

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

На правах рукописи

Орлова Надежда Валерьевна

Замещение дефекта мочевого пузыря с использованием тканеинженерных
конструкций, содержащих аллогенные клетки
(экспериментальное исследование)

14.01.24 – «трансплантология и искусственные органы»

14.01.23 – «урология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор Петр Казимирович Яблонский,
кандидат медицинских наук
Александр Николаевич Муравьев

Санкт – Петербург 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Реконструктивная хирургия мочевого пузыря: существующие проблемы и способы их решения.....	13
1.2 Биоматериалы, подходящие для реконструкции мочевого пузыря.....	17
1.2.1 Скаффолды на основе коллагена.....	17
1.2.2 Децеллюляризованные матрицы.....	18
1.2.3 Синтетические и комбинированные скаффолды.....	21
1.3 Типы стволовых клеток и их источники.....	24
1.4 Клеточные технологии и тканевая инженерия в урологии.....	25
1.4.1 Опыт создания мочевого резервуара с использованием клеточных технологий.....	27
1.5 Аллогенный клеточный продукт в регенеративной медицине и предпосылки его использования для реконструкции мочевого пузыря.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	37
2.1 Общая характеристика материала и методов исследования.....	37
2.2 Этап <i>in vitro</i> . Создание матриц и заселение их клетками.....	39
2.2.1 Создание матриц.....	39
2.2.2 Выделение и идентификация клеток.....	40
2.3 Имплантация многокомпонентного композита в эксперименте <i>in vivo</i>	44
2.3.1 Характеристика лабораторных животных.....	44
2.3.2 Предварительный этап. Изучение скорости биodeградации поли-L,L-лактида.....	45
2.3.2 Протокол оперативного вмешательства.....	47

2.3.4 Период наблюдения и эвтаназия	49
2.3.5 Методы оценки эффективности	50
2.4 Статистическая обработка полученных данных	55
ГЛАВА 3. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И РЕЗОРБТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРА ПОЛИ-L,L-ЛАКТИДА И КОМПОЗИТНЫХ МАТРИЦ НА ЕГО ОСНОВЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ	56
3.1 Скорость биodeградации скаффолдов разного типа	57
3.2 Сравнительная характеристика различных типов матриц	59
ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ КОМПОЗИТНОЙ МАТРИЦЫ И АЛЛОГЕННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ	62
4.1 Оценка ёмкости мочевого пузыря кроликов до операции и к концу периода наблюдения	62
4.2 Оценка выраженности воспалительной реакции	64
4.3 Оценка места имплантации. Макроскопическое исследование	65
4.4 Оценка места имплантации. Гистологическое исследование	71
ГЛАВА 5. ДИНАМИКА КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ОТВЕТ НА ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА РАЗРАБОТАННОЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ	75
5.1 Течение периода наблюдения	75
5.2 Динамика массы тела	76
5.3 Лабораторные данные	76
5.4 Данные патоморфологического исследования	80

ГЛАВА 6. ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ IN SITU ВВЕДЕННЫХ В ОБЛАСТЬ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ АЛЛОГЕННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В СОСТАВЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЧЕРЕЗ 2.5 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ	82
6.1 Данные магнитно-резонансной томографии.....	82
6.2 Данные электромиографического исследования.....	85
6.3 Данные гистологического исследования.....	86
6.4 Данные конфокальной микроскопии криосрезов.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	93
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	93
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	95

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Наиболее тяжелый контингент среди больных, страдающих заболеваниями мочеполовой системы, в том числе и туберкулезом, составляют пациенты с так называемым «малым мочевым пузырем» (Зубань О.Н., Комяков Б.К., 2011; Муравьев А.Н., Зубань О.Н., 2012). Практически всем этим больным требуется реконструктивно-восстановительная хирургическая помощь. В то же время, на сегодняшний день множество проблем, связанных с реконструктивной хирургией мочевого пузыря (МП), остаются нерешенными (Муравьев А.Н. и соавт., 2015). Во всём мире золотым стандартом в реконструкции мочевых путей при неэффективности консервативных методов лечения является замещение нефункционирующего мочевого пузыря фрагментами желудочно-кишечного тракта, что нередко приводит к осложнениям (Семенов С.А., Муравьев А.Н., 2014; Gupta N.P. et al., 2008). Очевидно, что найти подходящий аналог ткани МП с ее уникальными свойствами совсем не легко.

Тканевая инженерия является одной из ведущих тенденций в современной науке и подразумевает разработку методов восстановления или замещения поврежденных структур с применением скаффолдов и клеток. Однако, несмотря на огромный объем публикаций, реконструкция урологических структур освещена довольно скудно.

В настоящее время для лечения поврежденных тканей и органов человека все более широкое применение находят биорезорбируемые синтетические полимерные материалы, которые используют в качестве основы для культивирования клеток (Ho M.H. et al., 2006; Shao J. et al., 2012). Зарубежные ученые давно предпринимают успешные попытки создания тканевых аналогов стенки мочевого пузыря (Pariante J.L. et al., 2002), применение «биоинженерных тканей» для трансплантации опробовано в экспериментальных условиях. В опыте *in vivo* мочевой пузырь у 14 собак успешно замещён резервуаром, выращенным *in vitro* (Oberpenning F. et al., 1999). После удачного эксперимента на лабораторных

животных сгенерированный *in vitro* резервуар успешно трансплантирован человеку (Yoo J.J. et al., 2011).

В своих работах исследователи использовали в качестве источника клеток аутологичные ткани мочевого пузыря, что исключено при отсутствии здорового уротелия и мышечной стенки, когда все ткани мочевого пузыря замещены рубцовыми. Наши исследования направлены на поиск возможности применения клеточных технологий для помощи именно пациентам, имеющим малый мочевой пузырь, в том числе и туберкулезной этиологии.

Известно, что некоторые клетки организма не обладают выраженной иммуногенностью и подходят для аллогенной трансплантации. Аллогенные тканеинженерные кожные лоскуты применяются в клинической практике (Fabre J.W., 1991); для создания эпидермальных пластов успешно используются аллогенные кератиноциты и фибробласты (Мельцова А.Ж. и соавт., 2007; Швед Ю.А. и соавт., 2010; Therot A. et al., 2011). Из всего многообразия клеточных источников выделяется группа мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые обладают способностью воздействовать на иммунный ответ, снижая выраженность реакции на имплантат (Yan S. et al., 2013). *In vitro* доказана возможность дифференцировки МСК в клетки, обладающие свойствами гладкомышечных клеток, эндотелиальных и уротелиальных клеток. Поэтому они являются весьма заманчивым кандидатом для создания тканеинженерных аналогов стенки мочевого пузыря (DaSilva M.L. et al., 2006).

Однако, полного понимания механизмов, отвечающих за защитные и регенеративные эффекты, пока не достигнуто. Результаты проведенных на сегодняшний день, безусловно, обнадеживают, однако они требуют более пристального изучения (Martínez-Montiel Mdel P. et al., 2014).

Степень разработанности темы исследования

В последние годы опубликованы результаты системной терапии МСК при различных заболеваниях (Onken J. et al., 2006; Liang J. et al., 2012; Du T., Zhu Y.J., 2014) и экспериментальные работы по реконструкции различных урологических структур, в том числе и мочевого пузыря (Coutu D.L. et al., 2014). Мировой опыт применения аллогенных МСК для реконструкции мочевого пузыря на сегодняшний день представлен единичными экспериментальными исследованиями (Yuan H. et al., 2013; Snow-Lisy D.C. et al., 2015; Yudin tceva N.M. et al., 2016).

Цель исследования

Обосновать возможность применения тканеинженерной конструкции, состоящей из композитной матрицы и аллогенных стромальных клеток костного мозга кролика, для замещения дефекта стенки мочевого пузыря.

Задачи исследования

1. Исследовать физико-механические и резорбтивные свойства полимера поли-L,L-лактида и композитных матриц на его основе, используемых для формирования тканеинженерной конструкции;
2. Доказать возможность применения тканеинженерной конструкции, состоящей из композитной матрицы и аллогенных стромальных клеток костного мозга кролика для замещения дефекта мочевого пузыря;
3. Изучить динамику клинических и лабораторных показателей в ответ на замещение дефекта мочевого пузыря кролика разработанной тканеинженерной конструкцией;
4. Оценить *in situ* жизнеспособность введенных в область дефекта мочевого пузыря аллогенных стромальных клеток костного мозга в составе тканеинженерной конструкции через 2.5 месяца после операции.

Научная новизна

Впервые в мировой практике на экспериментальной модели парциальной резекции мочевого пузыря выполнена имплантация тканеинженерного лоскута мочевого пузыря, содержащего аллогенные стромальные клетки костного мозга кролика, и изучена жизнеспособность *in situ* введенных в область дефекта мочевого пузыря клеток.

Произведена сравнительная оценка возможности применения многокомпонентных тканеинженерных конструкций, содержащих клетки различного тканевого происхождения, для замещения стенки мочевого пузыря в эксперименте.

Доказана в экспериментальных условиях возможность использования аллогенных стромальных клеток костного мозга кролика для создания многокомпонентного аналога стенки мочевого пузыря, что может стать альтернативой принятой реконструкции мочевых путей кишечными фрагментами.

Теоретическая и практическая значимость

В результате поведенного экспериментального исследования разработан аллогенный тканеинженерный продукт, который может применяться для хирургического восстановления дефектов мочевого пузыря. Созданы предпосылки для дальнейшей разработки многокомпонентного композита с использованием аллогенных клеток, что, возможно, поспособствует в будущем улучшить результаты лечения в тех случаях, когда отсутствует возможность получения аутологичного материала.

