

**Горелова Анна Андреевна**

**Заместительная уретропластика тканеинженерными конструкциями  
(экспериментальное исследование)**

14.01.17 – хирургия

14.01.23 – урология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Санкт – Петербург

2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Петр Казимирович Яблонский**

кандидат медицинских наук **Александр Николаевич Муравьев**

**Официальные оппоненты:**

**Зиновьев Евгений Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, отдел термических поражений, руководитель

**Котов Сергей Владиславович**, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра урологии и андрологии лечебного факультета, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» декабря 2020 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д208.092.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4, тел. (812) 775-75-55). С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте [www.spbniif.ru](http://www.spbniif.ru) федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. (812) 775-75-55).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Виноградова Татьяна Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** К наиболее частым патологиям мочеиспускательного канала у мужчин, требующим хирургического лечения, 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, влагиалищную оболочку яичка, слизистую оболочку щеки. 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 или синтетического 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, 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 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 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.

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; Yudintceva 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, Google Patent, EPATIS, Patentoscope. 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 матриксов (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 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 буккального 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.** 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. Скаффолды 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 биodeградации 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 фиброобразования тканей в области хирургического интереса, а также уменьшения травматичности и длительности хирургического вмешательства.

**Степень достоверности и апробация результатов работы.** Достоверность проведенного исследования определяется достаточным числом наблюдений (41 лабораторных животных) и применением адекватных методов статистического анализа.

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).

**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 рисункам.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

Исследование двухэтапное, экспериментальное, контролируемое, выполнено на базе вивария ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России и ИНЦ РАН. 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).

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 Юлией Александровной Нащединой и кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Наталией Михайловной Юдинцевой.

Все животные были получены из федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «Рапполово» федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»», содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России согласно СанПиН 2.2.1.3218 – 14 и ГОСТ 33215-2014.

Критерием исключения экспериментальных животных из исследования был летальный исход в течение двух месяцев после хирургического вмешательства. Выделили следующие методы оценки эффективности: выживаемость животных; оценка лучевых данных: уретрографии; макроскопическая оценка паренхиматозных органов и лимфатических узлов; макроскопическая оценка зоны хирургического вмешательства: морфологическая и морфометрическая оценка; сканирующая атомно-силовая микроскопия; конфокальная микроскопия криосрезов тканей в зоне хирургического вмешательства.

В исследовании использовано два вида скаффолдов: для МСК использовали пористую матрицу, состоящую из пористого поли-(D, L)-лактида (ПЛ) и поликапролактона (ПК); для уретропластики с использованием КБЭ был изготовлен двухслойный скаффолд на основе поли-L-лактид-капролактона (ПЛК) (70/30) и поли-L-лактид-гликолида (ПЛГ).

Стерилизацию скаффолдов выполняли методом озонирования. Для анализа строения скаффолда, оценки водонепроницаемости выполнялась сканирующая электронная микроскопия (SEM) (FE-SEM; JSM-6340F, JEOL, Tokyo, Japan). 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. Изучение биодegradации применяемых скаффолдов произведено на 10 крысах-самцах линии Wistar. Подкожно им имплантированы скаффолды на основе ПЛ+ПК и ПЛК+ПЛГ. Крыс выводили из эксперимента через 1 и 4 недели (по 5 крыс в каждый срок соответственно), выполняли макроскопическую оценку и гистологическое исследование зон имплантации скаффолдов.



На втором 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.

Для получения культуры МСК 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. Из аспирата были выделены МСК, которые культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку и раствор гентамицина (Gibco, Великобритания) 50 мкг/мл. 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. Клетки культивировали в течение трех недель с использованием специальных питательных сред для остеогенной, хондрогенной и адипозогенной дифференцировок.

Для получения культуры КБЭ выполнялась биопсия 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. Ткань транспортировали в среде DMEM (Биолот, Россия). Выделение клеток выполняли по методу культивирования эксплантатов (Борзенко С.А. 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. Оценку миграции клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100, Япония, фиксировали на фотокамеру. После достижения клетками 80-90% конfluентности 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 иммунофлюоресцентный анализ. 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 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°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 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SPION). Клетки, достигшие состояния монослоя, инкубировали с SPION. 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) проанализирована цитотоксичность наночастиц. Использован набор Vybrant® МТТ в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies, США). Выявление иммунофлюоресценции 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).

