УДК 57.085.157.085.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, ЗАСЕЛЕННОЙ КЛЕТКАМИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ, ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ УРЕТРОПЛАСТИКИ

© 2020 г. Н. М. Юдинцева^{1, *}, Ю. А. Нащекина¹, М. А. Шевцов^{1, 2}, Н. А. Михайлова¹, Т. И. Виноградова³, А. А. Горелова^{3, 4}, И. А. Самусенко⁵, А. Н. Муравьев³

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, 191036 Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия ⁵Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, 197082 Россия *E-mail: yudintceva@mail.ru Поступила в редакцию 20.01.2020 г. После доработки 26.01.2020 г. Принята к публикации 27.01.2020 г.

Одной из основных проблем урологии остается лечение стриктур уретры. Основным способом лечения данных патологий является хирургический метод, при котором в качестве заместительного материала используют различные ткани пациента. Использование буккального лоскута в настоящее время имеет наилучшие результаты. Однако у этого вида уретропластики есть целый ряд недостатков, которые можно исключить, используя альтернативные материалы, разрабатываемые с помощью методов тканевой инженерии. В данном исследовании была разработана и приготовлена тканеинженерная конструкция на основе двухслойного полимерного скаффолда, заселенного клетками буккального эпителия. Данные уретрографии и гистологический анализ продемонстрировали восстановление поврежденной ткани уретры кролика с сохранением просвета и структурной целостности уретры. Приготовленная тканеинженерная конструкция обладала терапевтической эффективностью, сопоставимой с таковой при использовании аутологичного буккального лоскута, что позволяет ей стать многообещающей альтернативой другим материалам для заместительной уретропластики.

Ключевые слова: буккальный эпителий, буккальный лоскут, наночастицы, скаффолд, стриктура, тканеинженерная конструкция, уретропластика **DOI:** 10.31857/S0041377120040082

Одной из основных проблем урологии остается патология уретры, связанная с образованием стриктур, которые существенно влияют на качество жизни пациентов. Распространенность стриктур уретры составляет 229—627 случаев на 100 тыс. населения. При этом возникновение данной патологии отмечается в различном возрасте, в том числе и после 55 лет (Santucci et al., 2007). В связи с этим распространенность данного заболевания достоверно не известна (Lazzeri et al., 2016). Для лечения коротких стриктур выполняют анастомотическую уретропластику. Если длина стриктуры превышает 2 см, то ее относят к группе протяженных или субтотальных стриктур.

Основным способом лечения данных патологий является хирургический метод, при котором в качестве заместительного материала используют различные ткани пациента, включая кожу, слизистые оболочки мочевого пузыря, толстой кишки, а также щеки или языка и др. (Cheng et al., 2007). Однако использование целого ряда перечисленных тканей эффективно только в течение короткого периода, при долгосрочном наблюдении часто происходит рецидив стриктуры, что требует проведения повторной операции.

Буккальная пластика (использование слизистой оболочки щеки) в настоящее время имеет наилучшие результаты и признана "золотым стандартом" при протяженных стриктурах уретры, обеспечивая до 90% удовлетворительных отдаленных результатов. По сравнению с другими тканями слизистая

Принятые сокращения: БЛ – буккальный лоскут; БЭ – буккальный эпителий; ТИК – тканеинженерная конструкция.

оболочка щеки имеет целый ряд преимуществ, таких как постоянный контакт с влажной средой, отсутствие волосяных луковиц, устойчивость к механическим, термическим и другим воздействиям, врожденная антибактериальная иммунная защита, а также достаточно простая процедура забора лоскута (Gallegos, Santucci, 2016; Barbagli et al., 2017). Однако у этого вида уретропластики есть целый ряд недостатков: осложнения в донорской зоне, дефицит тканей, особенно при протяженных, рецидивных стриктурах, и увеличение времени операции в связи с необходимостью получения буккального лоскута (БЛ) пациента (Atala et al., 2017).

В настоящее время с использованием методов тканевой инженерии разрабатываются различные альтернативные материалы. целью которых является исключение перечисленных выше недостатков. Эволюция тканевой инженерии в области урологии началась с бесклеточных трансплантатов и затем прогрессировала до тканеинженерных конструкций (ТИК), заселенных различными типами клеток (Sievert et al., 2000; Fu et al., 2007). Большое количество публикаций демонстрирует, что бесклеточные материалы, используемые для лечения длинных уретральных дефектов, часто приводят к фиброзу, в то время как использование ТИК, заселенных клетками, дает положительные результаты, что свидетельствует о перспективности данного направления (Bharadwaj et al., 2013; Liu et al., 2017).