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 у 33 лабораторных животных.

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 № 25 от 28.10.2015 г., выписка 25.1).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Композитная матрица, состоящая из поли-L,L-лактида и фиброина шелка (1:1), покрытая с наружной стороны водонепроницаемой пленкой из поли-L,L-лактида обладает оптимальным сочетанием механической прочности и деформации при растяжении для замещения дефекта мочевого пузыря.
2. Заселение композитной матрицы стромальными клетками костного мозга существенно увеличивает скорость ее резорбции.
3. Замещение дефекта мочевого пузыря разработанной тканеинженерной конструкцией, состоящей из композитной матрицы и аллогенных стромальных клеток костного мозга кролика, не сопровождается признаками отторжения в отличие от аллогенного мочепузырного лоскута, а также композитной матрицы без клеточного наполнения и заселенной аллогенными фибробластами, гладкими миоцитами и уротелием.
4. Внедрение разработанных тканеинженерных конструкций в дефект мочевого пузыря не вызывает отрицательных клинических проявлений и изменений лабораторных показателей в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде.

5. Введенные в область дефекта мочевого пузыря аллогенные стромальные клетки костного мозга в составе тканеинженерной конструкции, сохраняют жизнеспособность *in situ*.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность выполненного исследования подтверждается достаточным числом наблюдений (33 лабораторных животных) и применением адекватных методов статистического анализа.

Апробация работы состоялась 04 февраля 2020 года на заседании Ученого совета федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены: на международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2014), IV, V, VI и VII Конгрессах Национальной Ассоциации Фтизиатров (СПб., 2015, 2016, 2017, 2018) – второе место на конкурсе молодых ученых (2015), European Society for Gene and Cell Therapy and Finnish Society of Gene Therapy Collaborative Congress (Helsinki, Finland, 2015), II, III и IV Национальных Конгрессах по регенеративной медицине (Москва, 2015, 2017 и 2019), Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием, посвященной Международному дню борьбы с туберкулезом «Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей» – лауреат премии за лучший устный доклад (Москва, 2016), VI Всероссийской с международным участием конференции по управлению движениями «Motor Control-2016» (Казань, 2016), VIII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2016), на XXI Санкт-Петербургской ассамблее молодых учёных и специалистов – победитель конкурса грантов Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов, молодых ученых, молодых кандидатов наук (Санкт-Петербург, 2016 г), на 12-th International Congress of Cell Biology (Prague, Czech Republic, 2016), на VI и VII Всероссийских конференциях с международным участием

«Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий» (Санкт-Петербург, 2018 и 2019) и 11th International Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Rome, Italy 2018).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебную деятельность федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации: основные положения диссертационной работы используются в программах циклов усовершенствования врачей-урологов, хирургов и фтизиатров, что позволяет повысить компетенции слушателей и сформировать самые современные знания о разработанных тканеинженерных конструкциях и возможностях их применения при повреждениях мочевого пузыря в эксперименте.

Основные положения диссертационной работы Н.В. Орловой используются в лекционных курсах для аспирантов федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт 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».

Личный вклад автора

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

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 30 научных работ, из них 2 статьи в рейтинговых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук по специальностям 14.01.24 – «трансплантология и искусственные органы» и 14.01.23 – «урология», 1 статья в зарубежном журнале.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы исследования и указателя литературы включающего 266 источников, в том числе 33 отечественных и 233 зарубежных. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 35 рисунками, содержит 19 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Реконструктивная хирургия мочевого пузыря: существующие проблемы и способы их решения

Множество людей по всему миру страдают от заболеваний мочевого пузыря. Наиболее тяжелый контингент составляют больные с так называемым малым МП (Зубань О.Н., Комяков Б.К., 2011; Муравьев А.Н., Зубань О.Н., 2012). Снижение растяжимости мочепузырной стенки, или ригидность, фиброз, может произойти вследствие множества причин. Среди них: интерстициальный цистит, нейрогенная дисфункция МП, лучевой цистит, туберкулезное поражение МП, бильгарциоз, а также нефункционирующий длительное время МП после вмешательств по постоянному отведению мочи.

Больше века идет поиск альтернативных материалов для замещения мочевого пузыря. Первый опыт использования свободного тканевого лоскута для восстановления МП опубликован в 1917 г., когда собакам выполнили аугментационную цистопластику фасцией (Neuhof H., 1917). С тех пор экспериментальных и клинических опытах использовалось множество различных материалов в качестве свободных лоскутов, включая брюшину, подслизистый слой мочевого пузыря, серозно-мышечные лоскуты и подслизистый слой тонкого кишечника, сальник, кожу, твердую мозговую оболочку, плаценту и бычий перикард (Cheng E. et al., 1994; Gleeson M.J., Griffith D.P., 1992; Kelâmi A. et al., 1970; Probst M. et al., 1997; Tsuji I. et al., 1961; Vaught J.D. et al., 1996; Moon S.J. et al., 2011; Pokrywczynska M. et al., 2014). Также предпринимались попытки использования синтетических материалов: пластик, тетрафлюороэтилен (тефлон), поливиниловая губка, желатиновая губка, силикон, покрытую смолой бумагу, коллагеновые и викриловые матрицы (Bohne A.W., Urwiller K.L., 1957; Portilla S.R. et al., 1958; Bona A.V., De Gresti A., 1966; Fujita K., 1978; Kudish H.G., 1957; Monsour M.J. et al., 1987; Orikasa S., Tsuji I., 1970; Rohrman D. et al., 1996; Tsuji I. et al., 1967).

Несмотря на все попытки, хороших результатов достигнуто не было из-за функциональных и структурных проблем, а также плохой биосовместимости. Резервуар из нерезорбируемых синтетических материалов ожидаемо оказывался механически несостоятельным, а также способствовал образованию конкрементов. При использовании рассасывающихся материалов возникала фибробластная инфильтрация, формирование рубцовой ткани, сморщивание лоскута, и, как итог, снижение емкости мочевого пузыря. Очевидно, что заменить мочепузырную ткань с ее уникальными свойствами весьма непросто (Atala A., Retik A., 1994). В настоящее время золотым стандартом для восстановления нефункционирующего МП, когда исчерпаны возможности консервативных методов, широко применяется замещение мочевого пузыря различными фрагментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). (Павлов В.Н. и соавт., 2009; Матвеев Б.П. и соавт., 2001; Васильченко М.Н. и соавт., 2014; Дубровин В.Н. и соавт., 2008; Аничков Н.М. и соавт., 2013; Tanaka T. et al., 2005; Kispal Z.F. et al., 2015; Sloff M. et al., 2014).

Впервые аугментация мочевого пузыря тканью кишечника описана в эксперименте на двух собаках (Tizzoni G., Foggi A., 1888) и внедрена в клиническую практику с 1898 года (Mickulicz Y., 1898). С тех пор накоплен большой опыт использования кишечных аутоотрансплантатов, однако, эта сложная высокотехнологичная операция сопряжена с рядом серьезных хирургических и метаболических осложнений (Лелявин К.Б. и соавт., 2010; Семенякин И.В. и соавт., 2012; Семенякин И.В. и соавт. 2013; Даренков С.П. и соавт., 2013; Chang S.S. et al., 2002; DeFreitas Filho L.G. et al., 2001).

Наиболее значимыми хирургическими осложнениями являются несостоятельность и стриктуры резервуарно-уретрального и уретеро-резервуарного анастомозов, формирование пузырно-мочеточникового рефлюкса, инфекции мочевых путей, камнеобразование, злокачественные новообразования артериального МП (Атдуев В.А. и соавт., 2008; Лопаткин Н.А. и соавт., 2003; Soegrel T.M. et al., 2004; Kisku S. et al., 2015; Cohen A.J. et al., 2016; Li L. et al., 2016; Kispal Z.F. et al., 2015; Telli O. et al., 2016; Biardeau X. et al., 2016).

Метаболические осложнения связаны с исключением протяженного фрагмента кишечника с одной стороны и особенностями кишечного эпителия (способность к секреции и реабсорбции метаболитов) с другой, что, как правило, приводит к электролитным нарушениям, нарушениям минерального обмена, кислотно-основного состояния крови, развитию В12-дефицитной анемии и др. (Даренков С.П. и соавт., 2013; Галимзянов В.З. и соавт., 2009; Чотчаев Р.М., 2011; Alberti С., 2015).

Оптимальным аутотрансплантатом для замещения МП на сегодняшний день является фрагмент подвздошной кишки (Комяков Б.К. и соавт., 2005; Studer U.E. et al., 2000).

Также используется в клинической практике цистопластика изолированным сегментом сигмовидной кишки, которая впервые описана в эксперименте в 1903 году, а в клиническую практику внедрена в 1967 году (Borelius J., 1903; Mogg R.A., 1967). Несмотря на относительно малое количество серьезных метаболических нарушений (Мочалова Т.П. и соавт., 1993; Коган М.И., Перепечай В.А., 2002), существенными недостатками сигмоцистопластики являются высокое внутреннее давление по сравнению со слепой и подвздошной кишкой (Da Pozzo L.F. et al., 1994), а также риск малигнизации уро-кишечных анастомозов (Зубань О.Н., Муравьев А.Н., 2010).