Выращенные культуры клеток заселяли на скаффолды. Меченные наночастицами МСК ( $2 \times 10^6$ /мл в 400 мкл среды) высевали на внутренний пористый слой скаффолда и инкубировали в увлажненном воздухе, с содержанием CO<sub>2</sub> 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 mM L глутамин и 50 мкг/мл раствор гентамицина. 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 наносили на поверхность внутреннего слоя скаффолда ПЛК-ПЛГ 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.

Ход хирургического вмешательства выглядел следующим образом: 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 заведен в

полость мочевого пузыря, баллон раздут на 1,5 мл. Произведен продольный разрез кожи полового члена длиной 3 см по вентральной поверхности, тупым и острым путем дорсолатерально 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. Букальный графт был очищен от подлежащей клетчатки и 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. Асептическая наклейка.

Контроль массы тела животных производился трехкратно: в день забора биоптата, в день проведения уретропластики и в день выведения животного из эксперимента. На третьи сутки удаляли уретральный катетер. После эвтаназии всем животным проводилась ретроградная уретрография, при которой учитывались следующие параметры: проходимость уретры, наличие или отсутствие сужения, дивертикула, а также экстравазации контрастного вещества. Производили макроскопическая оценка препарата – визуализация зоны имплантации и непосредственно ТИК, участка сужения, наличие дивертикула или свища.

После окончания клинической фазы эксперимента 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 и гистохимических препаратов с толщиной серийных парафиновых срезов 3-5 мкм. Гистологическое исследование выполнялось на базе патологоанатомического отделения федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России врачом-патологоанатомом, кандидатом медицинских наук Игорем Алексеевичем Самусенко. 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. 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).

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.

### **Результаты исследования**

**Изучение механических свойств скаффолдов и их биодegradации.** Результаты первого этапа исследования показали, что скаффолды на основе ПЛ+ПК и ПЛГ+ПЛК имеют механические характеристики, сопоставимые с соответствующими характеристиками нативной уретры кролика, описанными Feng С. и соавторами (2010). Эти данные представлены в табл.1. Однако при их сравнении скаффолды на основе ПЛГ+ПЛК обладают большей прочностью и упругостью.

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

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

Для оценки токсичности *in vitro* материалов ПЛК+ПЛГ и ПЛ+ПК, используемых в основе скаффолдов, определяли жизнеспособность стандартизированной культуры мезенхимных стволовых клеток в условиях их культивирования на синтезированных полимерных пленках. Через сутки культивирования МСК 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.

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.

**Исследования тканеинженерных конструкций.** 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 «булыжной 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 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

**Оценка длительности операций.** Учитывая малое количество наблюдений ( $n=4$ ) в группе «буккальной пластики», для сравнения продолжительности операции при межгрупповом сравнении использовался критерий Краскала-Уоллеса. Продолжительность операции в группе № 3, которым выполнена буккальная пластика, статистически значимо больше, чем в группах № 1 и № 2, в которых использованы изучаемые тканеинженерные конструкции ( $p=0,004$ ).

**Оценка массы тела животных.** При оценке массы тела животных во всех группах в течение трех месяцев после операции наблюдался прирост массы тела. Это позволяет говорить о том, что использование изучаемых тканеинженерных конструкций и буккального графта, вероятно, не приводит к катаболическим процессам.

**Результаты уретрографии.** Для оценки состояния уретры в послеоперационном периоде всем кроликам после эвтаназии была выполнена ретроградная уретрография. Во всех трех группах проходимость уретры сохранена, сужений и дивертикулов не выявлено. Данные уретрографии представлены на рис. 1.