Однако и до настоящего времени отдаленные результаты операций с использованием ТИК, к сожалению, остаются неудовлетворительными. Основной проблемой является разработка подходящих носителей для клеток. Используемые для этих целей материалы должны отвечать целому ряду требований: обладать био- и гистосовместимостью, не быть токсичными и не вызывать иммунную реакцию организма, иметь адекватное время биодеградации, обладать определенными механическими свойствами для поддержания адекватного просвета уретры в течение длительного времени, а также физическими характеристиками (эластичность, растяжимость), необходимыми для отведения мочи и сохранения копулятивной функции органа (Vaegler et al., 2015). Кроме того, одним из важных требований является наличие определенных прочностных характеристик материала, обеспечивающих возможность эффективной накладки первичного хирургического шва без прорезывания лигатур.

Таким образом, одной из задач исследования являлась разработка двухслойного полимерного скаффолда, который соответствовал бы всем требованиям, предъявляемым к материалам для реконструктивной хирургии уретры. Слои двуслойного скаффолда, были приготовлены на основе различных полигидроксиэфиров и обладали разной скоростью деградации. Скорость деградации внешнего слоя, контактирующего с мочой, была существенно ниже, и это

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

позволяло защитить клетки, заселенные на поверхность внутреннего слоя скаффолда, от ее агрессивного воздействия.

Другой важной составляющей ТИК является клеточный компонент. Необходимо сделать выбор "правильного" типа клеток и сохранить их жизнеспособность после трансплантации in vivo. В последнее время проводятся активные исследования, посвященные использованию клеток различного происхождения (эмбриональные фибробласты, кератиноциты, стволовые клетки, выделенные из костного мозга, жировой ткани, уротелий и др.) для реконструкции уретры (Culenova et al., 2019), выполнено несколько клинических исследований с использованием ТИК, заселенных аутологичными клетками буккального эпителия (БЭ) и мочевого пузыря (Versteegden et al., 2017; Vaddi et al., 2019). Следует отметить, что клетки БЭ обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими типами клеток. Прежде всего, это связано с малоинвазивностью метода получения биоптата, который позволяет избежать дополнительного травмирования пациентов. Кроме того, клетки БЭ обладают большим морфологическим сходством с клетками уротелия и успешно формируют неороговевающий многослойный эпителий.

Таким образом, второй задачей исследования было сравнение терапевтической эффективности ТИК, приготовленной на основе двухслойного скаффолда, заселенного аутологичными клетками БЭ, с аутологичным буккальным лоскутом (БЛ) слизистой оболочки щеки при выполнении уретропластики кролику. Для того чтобы проследить дальнейшую судьбу клеток БЭ мы использовали суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, которые являются эффективным маркером для долгосрочной визуализации имплантированных клеток (Cromer et al., 2011; Kim et al., 2015; Ramos-Gomez et al., 2016; Yudintceva et al., 2016, 2018).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и культивирование клеток буккального эпителия (БЭ). В работе были использованы самцы кроликов породы "Шиншилла" (n = 4). Все манипуляции с животными проводили под общей анестезией с использованием тилетамина гидрохлорид/золазепама гидрохлорида (Zoletil, Virbac SA, Франция) в дозе 25 мг/кг массы тела (внутримышечно) и ксилазина гидрохлорида (Bioveta, Чехия) в виде 2%-ного раствора в объеме 1.0-1.5 мл (внутримышечно). После обработки слизистой ротовой полости кролика 0.05%-ным водным раствором хлоргексидина острым путем был взят биоптат слизистой оболочки щеки размером 3×5 мм. Ткань транспортировали в среде ДМЕМ (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 тщательно отмывали в растворе фосфатносолевого буфера PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4, 1.5 M KH₂PO₄, 2.7 мМ KCl; все реактивы квалификации "ос. ч."; 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 (Борзенок 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 мм². С целью предотвращения высыхания биоптата в чашку Петри вносили 50-100 мкл среды ДМЕМ, 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 мМ Ca²⁺ (Sigma-Aldrich, США), 5%-ной фетальной сывороткой (HyClone, США), инсулином (5 мкг/мл), гидрокортизоном (5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, США), эпидермальным фактором роста (10 нг/мл) (ПанЭко, Россия), раствором гентамицина и помещали в стандартные условия СО2-инкубатора на 2–3 ч. В кажлую лунку аккуратно лобавляли по 500 мкл питательной среды DMEM/F12. Оценку миграции клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония), фиксировали на цифровую фотокамеру. Смену питательной среды выполняли с момента появления первых мигрирующих клеток и далее через 1 сут. После достижения клетками 80-90% конфлуентности выполняли пересев посредством обработки культуры 0.25%-ным раствором трипсин-ЭДТА (Gibco, Великобритания). В экспериментах использовали клетки 2-3 пассажей.