Альтернативой отведению мочи в сигмовидную кишку стало создание изолированного ректального мочевого резервуара (Remedi V., 1906; Stonington O.G., Eiseman B., 1956; Переверзев А.С., Петров С.Б., 2002). К сожалению, дальнейшие исследования показали высокую послеоперационную летальность после подобных операций, увеличение частоты обострений пиелонефрита, недержания мочи и стула (Бондарь Г.В., 1973; Серняк П.С. и соавт. 1987, 1997; Ghoneim M.A., Ashamalla A.K., 1974; McConnell J.B., Stewart W.K., 1975).

Наличие в илеоцекальном сегменте естественного клапана – баугиниевой заслонки – послужило идеей для использования его при реконструкции мочевого пузыря в качестве антирефлюксного механизма (Boari A., 1897). Но резекция терминальной части подвздошной кишки с клапанным механизмом приводила к

хронической диареи, гипероксалурии, камнеобразованию в желчном пузыре и дефициту витамина В12 (Montie J.E., Wei J.T., 2002; Mills R.D., Studer U.E., 1999).

Поперечно-ободочная кишка используется для создания искусственного мочевого резервуара, начиная с конца 1960-х годов (Alwein J.E., Hohenfellner R., 1975; Morales P., Golimby M., 1975; Schmidt J.D. et al., 1985). Детубуляризация толстой кишки позволяет сформировать резервуар большой емкости, а не рассеченная слепая кишка с ее гаустральными сокращениями усиливает механизм удержания мочи (DyOrazio O.R. et al., 1998).

Наличие метаболического ацидоза, слизи- и камнеобразования в послеоперационном периоде послужило предпосылкой для использования в качестве пластического материала для реконструкции МП желудка (Sinaiko E.S., 1953). Литературные данные (Аничков Н.М. и соавт., 2013) указывают, что использование лоскута желудка в качестве аутотрансплантата для создания искусственного МП по сравнению с кишкой обладает целым рядом преимуществ. Во-первых, подкисление мочи желудочным соком препятствует развитию мочевой инфекции; во-вторых, избранный сегмент ЖКТ отличается хорошим кровоснабжением, а оставшаяся часть желудка – быстрой регенерацией; в-третьих, сводится к минимуму риск спаечной кишечной непроходимости. Выбор сегмента желудка в качестве аутотрансплантата для пластики МП особенно оправдан в случаях, когда невозможно использовать в этих целях кишку, в частности после проведенного ранее курса облучения малого таза по поводу онкологического заболевания (Muraishi O. et al., 1994; Yashi M. et al., 1998). Ряд экспериментальных исследований показал, что удаление слизистой желудка перед цистопластикой останавливает секрецию соляной кислоты и, следовательно, уменьшает риск возникновения эрозий, изъязвления, дизурии-гематурии, метаплазии и малигнизации (Bleustein C.B. et al., 2000; Pareek G. et al., 2001; Abdel H.S. et al., 2002; DeFoor W. et al., 2003).

Итак, на сегодняшний день, учитывая отсутствие альтернативы, использование ткани ЖКТ для восстановления мочевых путей уже более ста лет остается золотым стандартом (Лоран О.Б. и соавт., 2001; Лопаткин Н.А. и соавт.,

2003; Hara I. et al., 2002; Abdel-Azim M.S., Abdel-Hakim A.M., 2003; Kwon T.G. et al., 2008; Biers S.M. et al., 2012; El Taji O.M.S. et al., 2015; Shreck E. et al., 2016)

Появление метода селективной клеточной трансплантации для создания ткани мочевого пузыря явилось важным и перспективным открытием (Atala A., Mooney D., 1997).

Возрастающая актуальность поиска подходов к регенерации и замещению органов и тканей неизбежно приводит к разработке и внедрению в практику новых технологий. Применение в урологии методов тканевой инженерии и регенеративной медицины может существенно улучшить результаты лечения большого количества патологических состояний (Petrovic V. et al., 2011).

1.2 Биоматериалы, подходящие для регенерации мочевого пузыря

Помимо поиска наиболее подходящего для регенерации органа источника клеток, не менее важным вопросом является поиск подходящего материала и методик создания с помощью этих клеток тканевого аналога (Petrovic V. et al., 2011; Shokeir A.A. et al., 2010). Полученный композит должен не только походить по своим свойствам на природную ткань, но и служить подходящей средой для заселения клетками (Wood D., Southgate J., 2008).

Существующие биоматериалы можно разделить на 2 категории: 1) материалы природного происхождения, такие как коллаген; 2) бесклеточные тканевые матрицы, например, подслизистый слой мочевого пузыря; и 3) синтетические материалы (Atala A., 2011).

1.2.1 Скаффолды на основе коллагена

Коллаген входит в состав практически всех тканей человеческого тела. Этот белок очень востребован в тканевой инженерии из-за относительной простоты в использовании и отсутствия иммунного ответа (Dahms S.E. et al., 1998). Благодаря развитию новых технологий стало возможно создавать с помощью биопринтера

конструкции природного происхождения, содержащие необходимые факторы роста и клеточные компоненты, необходимые для каждого конкретного случая (Mahfouz W. et al., 2013; Horst M. et al., 2010). Опубликованы результаты нескольких исследований, показывающие перспективность использования препаратов на основе коллагена для экспериментальной пластики уретры и мочевого пузыря (Глыбочко П.В. и соавт., 2015; Lin H.K. et al., 2015; Zhu W.D. et al., 2011; Roelofs L.A. et al., 2014).

Уже внедрено в клиническую практику использование биodeградируемого коллагенового матрикса, заселенного аутологичными кератиноцитами, для пластики уретры у детей с гипоспадией (Файззулин А.К. и соавт., 2016).

Однако в этих единичных опытах используют различные препараты коллагена, что требует более масштабных исследований этой темы. В частности, отсутствуют сведения о том, влияет ли источник коллагена на его биоинертность. Опять же, те немногочисленные опубликованные результаты экспериментальной цистоластики пустой коллагеновой мембраной и отдельные клинические испытания на малых группах пациентов, были неоднозначны. Несмотря на хорошую приживляемость подобные мембраны не обеспечивали значимого увеличения объема мочевого резервуара при сохранении его ригидности, что было связано с преимущественно соединительнотканым замещением коллагенового каркаса при незначительном восстановлении мышечной ткани (Tu D.D. et al., 2012; Caione P. et al., 2012; Lin H.K. et al., 2015; Joseph D.B. et al., 2014).

1.2.2 Децеллюляризованные матрицы

Децеллюляризованные матрицы, аутологичные, аллогенные или ксеногенные, достаточно часто используются в медицине (Yoo J.J. et al., 1998; Sutherland R.S. et al., 1996). Все клеточные компоненты удаляются химически и механически, оставляя естественную платформу для развития новой ткани (Crapo P.M. et al., 2011). Чаще всего для этих целей используют подслизистый слой мочевого пузыря и тонкой кишки (Langer R., Vacanti J.P., 1993). Такие матрицы

представляют собой механическую основу для заселения клетками и определяют структуру полученной впоследствии ткани. После имплантации такие матрицы постепенно деградируют и замещаются, в конце концов, элементами внеклеточного матрикса. Пожалуй, одним из основных преимуществ децеллюляризованных матриц является способность их к неоваскуляризации, что увеличивает жизнеспособность конструкции. Экспериментально на крысах доказано, что фактор роста нервных волокон и эндотелиальный васкулярный фактор роста улучшает приживаемость трансплантата путем увеличения ангиогенеза и нейрогенеза (Kikuno N. et al., 2009).

Матрикс из децелляризованной тонкой кишки, заселенный аутологичными клетками, рядом авторов признается весьма перспективным для цистопластики (Rossetto V.J. et al., 2013; Pokrywczynska M. et al., 2014), в опытах на крысах и собаках он обеспечил хорошую адгезию и пролиферацию клеток.

Опубликованы положительные результаты имплантации в МП децеллюляризованного лоскута толстой кишки. При резекции МП у свиней с замещением дефекта толстокишечной децеллюляризованной матрицей, покрытой фибриновым клеем с уротелиальными и гладкомышечными клетками, происходило восстановление функциональной емкости МП с полной эпителизацией внутренней поверхности имплантата через 6 месяцев после операции (Hidas G. et al., 2015). Также при замещении части МП крыс лоскутом децеллюляризованной толстой кишки описана эпителизация внутренней поверхности имплантата с вращением гладкомышечных клеток через 3 месяца после операции (Hoogenkamp H.R. et al., 2016).

Также в доступной литературе можно найти редкие опыты применения других структур. Имеются единичные сообщения об использовании децеллюляризованного аппендикса для реконструкции МП (Sabetkish N. et al., 2014; Hoogenkamp H.R. et al., 2016). Kajbafzadeh A. et al. показали, что децеллюляризованный перикард, заселенный аутологичными ГМК, может служить подходящим скаффолдом для реконструкции урологических структур (Kajbafzadeh A.M. et al., 2011). Имеются данные о возможности использования

для пластики мочевых путей децеллюляризованной амниотической оболочки человека (Adamowicz J. et al., 2016). Заселение ее поверхности уротелиальными клетками приводит к формированию функционально полноценной выстилки, сходной с нативным уротелием (Jerman, U.D. et al., 2014).