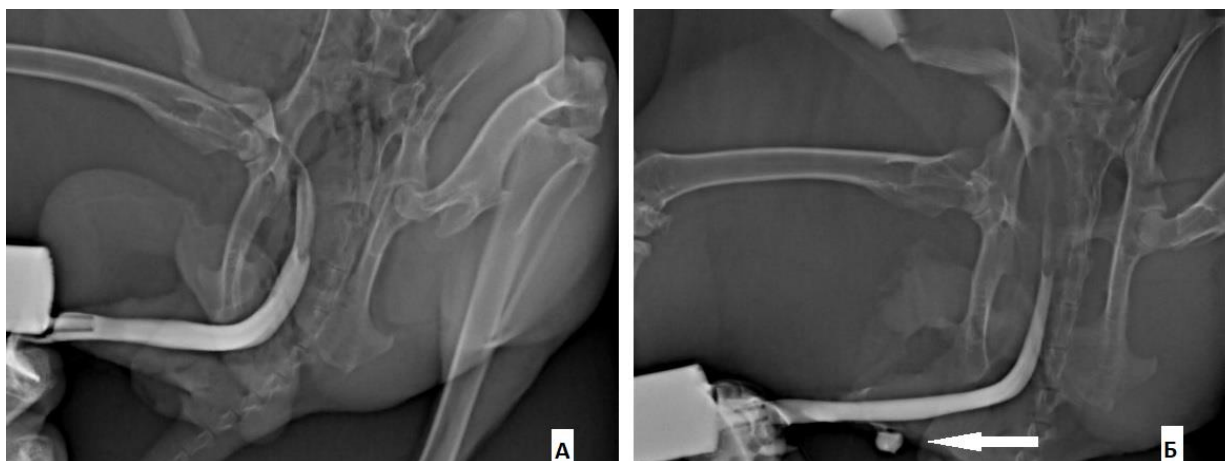


Рисунок 1 – Ретроградные уретрограммы: А – просвет уретры сохранен, Б – экстравазация контрастного вещества за пределы просвета уретры

Рисунок демонстрирует полную проходимость уретры, сужений и дивертикулов не выявлено (рис. 1А, 1Б). У двух кроликов, у которых ранее был диагностирован уретро-кожный свищ (группа № 2), визуализировалась экстравазация контрастного вещества за пределы просвета уретры (рис. 1Б).

**Макроскопическая оценка зоны имплантации.** При макроскопической оценке зоны имплантации ни в одной группе не было выявлено отторжения имплантата, сужений и дивертикулов уретры (рис. 2).

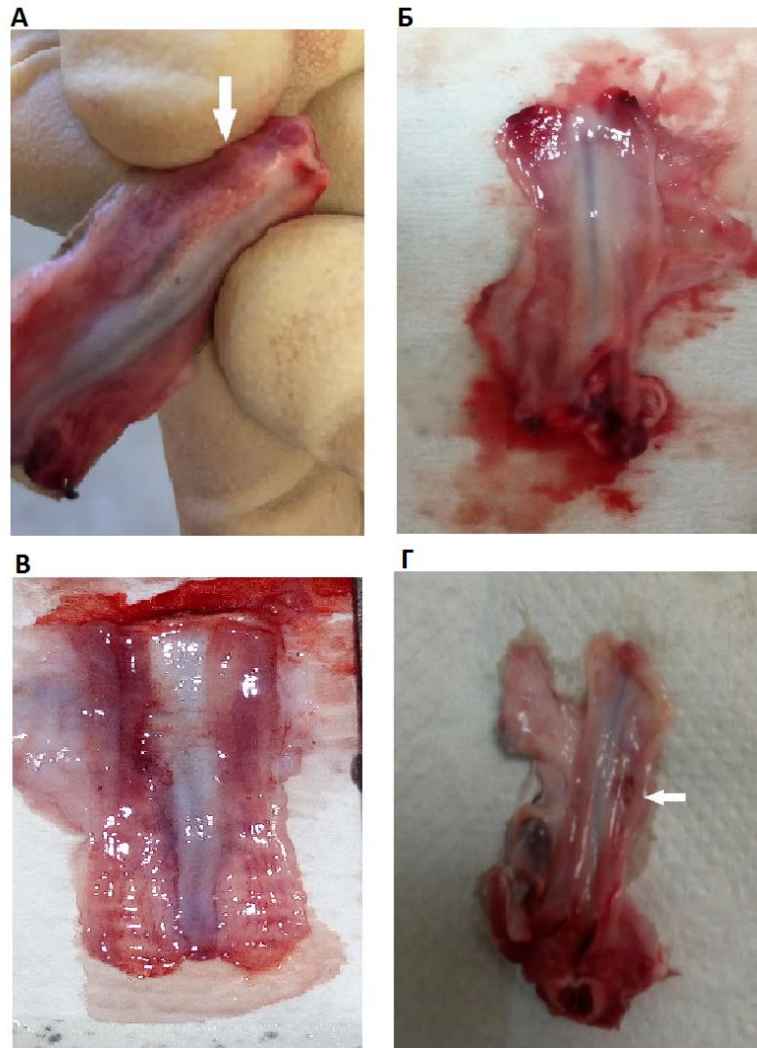


Рисунок 2 – Макропрепараты уретры кролика: А – визуализация зоны имплантации ТИК (группа № 1); Б – зона имплантации ТИК не визуализирована (группа № 2); В – визуализация буккального графта; Г – уретро-кожный свищ

В 1 и 2 группах через 1 и 2 месяца после хирургического вмешательства у всех кроликов визуализировали зону имплантации. 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.