Интернализация наночастиц клетками БЭ. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (Fe₃O₄) с размерами менее 50 нм были покрыты декстраном с целью повышения их биосовместимости и снижения агрегации (Shevtsov et al., 2015а). Клетки, достигшие состояния монослоя, инкубировали с наночастицами с концентрацией 150 мкг/мл в течение 24 ч в условиях СО2-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 раствором 0.4%-ного красителя Трипановый синий (Биолот, Россия). Дополнительно с помощью МТТметода была проанализирована цитотоксичность наночастиц. Был использован набор Vybrant® MTT в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, CIIIA).

Иммунофлуоресцентный анализ. Культуру клеток БЭ в слайд-флаконах трижды промывали раствором PBS и фиксировали раствором 10%-ного нейтрального формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Для пермеабилизации клеточной мембраны вносили 0.1% раствор Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США) на 15 мин. Трижды отмывали и для блокировки сайтов неспецифического связывания в течение 1 чинкубировали в растворе 0.2% БСА (бычий сывороточный альбумин). В качестве первичных антител в разведении 1:250 использовали антитела против виментина (Anti-Vimentin antibody, RV202; Abcam, США) для выявления промежуточных филаментов, интегрина β1(Anti-Integrin β1 Antibody, clone B3B11; 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°С. В качестве вторичных антител в разведении 1: 250 использовали иммуноглобулины козы (Goat Anti-Mouse IgG; Abcam, США), коньюгированные с FITC. Инкубирование со вторыми антителами выполняли в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. После трехкратной отмывки препаратов раствором PBS для окраски ядер 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. 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).

Приготовление двухслойного полимерного скаффолда (ПЛК–ПЛГ). Для приготовления двухслойного скаффолда использовали полигидроксиэфиры. Внешний слой был сформирован на основе поли-Lлактид-капролактона (ПЛК) (85/15) (h = 1.66 дл/г, Purac, Нидерланды), внутренний – поли-L-лактидгликолида (ПЛГ) (85/15) (*h* = 3.13 дл/г, Purac, Hидерланды). Полимеры растворяли в трихлорметане (Вектон, Россия) до конечной концентрации раствора 2 мг/мл и равномерно наносили на стандартное предметное стекло с размерами 1.0 × 2.5 см (Menzel, Германия). На первой стадии наносили раствор ПЛК объемом 1 мл и оставляли сушиться в течение 15 мин на воздухе. Затем после частичного испарения растворителя на первый слой полимера ПЛК наносили раствор ПЛГ объемом 1 мл и также оставляли сушиться на воздухе. После полного испарения растворителя на воздухе полученный скаффолд сушили при температуре 37°С до постоянной массы (рис. 1). Затем на поверхности предметного

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ



Рис. 1. Внешний вид и параметры двухслойного скаффолда (ПЛК–ПЛГ).

стекла, не открепляя, с помощью скальпеля разрезали скаффолд на 5 равных частей (1 × 0.5 см). После этого каждый фрагмент скаффолда аккуратно открепляли от поверхности покровного стекла и помещали в чашку Петри. Стерилизацию скаффолда выполняли методом озонирования в режиме: концентрация газообразного озона 200 ед./млн в течение 120 мин при относительной влажности 80%.

Заселение скаффолда ПЛК–ПЛГ клетками буккального эпителия. Скаффолд помещали в чашку Петри (диаметр 35 см²) внутренним слоем (ПЛГ) вверх. Суспензию клеток в концентрации 1×10^6 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 CO₂-инкубатора для адгезии. Оценку адгезии клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, Япония. После того как клетки адгезировали на поверхность скаффолда, аккуратно добавляли 1.5 мл среды и продолжали культивирование в течение 3 сут, не прикрепившиеся клетки удаляли при смене среды.

