I.N. Simões, P. Vale, S. Soker [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, Iss. 1. – P. 1-13.
132. Snodgrass, W. Primary hypospadias repair techniques: A review of the evidence / W. Snodgrass, N. Bush // *Urology Annals*. – 2016. – Vol. 8, Iss. 4. – P. 403.
133. Spilotros, M. Penile urethral stricture disease / M. Spilotros, S. Venn, P. Anderson, T. Greenwell // *Journal of Clinical Urology*. – 2019. – Vol. 12, Iss. 2. – P. 145-157.
134. Steins, A. In vitro evaluation of spider silk meshes as a potential biomaterial for bladder reconstruction / A. Steins, P. Dik, W.H. Müller [et al.] // *PLOS One*. – 2015. – Vol. 10, Iss. 12. – P. e0145240.
135. Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering / R.S. Tuan, G. Boland, R. Tuli // *Arthritis Research and Therapy*. – 2003. – Vol. 5, Iss. 1. – P. 32-45.
136. Vaegler, M. Tissue engineering in urothelium regeneration / M. Vaegler, S. Maurer, P. Toomey [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 82. – P. 64-68.

137. Versteegden, L.R.M. Tissue engineering of the urethra: a systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies / L.R.M. Versteegden, P.K. de Jonge, J. IntHout [et al.] // *European Urology*. – 2017. – Vol. 72, Iss. 4. – P. 594-606.
138. Wang, F. Advanced protein composite materials / F. Wang, C. Yang, X. Hu // *Lightweight Materials from Biopolymers and Biofibers* / American Chemical Society. – 2014. – Chap. 11. - P. 177-208.
139. Wessells, H. Ventral onlay graft bulbar urethroplasty using buccal mucosa / H. Wessells // *African Journal of Urology*. – 2016. – Vol. 22, Iss. 1. – P. 40-46.
140. Wu, S. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering / S. Wu, Y. Liu, S. Bharadwaj [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, Iss. 5. – P. 1317-1326.
141. Xie, M. Evaluation of stretched electrospun silk fibroin matrices seeded with urothelial cells for urethra reconstruction / M. Xie, L. Song, J. Wang [et al.] // *Journal of Surgical Research*. – 2013. – Vol. 184, Iss. 2. – P. 774-781.
142. Yudintceva, N.M. Experimental bladder regeneration using a poly-L-lactide/silk fibroin scaffold seeded with nanoparticle-labeled allogenic bone marrow stromal cells / N.M. Yudintceva, Y.A. Nashchekina, M.I. Blinova [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 4521-4533.
143. Zhang, K. Application of Wnt Pathway Inhibitor Delivering Scaffold for Inhibiting Fibrosis in Urethra Strictures: In Vitro and in Vivo Study / K. Zhang, X. Guo, W. Zhao [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, № 11. – P. 27659-27676.
144. Zhang, Y. Coculture of bladder urothelial and smooth muscle cells on small intestinal submucosa: potential applications for tissue engineering technology / Y. Zhang, B.P. Kropp, P. Moore [et al.] // *The Journal of Urology*. – 2000. – Vol. 164, Iss. 3 Part 2. – P. 928-935.
145. Zhou, S. Fabrication of tissue-engineered bionic urethra using cell sheet technology and labeling by ultras-small superparamagnetic iron oxide for full-

- thickness urethral reconstruction / S. Zhou, R. Yang, Q. Zou [et al.] // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, Iss. 9. – P. 2509.
146. Zhu, J. A tubular gelatin scaffold capable of the time-dependent controlled release of epidermal growth factor and mitomycin C / J. Zhu, F. Yang, F. He [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 135. – P. 416-424.