**Результаты морфологических и морфометрических исследований.** Результаты морфологического исследования в группе №1 (имплантация скаффолда на основе ПЛ+ПК с МСК) на сроке 3 месяца после хирургического вмешательства представлены на рис. 3.

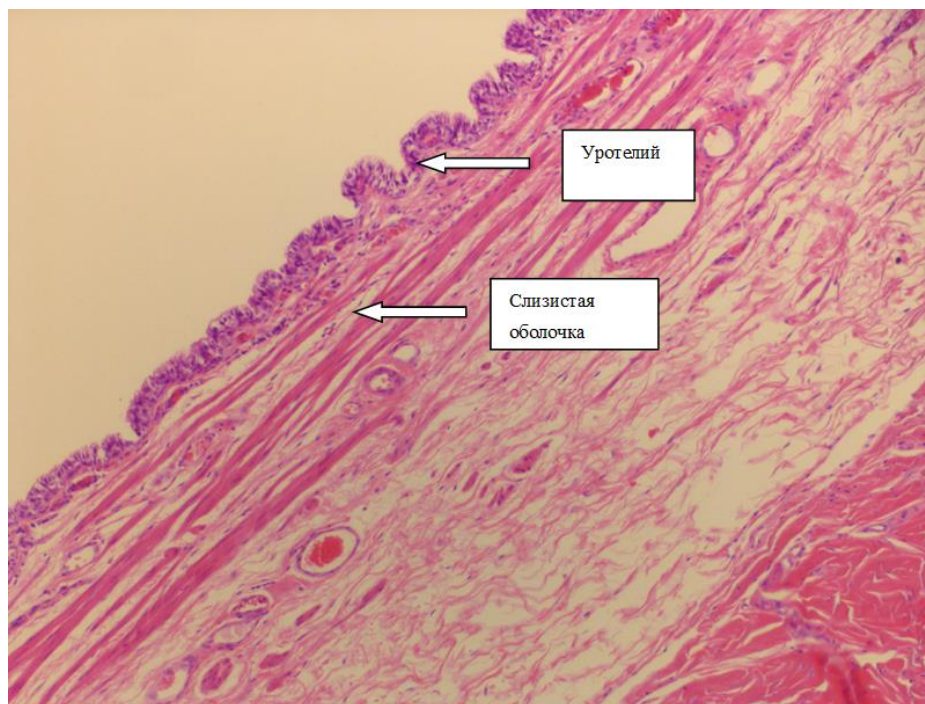


Рисунок 3 – Уретра кролика группы № 1, через 3 мес. после операции. Эпителизованная поверхность уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизована, без повреждения и образована уротелием (переходным эпителием) и собственной пластинкой слизистой, которая состояла из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Толщина переходного эпителия 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 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. Результаты морфологического исследования в группе №2 (ТИК на основе ПЛГ+ПЛК с КБЭ) через 3 месяца после уретропластики представлены на рис.4.