Выполнение заместительной уретропластики. В исследование было включено 10 кроликов породы "Шиншилла" (питомник лабораторных животных

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

"Рапполово" РАМН, Санкт-Петербург). Животные содержались в стандартных условиях согласно Сан-ПиН 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"). Животные включались в исследование после двухнедельного карантина, при отсутствии внешних признаков патологии, изменений в общеповеденческих реакциях, а также отклонений от нормы в лабораторных анализах крови и мочи. Допустимым отклонением считалось присутствие солей (фосфатов) в общем анализе мочи кроликов, связанное с особенностями пищевого рациона. Животные были разбиты на две экспериментальные группы: (1) экспериментальная группа с использованием ТИК, заселенной аутологичными клетками БЭ (n = 4); (2) экспериментальная группа с использованием аутологичного БЛ (n = 4). У животных из второй экспериментальной группы выполняли забор аутологичного БЛ (рис. 2*a*). Катетер Фолея № 6 заводили по уретре в полость мочевого пузыря. Животным из обеих экспериментальных групп производили продольный разрез кожи полового члена, на дорзальной поверхности создавали дефект слизистой с размером 7 × 2 мм (рис. 26). После чего ТИК, за-



Рис. 2. Заместительная уретропластика. *a* – Забор аутологичного БЛ; *б* – частичная резекция дорсальной стенки уретры. Размер дефекта: 0.7 см × 0.2 см; *в*, *г* – реконструкция уретры с использованием ТИК, заселенной клетками БЭ и аутологичного БЛ, соответственно.

селенную аутологичными клетками БЭ, (рис. 2*в*) и аутологичный БЛ (рис. 2*г*) фиксировали к краям дефекта отдельными узловыми викриловыми швами 6/0. Накладывали послойный шов. В течение 5 сут послеоперационного периода внутримышечно применяли Цефазолин (10 мг/кг 3 раза в сут). Оценку результатов производили через 12 нед. после выполнения реконструкции.

Ретроградная уретрография. Выведение животных из эксперимента осуществляли с использованием препаратов тилетамина гидрохлорид/золазепама гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, France) и миорелаксанта ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в дозах, пятикратно превышающих терапевтическую. После эвтаназии всем животным проводили ретроградную уретрографию, при которой оценивали следующие параметры: проходимость уретры, наличие/отсутствие сужения, а также затеки контрастного вещества. Исследование проводили на рентгеновском аппарате с использованием контрастного вещества "Омнипак". В качестве контроля использовали интактных животных (n = 2).

Гистологический анализ. Стенку уретры фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 24 ч, далее материал проходил стандартную обработку в изопропиловом спирте и парафине для изготовления гистологических и гистохимических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3–5 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При

270



Рис. 3. Морфология клеток БЭ. Прижизненные фотографии. Инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse TS100, Япония. *а* – Миграция клеток БЭ из фрагмента слизистой оболочки щеки кролика; *б* – растущая культура клеток БЭ; *в* – культура клеток БЭ на поверхности внутреннего слоя скаффолда (ПЛК–ПЛГ). *Масштабная линейка:* 300 мкм.

морфометрическом исследовании измеряли толщину эпителия, слизистой оболочки уретры, производили подсчет количества сосудов микроциркуляторного русла на 1 мм² и диаметр просвета сосудов в подслизистой оболочке при помоши морфометрической линейки. Полуколичественно оценивали степень выраженности воспалительного инфильтрата лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Морфологическое исследование гистологических препаратов и препаратов, окрашенных гистохимическим методом, проводили при помощи светооптического микроскопа (Leica DM LS, Германия) при увеличении микроскопа ×100 и ×200. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры (Leica DC320, Германия). В качестве контроля использовали интактных животных.

Приготовление криосрезов. Для обнаружения клеток, меченных наночастицами, образцы помешали в Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe BV, Alphen an den Rijn, Нидерланды) и хранили при -80°С. Срезы (толщиной 5-7 мкм), полученные из этих блоков, устанавливали на предметные стекла Superfrost ^{тм} Plus (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000, Япония. Дополнительно срезы окрашивали, используя антитела специфические для клеток уротелия (Anti-cytokeratin AE1/AE3 antibody, Clone AE1/AE3, Abcam, США) и для гладкомышечных клеток (αSMA, Abcam, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторичных антител в разведении 1:250 использовали иммуноглобулины кролика (Rabbit antimouse FITC-labeled antibody, Sigma-Aldrich, CIIIA), коньюгированные с FITC. Срезы дополнительно окрашивали DAPI. Флуоресцентные изображения были получены с использованием конфокальной системы (Olympus FV3000, Япония) с использованием соот-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

ветствующих лазеров (см. Иммунофлуоресцентный анализ).

Статистический анализ. Гистологические данные, полученные в результате исследования, подвергались статистической обработке методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Exel с определением показателей среднего значения (M), ошибки среднего (m), достоверности различий между группами сравнения с вычислением критерия Стьюдента (t) и уровня значимости (α), доверительного интервала (p), различия считали достоверными при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 3—5 сут после начала культивирования начиналась миграция клеток БЭ из фрагментов ткани (рис. 3*a*). Морфологические особенности пролиферующих клеток соответствовали их классической морфологии по типу "булыжной мостовой" (рис. 3*б*). В связи с прозрачностью приготовленного скаффолда присутствовала возможность визуальной оценки характера адгезии клеток БЭ, посеянных на его внутренний слой. После 24 ч культивирования клетки распластывались и формировали монослой (рис. 3*в*).