Урологами в тканевой инженерии наиболее часто используется бесклеточная основа мочевого пузыря, на которой могут прорасти уротелий, гладкомышечные, эпителиальные и нервные клетки (Brehmer B., 2007). Такой скаффолд оказался более пригодным для прикрепления культивированных человеческих уротелиальных клеток, поддержания их жизнеспособности и пролиферативной активности по сравнению с децеллюляризованной стенкой тонкой кишки (Davis N.F. et al., 2011). В то время, как препарат МП без клеточного наполнения оказался непригодным для цистопластики. В одном исследовании на кроликах удалось достичь положительного результата, заселив его предварительно уротелиальными клетками, тогда как без формирования уротелиальной выстилки в течение 2 недель в 100% случаев происходило сморщивание имплантата с формированием стриктур уретеро- и уретро-резервуарных анастомозов (Liao W. et al., 2013).

Но, в целом, эти материалы имеют и существенные недостатки, учитывая их тканевое происхождение. На практике очень тяжело получить здоровый аутологичный материал (Orabi H. et al., 2013). В то же время, высокая стоимость алло- и ксеногенных материалов вкупе с риском передачи инфекций и большими различиями в механической прочности являются ключевыми в ограничении их клинического применения (Orabi H. et al., 2013; Brown A.L. et al., 2002). Более того, использование децеллюляризованных матриц естественного происхождения требует ткани, не подверженной каким-либо патологическим изменениям, что, как правило, невозможно (Subramaniam R. et al., 2011; Chung S.Y., 2006). Плюс агрессивные методики децеллюляризации и стерилизации приводят к денатурации белков внеклеточного матрикса, разрушая тем самым физиологическую микросреду (Atala A., 1998).

1.2.3 Синтетические и комбинированные скаффолды

Применение синтетических материалов в случаях необратимых патологических изменений собственного мочевого пузыря может быть идеальным решением. Известны опыты экспериментального и клинического применения тефлоновых и силиконовых матриц (Matoka D.J., Cheng E.Y., 2009). Плохая совместимость этих материалов с живыми тканями привела к разработке более подходящих синтетических полимеров, таких, как PLGA – полимер на основе молочной и гликолевой кислоты (Bogash M. et al., 1960; Bona A.V., De Gresti A., 1966; Kelâmi A. et al., 1970; Rohrman D. et al., 1996; Horst M. et al., 2013). Эти материалы больше соответствуют структурным и биологическим требованиям и подходят для пролиферации и дифференцировки клеток (Baker S.C. et al., 2009). Кроме того, они безопасны, достаточно прочны, обладают способностью к биодеградации, и могут содержать в себе необходимые для неоваскуляризации ростовые факторы, такие как эндотелиальный фактор роста (Pattison M.A. et al., 2005; Pariente J.L. et al., 2001; Chen F.M. et al., 2010). Способность к биодеградации существенно снижает риск инфекции, кальцификации и рубцевания (Ulery B.D. et al., 2011).

Однако использование синтетических полимеров зачастую требует иммуносупрессивной терапии. На сегодня доказано, что использование различных биологических факторов (адгезивные протеины, коллаген, фибронектин, основной фактор роста фибробластов, инсулин) улучшает процессы распознавания клеток и увеличивает приживаемость трансплантата (Harrington D.A. et al., 2008; Elbert D.L., Hubbell J.A., 1996). Развитие нанотехнологий в конце 20-го столетия позволяет создавать комбинированные матрицы, содержащие природные и синтетические материалы. (Brehmer V. et al., 2007; Shakhssalim N. et al., 2012; Chun Y.W. et al., 2009).

Наиболее часто в подобных конструкциях используется коллагеновая основа, в частности, комбинация компрессионного коллагена и PLGA (Oberpenning F et al., 1999). Такое сочетание увеличивает механическую

прочность конструкции в несколько раз: она выдерживает давление 3,57 МПа, тогда как только коллагеновая матрица – 0,6 МПа. Частичная замена таким скаффолдом стенки МП у крыс продемонстрировала хорошую миграцию клеток в место имплантации (Ajalloueiian F. et al., 2014), а при добавлении нановолокна полиамида отмечено восстановление емкости мочевого резервуара без значимого фиброзирование имплантата (Kajbafzadeh A.M. et al., 2014). Sivaraman S. et al. наполнили коллагеновую основу гидрогелем Tetronic 1107-акрилат и гиалуроновой кислотой. Это привело к существенному улучшению механических свойств данного композита. При высокой механической прочности скаффолд явился подходящей средой для культивирования ГМК, что позволяет его рассматривать в качестве потенциального аналога стенки МП (Sivaraman S. et al., 2015).

Также используются двухкомпонентные композиты, состоящие из бесклеточного МП, покрытого полимерной пленкой, улучшающей прочностные и эластические характеристики исходной матрицы. Например, при покрытии полиуретаном и замещении дефекта МП кроликам на 40 сутки после операции отмечена регенерация уротелия с формированием структуры, аналогичной стенке мочевого пузыря к концу 3 месяца (Xiao Y. et al., 2015).

Неплохие результаты получены при использовании скаффолдов на основе фиброина шелка. В опытах на мышах такой скаффолд показал хорошую биodeградируемость и высокую биосовместимость (Tu D.D. et al., 2012; Sack, V.S. et al., 2016). По сравнению с децеллюляризованным МП при замещении небольшого бокового участка МП кроликов скаффолдом, содержащим фиброин шелка, выявлена статистически значимо лучшая регенерация гладкомышечных клеток и сосудов при примерно одинаковой степени восстановления уротелиального слоя (Huang J. et al., 2016). При сравнении эффективности имплантации в МП крысам двуслойного скаффолда из фиброина шелка и децеллюляризованного подслизистого слоя тонкой кишки оба пластических материала показали схожие результаты (Chung Y.G. et al., 2014). Чтобы объединить преимущества обоих материалов, была смоделирована двухслойная

матрица, сочетающая децеллюляризованный МП и фиброина шелка. Такой композит при аугментационной цистопластике у крыс продемонстрировал хорошую регенерацию гладкомышечного слоя в новообразованной стенке, проращение нервных волокон, а также хорошую васкуляризацию (Zhao Y. et al., 2015).

Комбинированный скаффолд из бесклеточного матрикса, покрытого слоем полиэфируретана, также оказался пригодными для экспериментальной реконструкции МП (Horst M. et al., 2015). Этот полимер образует более тонкую мелкопористую пленку, по сравнению с PLGA. Через 8 недель после замещения дефекта стенки МП отмечена меньшая выраженность воспалительной реакции, более активная мышечная регенерация и лучшая интеграция с собственными тканями и по сравнению с аналогичными экспериментами с применением PLGA-содержащего скаффолда. При этом цистометрические характеристики слабо различались в обеих группах.

При имплантации в МП лоскута перикарда, покрытого полигликолевой кислотой (PGA), описана постепенная васкуляризация пересаженного скаффолда за счет врастания капилляров из окружающих тканей (Kajbafzadeh A.M. et al., 2012).

Однако подбора оптимального скаффолда мало. Для формирования полноценного аналога стенки МП требуются дополнительные компоненты, такие как клетки, способные дифференцироваться в тканеспецифичные клетки и секретировать сигнальные молекулы, стимулирующие репарацию собственных тканей поврежденного органа (Волков А.В., 2005; Orabi H. et al., 2013; Kajbafzadeh A.M. et al., 2014; Bouhout S. et al., 2015; Vardar E. et al., 2016).

1.3 Типы стволовых клеток и их источники

Упрощенно говоря, существует 2 основных типа стволовых клеток: неэмбриональные и эмбриональные. Эмбриональные стволовые клетки извлекают из внутренней массы клеток бластоцисты, и эти клетки способны к дифференцировке во все три ростковых слоя. Однако их применение ограничено из-за риска развития тератомы и этических аспектов. В то же время, неэмбриональные стволовые клетки, особенно клетки взрослого организма, уже обладают специфичностью и имеют низкий потенциал к дифференцировке (Alberti C., 2009; Wang S. et al., 2012). Однако эти клетки сравнительно легко можно получить из различных тканей, и поэтому они наиболее часто используются в регенеративной медицине.

Открытие профессором Университета Киото Синъя Яманака в 2006 году типа стволовых клеток неэмбрионального происхождения, который был назван индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дало возможность получить аутологичный материал, имеющий свойства эмбриональных стволовых клеток, и при этом избежать свойственную аллогенным источникам иммуногенность (Nishikawa S. et al., 2008; Yamanaka S., 2008; Zhao R., Daley G.Q., 2008). Это открытие нивелирует этическую проблему использования человеческих эмбриональных клеток человека (Wilmot I., 2007). Однако, технология тканевой инженерии с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток до сих пор не совершенна с точки зрения клинической практики (Warren L. et al., 2010).

Поэтому пока наиболее востребованными на данный момент являются неэмбриональные стволовые клетки взрослого организма. Из всего многообразия клеточных источников хочется выделить группу мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Ряд авторов признают их оптимальными для формирования биоинженерных аналогов мочевых путей (Ma D. et al., 2014; Qin D., 2014; Wezel F., Pearson J. et al., 2014; Kates M. et al., 2015). Они обладают свойствами недифференцированных клеток, способны к самообновлению и обладают высокой пролиферативной

активностью и способностью к самообновлению, а также, что наиболее важно, способны дифференцироваться в клетки мезодермы (Pittenger M.F. et al., 1999; Barry F.P., Murphy J.M., 2004). *In vitro* доказана способность МСК дифференцироваться в клетки, обладающие свойствами гладких миоцитов, уротелиальных и эндотелиальных клеток (DaSilva Meirelles L. et al., 2006; Zhang M., Z. Peng, 2013; Bouhout S. et al., 2015). Более того, МСК могут секретировать различные ростовые факторы, такие как ангиопоэтин-1, эндотелиальный сосудистый фактор роста, фактор роста нервных волокон, нейротрофический фактор головного мозга, нейротрофический фактор глиальной клеточной линии, которые могут способствовать ангиогенезу и росту аксонов *in vitro* (Kingham P.J. et al., 2014).