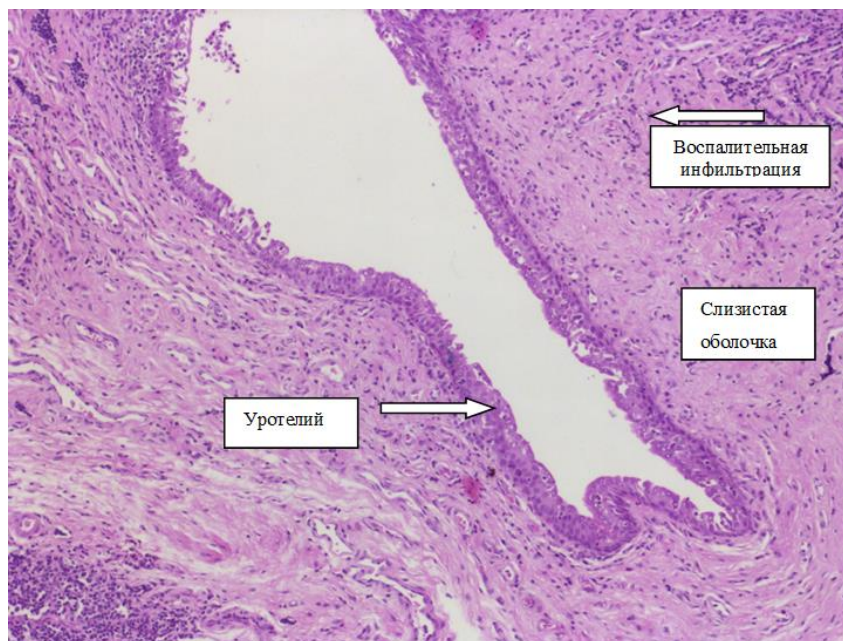


Рисунок 4 – Уретра кролика группы № 2, через 3 мес. после операции. Эпителизованная поверхность уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

Слизистая оболочка на всем протяжении была эпителизована, 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 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 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 слабо выражен и составлял  $1,0 \pm 0,0$  баллов, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая представлена лимфоцитами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Результаты морфологического исследования в группе № 3 (буккальная пластика) через 3 месяца после хирургического вмешательства представлены на рис. 5.

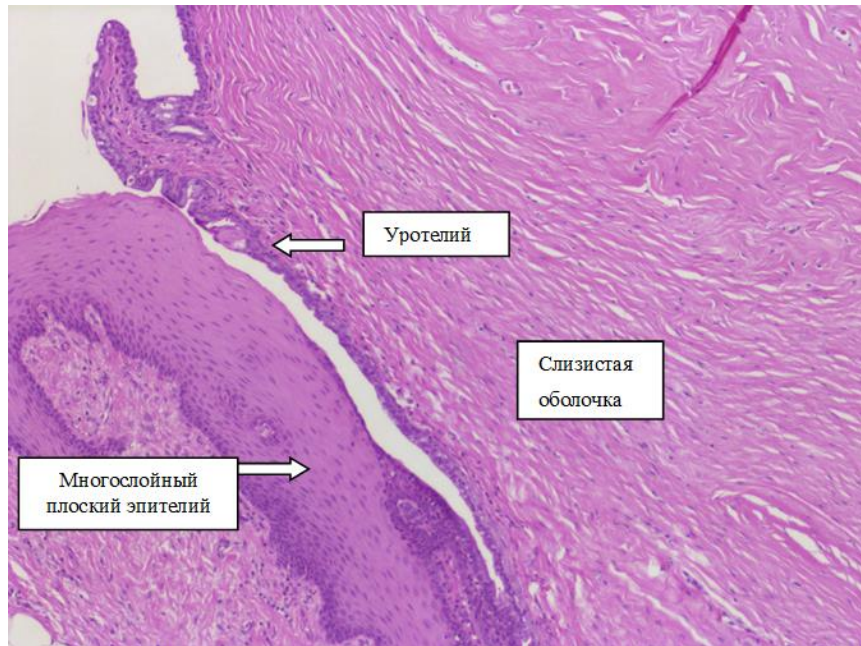


Рисунок 5 – Уретра кролика группы № 3, через 3 мес. после операции. Эпителизованная поверхность многослойным плоским эпителием и уротелием. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

Слизистая оболочка на всем протяжении эпителизована, 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 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 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 умеренно выражен –  $2,0 \pm 0,4$  балла, наблюдалась слабо выраженная воспалительная инфильтрация, которая 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 мезенхимальными стволовыми клетками – фиброз отсутствовал. В обеих группах, в которых использовались тканеинженерные конструкции, наблюдалась дифференцировка в сторону уротелия («феномен пластичности»).

**Результаты конфокальной микроскопии криосрезов.** Производилась оценка SPION-меченых мезенхимных стволовых клеток и клеток буккального эпителия при помощи конфокальной микроскопии. Результаты исследования показали наличие солокализации меченных наночастицами МСК с окрашенным цитокератином AE1 / AE3 уротелием, что доказывает возможность дифференцировки МСК в неоуротелиальные клетки, в мышечном слое солокализации не наблюдалось (рис. 6).