В первичной культуре клеток БЭ была отмечена экспрессия виментина (рис. 4a) и интегрина β 1, свидетельствующая о присутствии в культуре клеток базального эпителия (рис. 4b), а также активная пролиферация клеток (рис. 4b). После того как клетки БЭ 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 ядро, но не проникая в него (рис. 4c). Цитотоксическое влияние наночастиц на



Рис. 4. Идентификация клеток БЭ. *a* – Виментин; *б* – интегрин β1; *в* – выявление пролиферирующих клеток БЭ с помощью антител против Ki-67; *г* – интернализация суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (*красный цвет*) клетками БЭ. Конфокальный микроскоп Olympus FV3000, Япония. Выявление иммунофлуоресцентного мечения (*зеленый цвет*) выполняли с использованием диодного лазера (488 нм). Ядра окрашивали DAPI (*синий цвет*) и детектировали с использованием диодного лазера (405 нм). Для оценки интернализации магнитных наночастиц (*красный цвет*) применяли сканирование отраженным лазером (504 нм). *Масштабная линейка: а*, *в* – 100 мкм; *б*, *г* – 50 мкм.

клетки БЭ после совместной инкубации в течение 24 ч отсутствовало (данные не приведены). Отсутствие цитотоксического действия на клетки при внесении наночастиц в используемом режиме также подтверждено нашими ранее опубликованными исследованиями, в которых суперпарамагнитные наночастицы оксида железа были применены как в качестве метки, введенной в стволовые клетки (Yudintceva et al., 2016; 2018), так и для диагностических целей (Shevtsov et al., 20156; 2016).

Через 12 нед. после операции, для того чтобы оценить структурную целостность реконструированной уретры, была выполнена ретроградная уретрография. Полученные данные подтвердили отсутствие затеков контрастного вещества в полость, а также сохранение просвета и структурной целостности уретры в обеих экспериментальных группах (рис. 5a, δ). После выведения животных из эксперимента наблюдали эффективную биоинтеграцию ТИК, заселенной аутологичными клетками БЭ, и аутологичного БЛ с окружающими тканями уретры (рис. 5e, d), которая была сопоставима с контролем. В качестве контроля использовали уретру интактного кролика (рис. 5e, e).

Гистологический анализ также продемонстрировал восстановление всех слоев поврежденной ткани



Рис. 5. Оценка восстановленной уретры через 12 нед после выполнения реконструкции с использованием ТИК, заселенной клетками БЭ (*a*, *c*) и аутологичного БЛ (*б*, *d*). *a*, *б* – Ретроградная уретрография, *c*, *d* – визуальная оценка внутренней поверхности реконструированной ткани. Зона реконструкции – *белый эллипс. в*, *e* – Уретра интактного кролика (контроль).

в обеих экспериментальных группах. Стенка уретры была представлена слизистой и мышечной оболочками. Слизистая оболочка на всем протяжении была покрыта уротелием и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани (рис. 6). Морфометрические показатели не имели существенных различий как между экспериментальными группами, так и по сравнению с контролем. Васкуляризация в подслизистой оболочке контрольного и экспериментальных образцов была сопоставима. Фиброз слизистой оболочки был слабо выражен в обеих группах, наблюдалась незначительная лимфоцитарная инфильтрация, что свидетельствовало о невысокой степени воспалительного процесса, который не распространялся на окружающие ткани (табл. 1). Скаффолд и шовный материал в биоптатах не обнаружены, на этом сроке произошла их полная деградация.

С целью выявления присутствия в биоптате клеток, помеченных наночастицами, были приготовлены криосрезы. Солокализация окрашенных и содержащих наночастицы клеток на сроке 12 нед. свидетельствует о возможной дифференцировке клеток БЭ в клетки нео-уротелия. Подобной солокализации в мышечном слое не обнаружено (рис. 7). В биоптатах с использованием БЛ и в интактных тканях клеток, помеченных наночастицами, не обнаружено (рис. 7).