Поэтому МСК являются весьма заманчивым кандидатом для реконструкции мочевого пузыря. Их относительно легко получить из тканей костного мозга (Zhang Y. et al., 2005), жировой (Zuk P.A. et al., 2002) и мышечной (Yokooyama T. et al., 2001) ткани. Однако, в некоторых случаях получение достаточной качественной популяции аутологичных МСК у взрослого человека затруднительно в связи с большой вирусной нагрузкой или возрастным снижением популяции клеток и их способности к пролиферации/дифференцировке (Rubinstein P. et al., 1993; Fehrer C., Lepperdinger G., 2005).

1.4 Клеточные технологии и тканевая инженерия в урологии

Трансплантация стволовых клеток внедрена в 1950 году, когда гемопоэтические стволовые клетки применили для репопуляции костного мозга у онкологических пациентов (Thomas E.D. et al., 1957). В настоящее время более 50000 подобных трансплантаций производится ежегодно (Gratwohl A. et al., 2010). Вместе с улучшением понимания клеточной биологии возрастает и желание восстанавливать более сложные комплексные ткани и органы. Опубликованы удачные случаи применения для регенерации роговицы линейно-специфичных стволовых клеток (Rama P. et al., 2010; Yao L. et al., 2012), а также восстановления на животной модели поврежденной печени (Liu H. et al., 2011). Известны также

попытки создания и структур посложнее, таких как кровеносные сосуды (Gong Z., Naklason L.E., 2008), почки (Song J.J. et al., 2013), легкие (Ott H.C. et al., 2010) и сердце (Zwi-Dantis L. et al., 2012; Ott H.C. et al., 2008; Qian L. et al., 2012). Даже в ЦНС, с ее клеточным многообразием и сложными взаимосвязями, доказана способность интеграции стволовых клеток в существующую схему (Denham M. et al., 2012; Ideguchi M. et al., 2010; Steinbeck J.A. et al., 2012). Линейно-специфичные стволовые клетки эффективно применялись для восстановления роговицы (Yao L. et al., 2012) и костей черепа (Kaiger D. et al., 2012) у человека.

В урологии также активно изучаются возможности применения стволовых клеток, как для системной терапии различных заболеваний (Du T., Zhu Y.-J., 2014), так и для создания органов и тканей (Patel M.N., Atala A., 2010). В опыте на крысах с диабетической эректильной дисфункцией описано достоверное повышение значений интракавернозного давления и экспрессии NO-синтазы при интракавернозном введении мезенхимальных стволовых клеток (Ouyang B., 2014). Искусственные кавернозные тела, представляющие собой коллагеновые матрицы, заселенные собственными гладкомышечными и эндотелиальными клетками, имели адекватные структурные и функциональные параметры в экспериментах на кроликах (Kwon T.G. et al., 2002; Chen K.L. et al., 2010) и мышах (Jackson C. J. et al., 1990; Kräling B.M., Bischoff J., 1998). В 2001 году на основе полимерной матрицы, заселенной хондроцитами созданы биосовместимые уретральные стенты (Amiel G.E. et al., 2001). А годом позже выполнен успешный опыт по замещению кроличьей уретры трубчатой коллагеновой конструкцией, заселенной собственными гладкими миоцитами и эпителием из мочевого пузыря (De Filippo R. et al., 2002). У животных сформировалась широкая уретра, гистологически и функционально схожая с нативной.

Используя как основу децеллюляризованную мышиную почку, ученым удалось создать с помощью эмбриональных клеток гломерулярные, тубулярные и сосудистые структуры, после чего полученный орган удачно имплантирован *in vivo* (Guan Y. et al., 2015). Также успешно трансплантирован человеку, сгенерированный мочево́й резервуар (Atala A. et al., 2006; Yoo J.J. et al., 2011).

1.4.1 Опыт создания мочевого резервуара с использованием клеточных технологий

Опубликованы успешные попытки создания тканей мочевого пузыря (Cilento B.G. et al., 1994; Lai J.Y. et al., 2002; Atala A. et al., 1992; Atala A. et al., 1993; Pariente J.L. et al., 2001; Pariente J.L. et al., 2002; Nakanishi Y. et al., 2003; Southgate J. et al., 2003; Fraser M. et al., 2004; Pattison M.A. et al., 2005; Schultheiss D. et al., 2005; Danielsson C. et al., 2006), далее применение методов тканевой инженерии успешно опробовано на животных моделях (Fraser M. et al., 2004; Schoeller T. et al., 2001; Kanematsu A. et al., 2003; Nuininga J.E. et al., 2004).

Исследованиями в области создания нового мочевого пузыря уже более 20 лет занимаются Atala et al (Wake Forest Institute for Regenerative Medicine). В 1992 г. Они доказали, что уротелиальные и гладкомышечные клетки можно культивировать *in vitro* и заселять ими довольно обширные лоскуты (Atala A. et al., 1992; Atala A. et al., 1993; Cilento B.G. et al., 1994). Полимерные матрицы с клетками можно имплантировать *in vivo*, где пересаженные конструкции инфильтрируются ангиогенными структурами. В 1999 ученым с успехом удалось заместить мочевые пузыри у 14 собак выращенным *in vitro* неоцистисом (Oberpenning F. et al., 1999). Животных в этом опыте разделили на 3 группы. У собак из первой группы (n=2) после супратригональной резекции мочевого пузыря был ушит без реконструкции. 2-й группе (n=6) выполнено восстановление емкости мочевого пузыря пустой полимерной матрицей. Обе эти группы в данном опыте служили экспериментальным контролем. В группе 3 (n=6) животным был сформирован неоцистис, состоящий из полимерного носителя в форме пузыря, изнутри покрытого уротелиальными клетками, а снаружи – гладкомышечными. Клетки получали методом открытой биопсии фрагмента мочепузырной стенки 1 см² отдельно от каждого животного. В результате у животных, которым не выполнялась реконструкция, к концу периода наблюдения (11 мес.) сохранилось только 20% ($\pm 2\%$) исходной емкости мочевого пузыря. У животных отмечалось резко учащенное мочеиспускание. Емкость полученного резервуара в случаях

реконструкции бесклеточной полимерной мембраной составила 46% ($\pm 20\%$) от дооперационных значений. В то время, как у животных, получивших 3-слойный резервуар емкость практически приравнивалась к предоперационным значениям (95% ($\pm 9\%$)). Комплаентность мочевых пузырей у собак, не подвергшихся реконструкции составила всего 10% ($\pm 3\%$) от исходной. После имплантации полимерной матрицы комплаентность снизилась до 42% ($\pm 21\%$). Комплаентность же сгенерированных пузырей составила 106% ($\pm 16\%$). Цистограммы также показали выраженное уменьшение объема пузыря в группе 1, частичное сморщивание трансплантата в группе 2, и пузырь нормальной формы и размеров в группе 3. Гистологически к 11 месяцу наблюдения полимерная матрица во второй группе полностью заместилась фиброзной тканью, включающей единичные мышечные волокна. Наоборот, у животных из 3-й группы уже к 3-му месяцу наблюдения определялась структура стенки резервуара, состоящая из 3 слоев: уротелиального, подслизистого и мышечного, представленного разнообразными пучками волокон. Через 6 месяцев после операции обнаружено формирование нервных волокон.

Доказав возможность имплантации тканеинженерной конструкции животной модели, ученые предприняли попытку трансплантировать выращенный *in vitro* мочевой резервуар человеку (Atala A. et al., 2006). Исследование выполнено на небольшой группе пациентов с миеломенингоцеле ($n=7$) в возрасте 4-19 лет, обладающих низкокомплаентным МП или МП с повышенным давлением. Уротелиальные и мышечные клетки из биоптатов, аналогично предыдущему опыту. В трех первых случаях в качестве матрицы использовался децеллюляризованный подслизистый слой мочевого пузыря. В дальнейшем стало понятно, что при оментализации имплантата васкуляризация происходит более эффективно, а также использование композитных конструкций, например, коллаген-PGA, приводит к лучшим отдаленным результатам (Oberpenning F. et al., 1999). Руководствуясь новыми данными, авторы дважды изменяли протокол. Одному пациенту пересажен резервуар также на коллагеновой матрице, но с оментализацией трансплантата. А в трех остальных случаях использовалась

collagen-PGA матрица, также с оментализацией. Все пациенты удовлетворительно перенесли вмешательство. Из осложнений только в одном случае в послеоперационном периоде зафиксирована инфекция мочевых путей. Цистограммы через 3 недели после операции показали состоятельность анастомозов, отсутствие затеков контрастного вещества. В 2-х случаях до операции отмечался двусторонний пузырно-мочеточниковый рефлюкс (ПМР) 2 степени – после операции рефлюкс остался, но не прогрессировал. В случаях децеллюляризованного матрикса без оментализации емкость пузыря уменьшилась на 30%, в случае, когда выполнили оментализацию неоцистиса на децеллюляризованной основе – емкость возросла в 1.22 раза, в случаях использования collagen-PGA, емкость увеличилась в 1.58 раза. Комплаентность мочевых резервуаров у всех пациентов также увеличилась в разной степени. Ультразвуковое исследование не выявило патологии, кроме 2-х случаев гидронефроза у пациентов с пузырно-мочеточниковым рефлюксом (ПМР). В течение 5 лет не зафиксировано значимых метаболических нарушений, формирование конкрементов также отсутствовало. И, что важно, отсутствовала обычная для цистопластики кишечными фрагментами избыточная продукция слизи. По данным биопсии после операции определяется трехслойная структура стенки неоцистиса, содержащая уротелиальный, подслизистый и мышечный слой. Иммуногистохимически подтвержден нормальный фенотип уротелиальных и мышечных клеток.