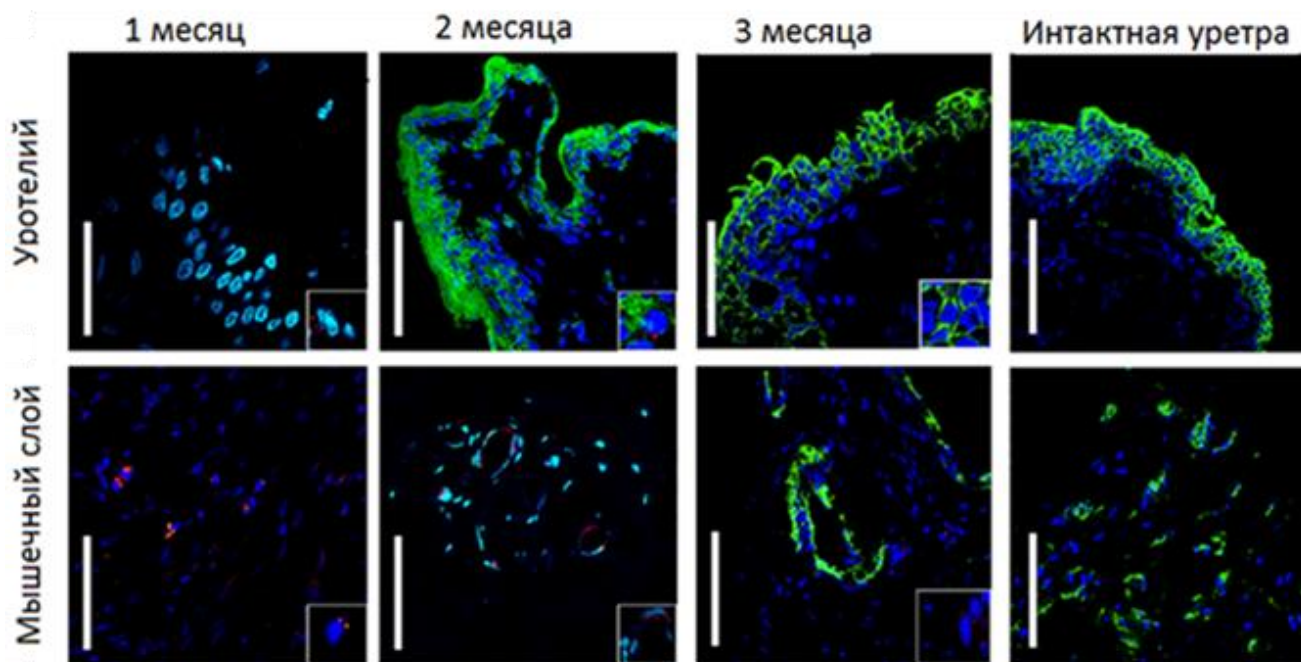


Рисунок 6 – Конфокальная микроскопия, визуализация наночастиц в слизистом слое на разных сроках после имплантации ТИК с МСК, 100µm

Солокализация окрашенных и содержащих наночастицы клеток буккального эпителия свидетельствует о возможной их дифференцировки в неоуротелиальные клетки (рис. 7). Подобной солокализации в мышечном слое не обнаружено. В биоптатах группы №3 и в intactных тканях, клеток, меченных наночастицами не обнаружено.