Полученные результаты свидетельствуют об участии клеток БЭ в восстановлении поврежденной ткани уретры, что согласуется с литературными данными (Barbagli et al., 2015; Glybochko et al., 2015; Chapple, 2019). Разработанный двухслойный скаффолд ПЛК-ПЛГ обеспечивал механическую прочность конструкции, а различия в скорости деградации слоев (Orchel et al., 2013; Xie et al., 2015), позволили ему осуществить барьерную функцию и сохранить жизнеспособность клеток. Таким образом, приготовленная ТИК, засеянная клетками БЭ, продемонстрировала терапевтическую эффективность, сопоставимую с таковой при использовании аутологичного БЛ и может стать многообещающей альтернативой для уретропластики с использованием БЛ.

Окончательное лечение стриктур уретры остается одной из самых сложных проблем в урологии. Несмотря на положительный результат применения разработанной ТИК следует учитывать возможность возникновения повторных стриктур и фиброза в ре-

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020



Рис. 6. Гистологическая оценка реконструированной ткани уретры кролика через 12 нед после операции. Окраска гематоксилин–эозин. Контроль – уретра интактного кролика. *Масштабная линейка:* 200 мкм.

конструированном участке уретры на поздних сроках наблюдения (Bhargava et al., 2008; Patterson et al., 2011; Osman et al., 2014; Simsek et al., 2018). В урологическом научном мире до сих пор нет единого представления о принципах и тактике лечения больных со стриктурами уретры. Наличие на данный момент многочисленных методик и техник реконструктивных операций на уретре говорят о сложности, недостаточной изученности и несовершенстве данного раздела реконструктивной хирургии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Получение суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, оценка *in vitro* цитотоксических свойств наносуспензии с применением клеток БЭ производились при поддержке проекта РФФИ № 20-38-70039. Эксперименты *in vivo* по изучению терапевтической эффективности ТИК в реконструкции повреждений уретры у животных выполнялись в рамках государственного задания (№ 0103-2019-0012).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н "Об утверждении правил надлежащей клинической практики", приказом N 512н от 8 августа 2018 г. "Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами" (ГОСТ Р 33044-2014), ГОСТ 33216-2014 "Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами" и ГОСТ Р 33044-2014 "Принципы надлежащей лабораторной практики".

Таблица 1. Морфометрический анализ реконструированной уретры
--

Показатель	Группа		
	ТИК + БЭ	БЛ	Контроль
Толщина эпителия, мкм	44.0 ± 3.4	43.3 ± 1.2	46.7 ± 2.4
Толщина слизистой оболочки, мкм	456.7 ± 23.7	443.3 ± 62.6*	462.7 ± 15.2
Количество сосудов в слизистой оболочке на 1 мм ²	$11.3 \pm 0.2*$	11.7 ± 1.0	10.6 ± 0.2
Диаметр сосудов слизистой оболочки, мкм	28.3 ± 1.2	26.7 ± 2.4	28.3 ± 2.4
Толщина мышечной оболочки, мкм	2616.7 ± 112.9	2546.7 ± 118.3	2666.7 ± 170.6
Степень фиброза, баллы	$1.3 \pm 0.2^{*}$	$1.0 \pm 0.0^*$	0.0 ± 0.0

Примечание: * – достоверные отличия от контрольной группы интактных кроликов ($P \le 0.05$).



Рис. 7. Выявление клеток БЭ, меченных наночастицами, в восстановленной стенке уретры. Клетки, содержащие наночастицы (*красный цвет*) были обнаружены в слое уротелия. Конфокальная микроскопия (Olympus FV3000, Япония). Контроль — уретра интактного кролика. Ядра окрашивали DAPI (*синий цвет*) и детектировали с использованием диодного лазера (405 нм). Наночастицы были обнаружены сканированием отраженным лазером при 504 нм (*красный цвет*). Криосрезы были дополнительно окрашены с помощью специфических антител против уротелия (Anti-cytokeratin AE1/AE3) (*верхний ряд, зеленый цвет*) и антител против гладкомышечных клеток (αSMA) (*нижний ряд, зеленый цвет*). *Масштабная линейка: верхний ряд* – 50 мкм, нижний ряд – 100 мкм.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борзенок С.А., Герасимов М.Ю., Островский Д.С., Малюгин Б.Э. 2019. Культивирование клеток эпителия слизистой губы человека для аутологичной трансплантации при двустороннем синдроме лимбальной недостаточности роговицы. Вестник трансплантологии и искусственных органов. Т. 21. № 3. С. 111. (*Borzenok S.A., Gerasimov M.Yu., Ostrovskiy D.S., Malyugin B.E.* 2019. Cell culture technique for human labial mucosal epithelium for use in patients with bilateral limbal stem cell deficiency. Bulletin of transplantology and artificial organs. V. 21. № 3. Р. 111.)
- Atala A., Danilevskiy M., Lyundup A., Glybochko P., Butnaru D., Vinarov A., Yoo J.J. 2017. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: Clinical and preclinical studies. J. Tissue Eng. Regen. Med. V. 11. P. 3.
- *Barbagli G., Lazzeri M.* 2015. Clinical experience with urethral reconstruction usingtissue-engineered oral mucosa: a quiet revolution. Eur. Urol. V. 68. P. 917.
- Barbagli G., Fossati N., Larcher A., Montorsi F., Sansalone S., Butnaru D., Lazzeri M. 2017. Correlation between primary hypospadias repair and subsequent urethral strictures in a series of 408 adult patients. Eur. Urol. Focus. V. 2. P. 287.
- Bharadwaj S., Liu G., Shi Y., Wu R., Yang B., He T., Zhang Y. 2013. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: Potential for therapeutic applications in urology. Stem Cells. V. 31. P. 1840.