Позже выполнено 2 мультицентровых исследования (Yoo J.J. et al., 2011). Первое на детях со spina bifida и, как следствие, нейрогенным мочевым пузырем. Оно включило 10 детей (средний возраст 8,2 года), нуждающихся в цистопластике цистопластика в связи с высоким внутрипузырным давлением (≥ 40 см.в.ст.), или наличием изменений верхних мочевых путей (ПМР и гидронефроз). Аутологичные клетки получены методом биопсии стенки мочевого пузыря, перемещены на полимерную матрицу, после чего выполнена трансплантация неооргана. У всех 10 пациентов отмечено клинически-значимое улучшение по данным уродинамики, лучевых методов и дневников мочеиспускания. Во второе

исследование вошли 6 взрослых пациентов с посттравматическим нейрогенным мочевым пузырем. Новый мочевой пузырь был смоделирован и пересажен тем же самым способом. Через 2 года после вмешательства 4 из 6 пациентов демонстрировали положительную динамику.

Однако, к сожалению, в проведенных исследованиях не получено статистически достоверного улучшения физиологических параметров МП, включая емкость и комплаентность через 12 и 36 месяцев после трансплантации. Более того, во всех случаях отмечались побочные эффекты, включая кишечную непроходимость у 40% детей, вошедших в исследование (Sharma A.K. et al., 2013; Farhat W.A., 2014; Cheng E.Y., 2014; Sloff M. et al., 2014). Более того, ученые в своих исследованиях использовали как источник клеток собственные ткани мочевого пузыря, что невозможно у пациентов с микроцистисом туберкулезной и иной этиологии, когда весь мочевой пузырь замещен рубцовыми тканями и абсолютно невозможно получить здоровый аутологичный уротелий и мышечную стенку (Dozmozov M.G. et al., 2007; Ohishi T. et al., 2015). Также как использование собственных клеток у больных с инвазивным раком или нейрогенным МП чревато рецидивом заболевания или значительным ухудшением уродинамических параметров (Dozmozov M.G. et al., 2007). Подобные результаты диктуют необходимость поиска альтернативных типов клеток, подходящих для поставленных целей, также как разработка новых скаффолдов для лучшего клинического эффекта. Особого интереса заслуживает изучение механизмов восстановления тканей МП (Snow-Lisy D.C. et al., 2015).

В 2005 году опубликованы положительные результаты реконструкции мочевого пузыря крысы заселенными МСК костного мозга. Полученные резервуары обладали нормальной гистологической структурой с хорошо дифференцируемым уротелиальным и гладкомышечным слоями (Chung S.Y. et al., 2005). Потенциал МСК костного мозга дифференцироваться в клетки, имеющие свойства ГМК мочевого пузыря, ранее уже доказан *in vitro* и на различных животных моделях (Shi Y., Zhang Y., 2011). В 2012 году другие зарубежные коллеги (Drewa T. et al., 2012) провели дифференцировку МСК *in vitro* в клетки,

подобные уротелию и гладким миоцитам, и заселили полученными клетками скаффолд. Однако ученые столкнулись с рядом трудностей: например, МСК, полученные из разных источников не всегда способны дифференцироваться в мышечные клетки с необходимыми свойствами. И, тем не менее, авторы считают разработку методики реконструкции мочевого пузыря с использованием аутологичных МСК необычайно перспективной. Китайские ученые также подтвердили возможность дифференцировки МСК в уротелий *in vitro* (Wu S. et al., 2013).

В эксперименте по реконструкции резецированного МП крысы децеллюляризованным лоскутом МП с аутологичными мечеными МСК в новообразованной стенке выявили не только признаки гладкомышечной регенерации, но и достоверно большее, сравнительно с контролем, число нейронов. Более того, меченые клетки обнаружены в зоне имплантации через 4 недели после операции и полностью исчезли к 14-й неделе (Zhe Z. et al., 2016).

Замещение 40-50% объема МП обезьянам композитом, состоящим из децеллюляризованного тонкокишечного матрикса, заселенного мечеными белком зеленой флуоресценции аутологичными МСК костного мозга, сопровождалось также формированием морфологического аналога стенки МП. При этом метки обнаружили в более чем 90% гладкомышечных клеток, и среди этих клеток более 70% экспрессировали Ki-67 - маркер пролиферации, что подтверждает дифференцировку пересаженных стволовых клеток в гладкие миоциты и их высокую пролиферативную активность (Sharma A.K. et al., 2011).

Положительные результаты использования стволовых клеток для восстановления мочевыводящих путей открывают огромные возможности исследователям в этих направлениях. Но все же до широкого клинического внедрения данных технологий необходимо решить великое множество вопросов. И в первую очередь необходимо найти наиболее подходящие для регенерации пузыря стволовые клетки и освоить методики работы с ними (Wood D., Southgate J., 2008).

1.5 Аллогенный клеточный продукт в регенеративной медицине и предпосылки его использования для реконструкции мочевого пузыря

Известно, что некоторые клетки организма не обладают выраженной иммуногенностью, и подходят для аллогенной трансплантации. В настоящее время аллогенные кожные сгенерированные трансплантаты уже применяются в клинической практике. Для создания эпидермальных пластов успешно используются аллогенные кератиноциты и фибробласты (Fabre J.W., 1991; Theriot A. et al., 2011; Мельцова А.Ж. и соавт., 2007; Швед Ю.А. и соавт., 2010.)

Еще одним типом клеток, подходящим для аллогенной трансплантации, являются МСК, которые могут воздействовать на иммунный ответ, снижая выраженность реакции на имплантат (Yan S. et al., 2013). Уникальность их заключается в возможности использования клеток как из аутологичных, так и из аллогенных источников без предварительного проведения фазы кондиционирования, в связи с их низкой иммуногенностью: клетки экспрессируют низкие уровни антигенов HLA 1 класса и не экспрессируют коактиваторы Т-клеток (Voswinkel J. et al., 2013). Также есть данные, что МСК подавляют пролиферацию Т-клеток (Bartholomew A. et al., 2002). Это не означает, что они вообще не обладают иммуногенностью: в исследовании на иммунокомпетентных мышцах доказано, что период полужизни МСК достоверно короче при повторном введении (Bartholomew A. et al., 2002; Zappia E. et al., 2005; Dalal J. et al., 2012).

В 2006 году аллогенные МСК использовали для системной терапии при Болезни Крона, резистентной к терапии кортикостероидами, иммуномодуляторами и инфликсимабом (Onken J. et al., 2006). У 9 из 10 пациентов отмечено снижение выраженности симптомов по шкалам IBDQ (inflammatory bowel disease questionnaire) и CDAI (Crohn's disease and Esophageal cancer activity index). Аналогичные результаты показало исследование на 7 пациентах с воспалительными заболеваниями кишечника

(болезнь Крона и язвенный колит), проведенное в 2012 году (Liang J. et al., 2012).

Китайскими учеными опубликованы положительные результаты внутривенного введения аллогенных МСК костного мозга для лечения системной красной волчанки (Yan S. et al., 2013). При сравнении с двумя исследованиями с трансплантацией аутологичных стволовых клеток (Burt R.K. et al., 2006; Jayne D. et al., 2004), трансплантация аллогенных МСК показала более высокую выживаемость (94% против 84% и 62% соответственно). 5 случаев летальных исходов (6%) не связаны с осложнениями терапии. Однако стоит отметить, что аутологичные клетки вводили после иммуносупрессивной химиотерапии, с чем связана высокая летальность.

Возрастает и интерес урологов к возможности применения МСК. За последний год опубликованы результаты системной терапии МСК при различных заболеваниях и экспериментальных работ по реконструкции различных урологических структур.

Доклинические исследования на различных животных моделях показывают, что при системном введении экзогенные МСК могут уменьшать степень повреждения почек при острой почечной недостаточности и ускорять процесс восстановления (Du T., Zhu Y.-J., 2014). Правда, полного понимания механизмов, отвечающих за эти защитные и регенеративные эффекты, пока нет. Предполагается, что они подключают паракринные механизмы регуляции медиаторов воспаления, за счет чего уменьшается степень повреждения почечной ткани. Также считается, что микрочастицы, отщепляющиеся от МСК, могут воздействовать на клетки-мишени, вызывая эпигенетические изменения, тем самым облегчая течение патологического процесса. Воздействуя на выработку медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины, на нейтрофилы, лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки и макрофаги, МСК могут уменьшать воспалительные реакции, восстанавливать здоровый эпителий, улучшая в итоге структурное и функциональное состояние почечной ткани.