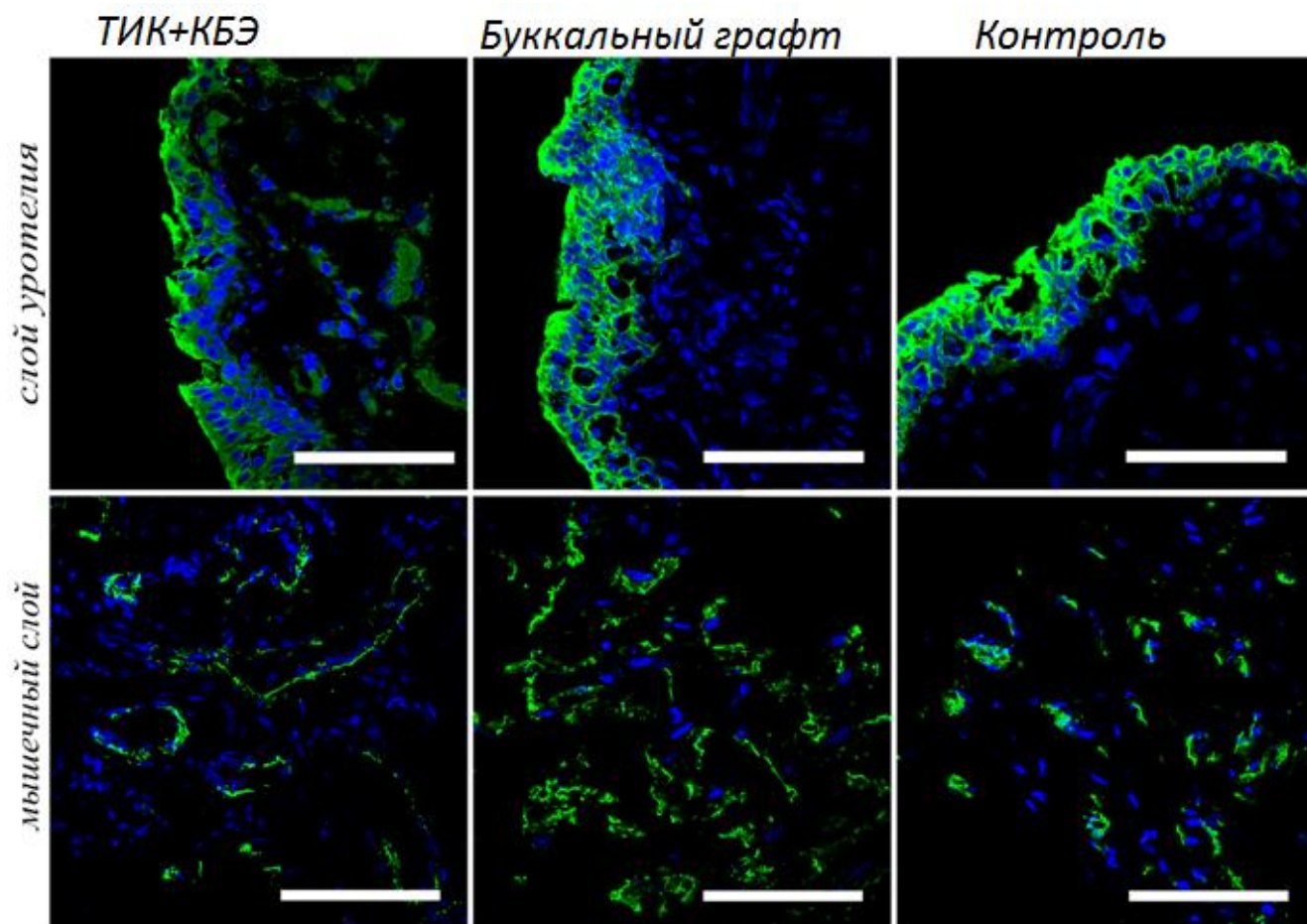


Рисунок 7 – Конфокальная микроскопия, визуализация наночастиц в слизистом слое через 12 недель после имплантации ТИК с КБЭ, 100µm

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

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.

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.

При макроскопической оценке зоны имплантации ни в одной группе не было 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 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 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.

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 мезенхимальными стволовыми клетками – фиброз отсутствовал. В обеих группах, в которых использовались тканеинженерные конструкции, наблюдалась дифференцировка в сторону уротелия («феномен пластичности»).

Полученные при помощи конфокальной микроскопии криосрезов уретры 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 биодеградации 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 опубликованных работ по теме диссертации

#### Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук

1. Тканеинженерные технологии в реконструкции уретры / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, Н.М. Юдинцева, Н.В. Орлова, Ю.А. Нащекина, М.Г. Хотин, А.А. Лебедев, Н.О. Пешков, П.К. Яблонский // Медицинский альянс. – 2018. – № 3. – С. 75-82.
2. Современные подходы к диагностике и лечению стриктур уретры: обзор литературы и собственный опыт / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, М.Г. Хотин, Н.В. Орлова, А.А. Лебедев, Е.Г. Соколович, П.К. Яблонский // Инновационная медицина Кубани. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 71-77.
3. Использование тканеинженерной конструкции, заселенной клетками буккального эпителия, для заместительной уретропластики / Н.А. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, М.А. Шевцов, Н.А. Михайлова, Т.И. Виноградова, **А.А. Горелова**, И.А. Самусенко, А.Н. Муравьев // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 4. – С. 266-277.
4. Заместительная уретропластика тканеинженерными конструкциями в эксперименте / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, И.А. Самусенко, П.К. Яблонский // Урологические ведомости. – 2020. – Т. 10, № 3. – С. 201-208.