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

- Bhargava S., Patterson J.M., Inman R.D., MacNeil S., Chapple C.R. 2008. Tissue-engineered buccal mucosa urethroplastyclinical outcomes. Eur. Urol. V. 53. P. 1263.
- *Chapple C.* 2019. Tissue engineering of the urethra: where are we in 2019? World J. Urol.
 - https://doi.org/10.1007/s00345-019-02826-3
- Cheng L., Li S., Wang Z., Huang B., Lin J. 2018. A brief review on anterior urethral strictures. Asian J. Urol. V. 5. P. 88.
- Cromer Berman S.M., Walczak P., Bulte J.W. 2011. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. V. 3. P. 343.
- Culenova M., Ziaran S., Danisovic L. 2019. Cells involved in urethral tissue engineering: systematic review. Cell Transplantat.

https://doi.org/10.1177/0963689719854363

- Fu Q., Deng C.L., Liu W., Cao Y.L. 2007. Urethral replacement using epidermal cellseeded tubular acellular bladder collagen matrix. BJU Int. V. 99. P. 1162.
- Gallegos M.A., Santucci R.A. 2016. Advances in urethral stricture management. F1000Research. V. 5. P. 2913. https://doi.org/10.12688/f1000research.9741.1
- Glybochko P.V., Aljaev J.G., Nikolenko V.N., Shehter A.B., Vinarov A.Z., Istranov L.P., Istranova E.V., Abojanc R.K., Ljundup A.V., Danilevskij M.I., Guller A.E., Elistratov P.A., Butnaru D.V., Kantimerov D.F., Mashin G.A. et al. 2015. Tissue-engineered substitution urethroplasty based on decellularized vascular matrix and autologous cells of the buccal mucosa: the first experience. Urologiia. V. 3. P. 4.
- *Kim J.H., Lee H.J., Song Y.S.* 2015. Tracking transplanted stem cells using magnetic resonance imaging and the nanoparticle labeling method in urology. Biomed. Res. Int. 231805.
- Lazzeri M. Guazzoni G., Sansalone S., Barbagl G. 2016. Incidence, causes, and complications of urethral stricture disease. Eur. Urol. Suppl. V. 15. P. 2.
- Liu Y., Ma W., Liu B., Wang Y., Chu J., Xiong G., Wei G. 2017. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model. Stem Cell Res. Ther. V. 8. P. 63.
- Orchel A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzynski P., Marcinkowski A., Pamula E., Orchel J., Bielecki I., Kulczycka A. 2013. The influence of chain microstructure of biodegradable copolyesters obtained with low-toxic zirconium initiator to in vitro biocompatibility. Biomed. Res. Int. https://doi.org/10.1155/2013/176946
- *Osman N.I., Patterson J.M., MacNeil S., Chapple C.R.* 2014. Long-term follow-up after tissue-engineered buccal mucosa urethroplasty. Eur. Urol. V. 66. P. 790.
- Patterson J.M., Bullock A.J., MacNeil S., Chapple C.R. 2011. Methods to reduce the contraction of tissue-engineered buccal mucosa for use in substitution urethroplasty. Eur. Urol. V. 60. P. 856.
- Ramos-Gomez M, Martinez-Serrano A. 2016. Tracking of ironlabeled human neural stem cells by magnetic resonance imaging in cell replacement therapy for Parkinson's disease. Neural. Regen. Res. 11(1): 49–52.