Ренопротективный эффект объясняется рядом механизмов: 1) дифференцировкой МСК в ткань органа хозяина, 2) слиянием с собственными клетками организма хозяина, 3) стимуляцией эндогенного восстановления через активацию местных оставшихся стволовых клеток, 4) секрецией МСК эндокринных и/или паракринных сигналов. Практически все исследования, проведенные за последнее десятилетие, показали, что терапевтический эффект МСК преимущественно связан с паракринными механизмами, нежели с дифференцировкой (Du T., Zhu Y.-J., 2014). Выделено около 40 факторов роста, цитокинов и хемокинов, секретируемых МСК, таких как фактор роста гепатоцитов, инсулиноподобный фактор роста 1, сосудистый эндотелиальный фактор роста, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, KC, CXCL16, CCL2, CCL3, CX3CL1, CCL5 (Cheng K. et al., 2013; Tögel F. et al., 2013). вещества эти стимулируют пролиферацию клеток, уменьшают клеточный апоптоз, модулируя тем самым воспалительный процесс.

Мировой опыт применения аллогенных МСК для реконструкции МП на сегодняшний день, не считая наших данных (Yudintceva N.M. et al., 2016; Orlova N.V. et al., 2019, Орлова Н.В. и соавт., 2019), представлен единичными экспериментальными исследованиями. В 2013 году децеллюляризованный МП, заселенный человеческими пуповинными МСК трансплантирован собаке. Через 12 недель методами иммуногистохимии подтверждено формирование многослойного уротелия и хорошо выраженного гладкомышечного слоя (Yuan H. et al., 2013). Позднее бесклеточный ксеногенный МП, заселенный аутологичными МСК костного мозга трансплантирован на модели резекции мочевого пузыря у крыс. Через 6 месяцев отмечается 100% восстановление емкости мочевого пузыря. Гистологически также подтверждено восстановление уротелия и мышечной ткани (Coutu D.L. et al., 2014).

При имплантации в подслизистый слой МП крысам комбинированных трехмерных скаффолдов, заселенных аллогенными крысиными МСК, отмечено восстановление исходной емкости МП без признаков фибрирования (Kajbafzadeh A.M. et al., 2014).

Неожиданные результаты продемонстрированы на крысах при сравнении децеллюляризованного подслизистого слоя тонкой кишки и синтетического скаффолда из полилактида-ко-капролактона, заселенных аллогенными МСК (Pokrywczynska M. et al., 2014). Наилучшие результаты оказались именно при использовании подслизистой оболочки тонкой кишки. Гистологически выявили формирование полноценной структуры стенки МП в месте имплантации, в то время, как использование синтетического скаффолда приводило к перфорации резервуара или отторжению конструкции.

Meng L. et al. производили пластику МП кроликов после его резекции децеллюляризованным лоскутом МП, заселением аллогенными МСК и ГМК (Meng L.C. et al., 2015). Через 16 недель при гистологическом исследовании подтверждена полная эпителизация внутренней поверхности имплантата и формирование организованного гладкомышечного слоя.

В экспериментах на собаках также выполнена частичная резекция МП с пластикой децеллюляризованным лоскутом МП, заселенным человеческими МСК. Уже через 8-12 недель после реконструкции формировалась полноценная вновь образованная стенка, содержащая уротелиальную и мышечную оболочку (Hou X. et al., 2016).

В еще одном исследовании авторы использовали синтетический (поли-1,8-октанедиол-коцитрат) скаффолд, они доказали, что генетически модифицированные МСК в сочетании с CD34+ гемопоэтическими стволовыми клетками-предшественниками могут функционировать как альтернатива клеткам МП, одновременно способствуя восстановлению мочепузырной ткани (Snow-Lisy D.C. et al., 2015). Однако механизмы подобных эффектов так и остались не понятыми авторам. В эксперименте крысам выполнена субтотальная цистэктомия с трансплантацией синтетического резервуара, заселенного человеческими МСК костного мозга. Емкость полученных резервуаров через 4 недели составила 90% от дооперационной, гистологически отмечено прорастание сосудов, мышечных волокон, и признаки регенерации периферических нервов.

Bury M.I. et al. также показали, что замещение экспериментального дефекта МП у кроликов синтетическим скаффолдом с человеческими костномозговыми МСК в комбинации с гемопоэтическими CD34+ стволовыми клетками приводит к формированию компонентов мочепузырной стенки, включая мышечную оболочку (Bury M.I. et al., 2015).

Таким образом, можно сказать, что вопрос возможности применения МСК в клинической практике остается открытым, уникальные свойства этих клеток до сих пор полностью не изучены и представляют собой огромный научный интерес. Результаты проведенных на сегодняшний день, безусловно, обнадеживают, однако они требуют более пристального изучения (Martínez-Montiel M.P. et al., 2014).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика материала и методов исследования

Исследование экспериментальное, контролируемое, выполнено на базе вивария ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. В исследование вошли 26 взрослых половозрелых кроликов-самцов породы «шиншилла» массой $3459,30 \pm 19,31$ г ($2964-3892$ г): 7 животных в рамках этапа изучения биodeградации скаффолдов, 18 животных – в рамках основного этапа и 1 – в качестве здорового контроля, и 7 половозрелых нелинейных белых крыс-самцов, массой $377,57 \pm 17,28$ г ($329-469$ г) в рамках этапа изучения биodeградации скаффолдов.

Эксперимент состоит из двух этапов. На этапе *in vitro* на базе ИИЦ РАН созданы композитные матрицы, которые заселены различными аллогенными клетками кролика, выделенными по стандартной методике из кожи, мочевого пузыря и красного костного мозга. На этапе *in vivo* изучена биodeградация скаффолдов из поли-L,L-лактида с добавлением фиброина шелка и целлюлозы, затем приготовленные многокомпонентные композиты имплантированы кроликам-самцам породы «шиншилла» в стенку МП после его парциальной резекции.

Критерий исключения – летальный исход в течение месяца после оперативного вмешательства.

Методы оценки эффективности:

1. Динамика массы тела (еженедельный мониторинг);
2. Выживаемость животных и оценка лабораторных показателей;
3. Оценка электромиографической активности в зоне имплантации;
4. Прижизненное определение меченых клеток в зоне имплантации методом магнитно-резонансной томографии;
5. Макроскопическая оценка паренхиматозных органов и лимфатических узлов;
6. Сканирующая электронная микроскопия;
7. Гистологическое исследование;
8. Конфокальная микроскопия криосрезов мочевого пузыря.

Дизайн основного этапа исследования представлен на рисунке 1.

Создание скаффолдов



Рисунок 1 – Дизайн основного этапа исследования

2.2 Этап *in vitro*. Создание матриц и заселение их клетками

2.2.1 Создание матриц

В качестве основы для приготовления матрицы взят полимер на основе молочной кислоты – поли-L,L-лактид (производство «Sigma», США), который является наиболее подходящим из доступных материалов, так как соответствует ряду признаков: отсутствие токсичности, способность к биодegradации, безвредность продуктов распада (Rohrman D. et al., 1996, Pattison M.A. et al., 2005, Chen K.L. et al., 2010). Матрицы, представленные на рисунке 2, готовили двумя различными методами. Метод выщелачивания (рисунок 2а) позволяет создать довольно большой по площади скаффолд, который использовался для трансплантации кроликам. При создании небольших матриц для имплантации крысам использовали метод лиофильной сушки (рисунок 2б), который существенно увеличивает плотность конструкции.

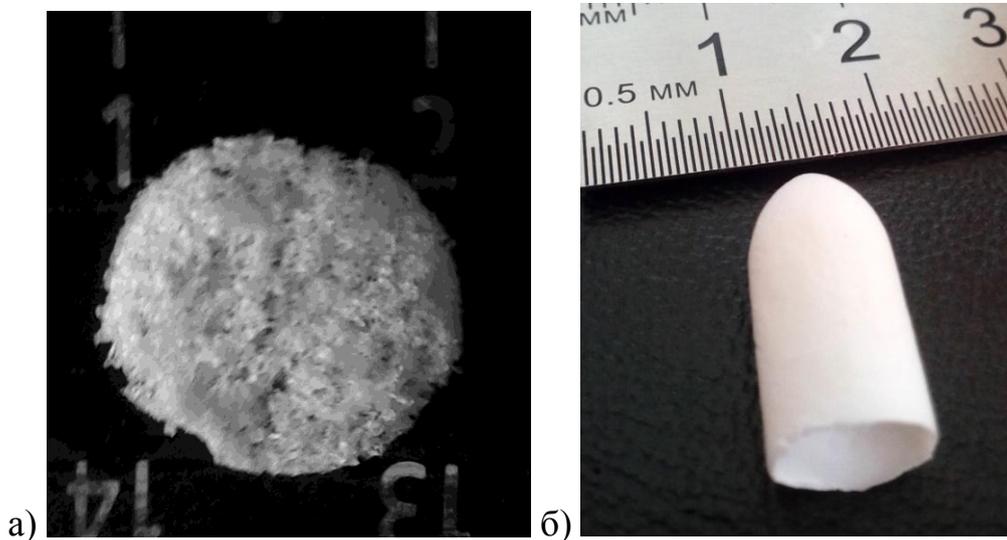


Рисунок 2 – Внешний вид приготовленных матриц: а – метод выщелачивания; б – метод лиофильной сушки

Физико-механические свойства разных по структуре скаффолдов изучены на предмет соответствия поставленным задачам. Всего исследованы *in vitro* и *in vivo* 3 типа матриц, полученных методом лиофильной сушки: скаффолд только из

поли-L,L-лактида (ПЛ), матрица, содержащая поли-L,L-лактид и ацетат целлюлозы (ПЛ+Ц) в концентрациях $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$, и 4 типа матриц, полученных методом выщелачивания: пористая конструкция, состоящая только из поли-L,L-лактида, имплантат из поли-L,L-лактида и ацетата целлюлозы в концентрации $\frac{1}{2}$, матрица, содержащая поли-L,L-лактид и фиброин шелка в соотношении 1:1 (ПЛ+Ф), и трехслойный скаффолд из поли-L,L-лактида с фиброином шелка в соотношении 1:1, укрепленный с наружной стороны мелкопористой поли-L,L-лактидной пленкой (ПЛ+Ф(Н)).