#### Работы, опубликованные в других изданиях

5. Тканеинженерные технологии в экспериментальной реконструкции уретры / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Н.М. Юдинцева, Т.И. Виноградова, Н.В. Орлова, Ю.А. Нащекина, А.А. Лебедев, С.В. Попов, И.Н. Орлов, П.К. Яблонский // Гены и Клетки. – 2018. – № S1. – С. 57-58.
6. Использование методов тканевой инженерии и клеточной терапии для реконструкции органов мочевыделительной системы / Н. Юдинцева, Ю. Нащекина, М. Блинова, М. Шевцов, А. Муравьев, Н. Орлова, Т. Виноградова, **А. Горелова**, М. Шейхов, А. Горелов, И. Самусенко, Б. Николаев, Л. Яковлева, Н. Михайлова // Материалы межинститутской конференции по результатам проектов, поддержанных Российским научным фондом «Современные проблемы физико-химической и клеточной биологии: от молекул к живым системам» 24-25 октября 2018 г., ИБХ РАН. – С. 38.
7. Application of the Tissue-Engineering Graft for the Urethra Reconstruction / N. Yudincheva, Y. Nashchekina, T. Vinogradova, **A. Gorelova**, A. Muraviov, B. Nikolaev, N. Mikhailova // Онтогенез. – 2018. – Т. 49, № 4S. – С. 51-52.
8. Тканевая инженерия и клеточная терапия для репарации органов мочевыделительной системы / А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, Н.В. Орлова, **А.А. Горелова**, М.Г. Шейхов, А.И. Горелов, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, А.А. Лебедев, М.И. Блинова, М.А. Шевцов, И.А. Самусенко // Медицинский альянс. – 2018. – № S3. – С.137-138.
9. Реконструкция уретры тканеинженерными конструкциями в эксперименте / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Н.М. Юдинцева, Т.И. Виноградова, Н.В. Орлова, Ю.А. Нащекина, А.А. Лебедев, С.В. Попов, И.Н. Орлов, П.К. Яблонский // Медицинский альянс. – 2018. – № S3. – С. 49-50.

10. Применение тканеинженерных конструкций в уретральной хирургии в эксперименте / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, П.К. Яблонский // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. - №5. – С. 75-76.
11. Экспериментальная пластика уретры тканеинженерными конструкциями / **А.А. Горелова**, А.Н. Муравьев, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, Т.И. Виноградова, А.И. Горелов, П.К. Яблонский // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, № S1. – С. 67.
12. Использование методов тканевой инженерии для реконструкции уретры / Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, М.А. Шевцов, **А.А. Горелова**, Т.И. Виноградова, А.Н. Муравьев, И.А. Самусенко // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14, № 3. – С. 122.
13. Применение тканеинженерных конструкций на основе полилактида и поликапролактона при заместительной уретропластике в эксперименте / **А.А. Горелова**, Н.М. Юдинцева, Ю.А. Нащекина, А.А. Муртузалиева, Т.И. Виноградова // Медицинский альянс. – 2019. – № S3. – С. 77-78..
14. Urethroplasty with a bilayered poly-D, L-lactide-co-ε-caprolactone scaffold seeded with allogenic mesenchymal stem cells / N.M. Yudintceva, Y.A. Nashchekina, N.A. Mikhailova, T.I. Vinogradova, P.K. Yablonsky, **A.A. Gorelova**, A.N. Muraviov, A.I. Gorelov, I.A. Samusenko, B.P. Nikolaev, L.Y. Yakovleva, M.A. Shevtsov // Journal of Biomedical Materials Research – Part B: Applied Biomaterials. – 2020. – Vol. 108, Issue 3. – P. 1010-1021.

#### Список сокращений и условных обозначений:

КБЭ – клетки буккального эпителия  
 МСК – мезенхимные стволовые клетки  
 ПК – поликапролактон  
 ПЛ – поли-L,L,-лактид  
 ПЛГ – поли-L-лактид-гликолид  
 ПЛК – поли-L-лактид-капролактона  
 ТИК – тканеинженерная конструкция  
 SPION – superparamagnetic iron oxide nanoparticles