- Santucci R.A., Joyce G.F., Wise M. 2007. Male urethral stricture disease. J. Urol. V. 177. P. 1667.
- Sievert K.D., Bakircioglu M.E., Nunes L., Tu R., Dahiya R., Tanagho E.A. 2000. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. J. Urol. V. 163. P. 1958.
- Simsek A., Aldamanhori R., Chapple C.R., MacNeil S. 2018. Overcoming scarring in the urethra: challenges for tissue engineering. Asian J. Urol. V. 5. P. 69.
- Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Dobrodumov A.V., Marchenko Y.Y., Guzhova I.V. 2015a. Brain tumor magnetic targeting and biodistribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles linked with 70-kDa heat shock protein study by nonlinear longitudinal response. J. Magn. Magn. Mater. V. 388. P. 123.
- Shevtsov M, Nikolaev B, Ryzhov V. 20156. Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 monoclonal antibody (SPION-cmHsp70.1). Nanoscale. V. 7. P. 20652.
- Shevtsov M, Nikolaev B, Ryzhov V. 2016. Detection of experimental myocardium infarction in rats by MRI using heat shock protein 70 conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticle. Int. J. Nanomedicine. V. 12. P. 611.
- *Vaddi S.P., Reddy V.B., Abraham S.J.* 2019. Buccal epithelium expanded and encapsulated in scaffold-hybrid approach to urethral stricture (BEES-HAUS) procedure: A novel cell therapy-based pilot study. Int. J. Urol. V. 26. P. 253.
- Vaegler M., Maurer S., Toomey P., Amend B., Sievert K.D. 2015. Tissue engineering in urothelium regeneration. Adv. Drug Deliv. Rev. V. 82. P. 64.
- Versteegden L.R.M., de Jonge P.K.J., IntHout J., van Kuppevelt T.H., Oostervijk E., Feitz W.F.J., Daamen W.F. 2017. Tissue engineering of the urethra: A systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. Eur. Urol. V. 72. P. 594.
- Xie Y., Park J., Kang S. 2015. Studies on the effect of molecular weight on the degradation rate of biodegradable polymer membrane. Adv. Sci. Technol. Lett. V. 120 (GST). P. 390. https://doi.org/10.14257/ast1.2015.120.74
- Yudintceva N.M., Nazhchekina Y.A., Blinova M.I., Orlova N.V., Muraviov A.N., Vinogradova T.I., Sheykhov M.G., Shapkova E.Y., Emeljannikov D.V., Yablonskii P.K., Samusenko I.A., Mikhrina A.L., Pakhomov A.V., Shevtsov M.A. 2016. Experimental bladder regeneration using poly-L-lactide/silk fibroin (PL-SF) scaffold seeded with nanoparticle labelled allogenic bone marrow stromal cells. Int. J. Nanomedicine. V. 11. P. 4521.
- Yudintceva N.M., Bogolyubova I.O., Muraviov A.N., Sheykhov M.G., Vinogradova T.I., Sokolovich E.G., Samusenko I.A., Shevtsov M.A. 2018. Application of the allogenic mesenchymal stem cells in the therapy of the bladder tuberculosis. J. Tissue Eng. Regen. Med. V. 12. P. e1580.

ЦИТОЛОГИЯ том 62 № 4 2020

276

APPLICATION OF THE TISSUE-ENGINEERING CONSTRUCTION SEEDED WITH BUCCAL CELLS FOR SUBSTITUTE URETROPLASTY

N. M. Yudintceva^{*a*, *}, Y. A. Nashchekina^{*a*}, M. A. Shevtsov^{*a*, *b*}, N. A. Mikhailova^{*a*}, T. I. Vinogradova^{*c*}, A. A. Gorelova^{*c*, *d*}, I. A. Samusenko^{*e*}, and A. N. Muraviov^{*c*}

^aInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

^bFirst Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, 197022 Russia

^cSaint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, 191036 Russia

^dSaint-Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^eFederal State Budgetary Institute "The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine"

(Ministry of Russian Federation for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters),

St. Petersburg, 197374 Russia

*e-mail: yudintceva@mail.ru

One of the main problems of urology remains the treatment of urethral stricture. The method of treating these pathologies is surgical, in which various tissues of the patient are used as substituted material. Using a buccal flap currently has the best results. However, this type of plastic surgery has a number of disadvantages that can be eliminated using alternative materials developed using tissue engineering methods. In present work, a tissue-engineering construct based on a two-layer polymer scaffold seeded with buccal cells was developed and prepared. Urethrography data and histological analysis demonstrated the recovery of damaged rabbit urethral tissue with preservation of the lumen and structural integrity of the urethra. The prepared tissue-engineering construct had therapeutic efficacy comparable to that of using an autologous buccal flap and can be a promising alternative material for urethroplasty.

Keywords: buccal epithelium, buccal flap, nanoparticles, scaffold, stricture, tissue engineering construct, urethroplasty