2.2.2 Выделение и идентификация клеток

Клетки МП кролика – уротелий (У) и гладкомышечные клетки (ГМК) – выделены по стандартной методике после забора фрагмента стенки мочевого пузыря методом открытой биопсии (Sangha N., 2013). Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) выделены по стандартной методике (Pittenger M.F. et al., 1999) после забора красного костного мозга из гребня подвздошной кости. Фибробласты (ФБ) выделены по стандартной методике из кожи с внутренней поверхности ушной раковины кролика. Морфология выделенных клеток представлена на рисунке 3.

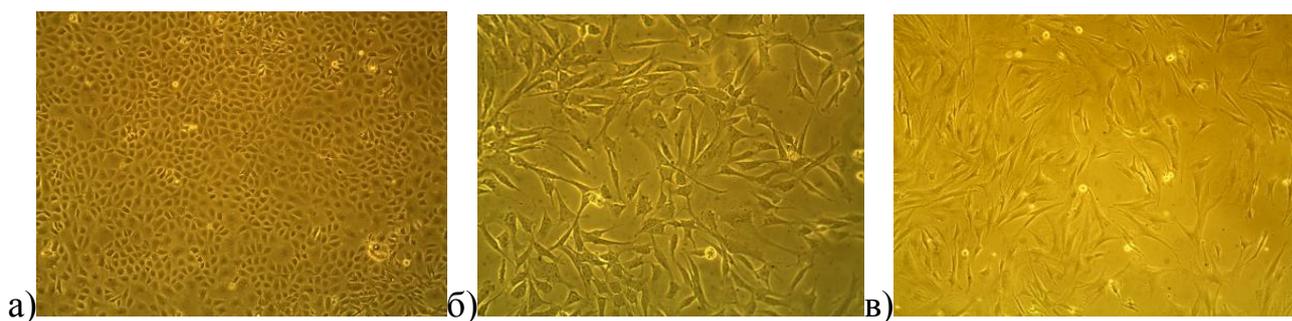


Рисунок 3 – Морфология выделенных клеток кролика: а – монослой уротелия; б – гладкие миоциты; в – МСК; (ув. x10)

Идентификация клеток произведена с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции антителами против Cytokeratin 5,19 (маркеры уротелия, граничащего с базальной мембраной и промежуточного слоя соответственно),

Von Willebrand Factor, CD31 (маркеры эндотелиальных клеток) и SM α A (маркер гладкомышечных клеток). Выполнено иммунофенотипирование МСК на третьем пассаже с помощью моноклональных антител Abcam (США) на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter). Относительное количество позитивных клеток с иммунофенотипическими маркерами CD90 и CD105, характерными для МСК, составило 81% и 92% (соответственно), гемопоэтический маркер CD45 отсутствовал. Кроме того, МСК мечены суперпарамагнитными наночастицами на основе магнетита (SPION), которые позволяют визуализировать клетки в МП методом магнитно-резонансной томографии (Lee H. et al., 2015). Эти данные не противоречат опубликованным ранее (Yun S., Ja H., 2007), где доказано, что добавление меток SPION к МСК не влияло на функциональную активность клеток, которые проходили потом нормальную хондрогенную, адипогенную и остеогенную дифференциацию. Данные конфокальной микроскопии культуры меченых МСК представлены на рисунке 4.

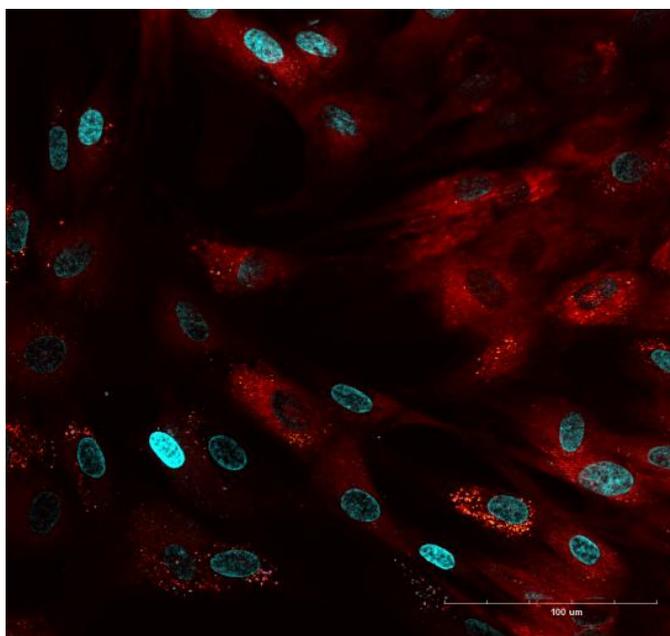


Рисунок 4 – Данные конфокальной микроскопии культуры меченых МСК (масштаб 100 мкм)

На рисунке хорошо видны клетки, имеющие красные включения в цитоплазме (суперпарамагнитные наночастицы). Для лучшей визуализации ядра клеток окрашены DAPI.

Коллагеновый гель с выделенными культурами клеток в концентрации 10^6 /мл введен в скаффолды (рисунок 5).

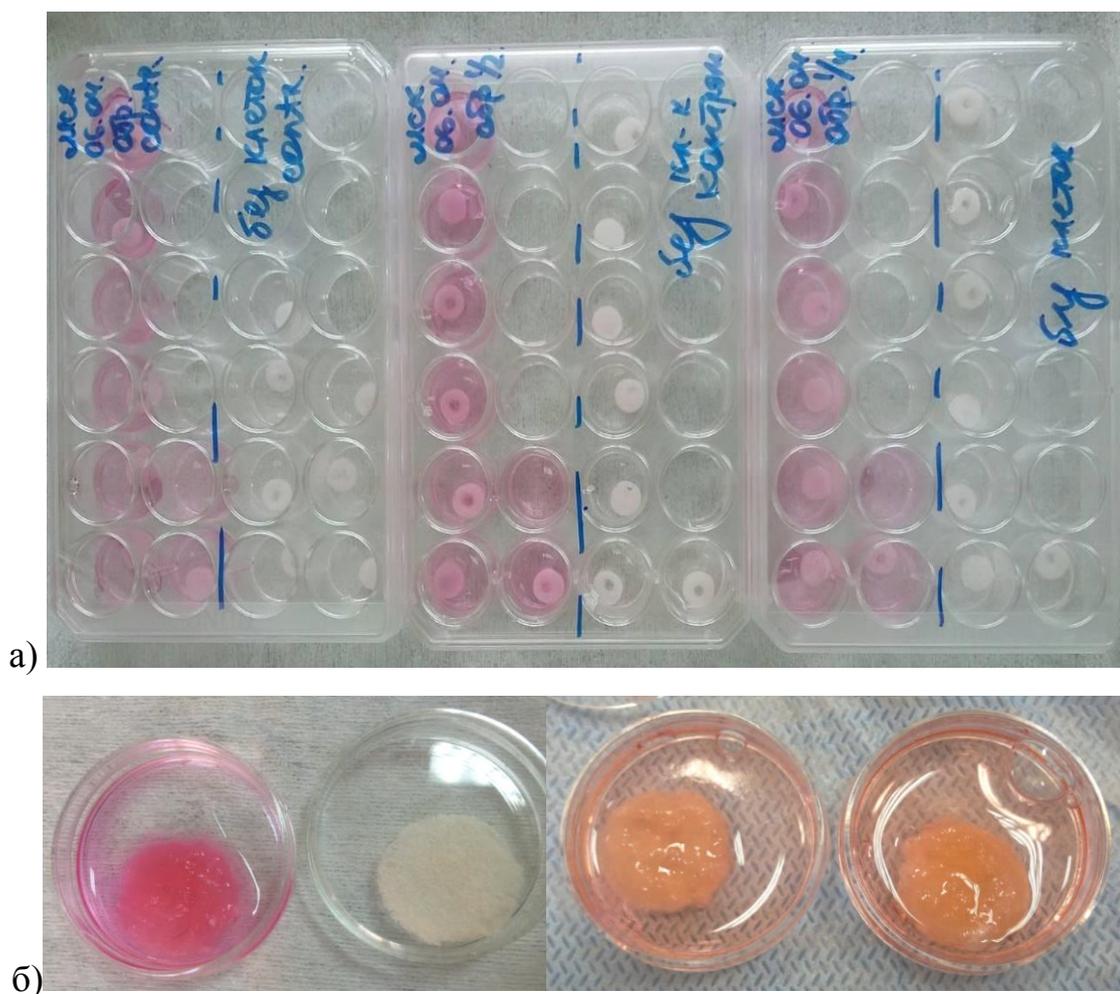


Рисунок 5 – Внешний вид скаффолдов, пустых и заселенных клетками:
а – метод лиофильной сушки; б – метод выщелачивания

На рисунке представлен внешний вид пустых матриц, а также заполненных коллагеновым гелем с клетками, помещенных в питательную среду.

Всего приготовлено 73 различных матрицы. Типы приготовленных многокомпонентных композитов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Типы многокомпонентных композитов в зависимости от матрицы и клеточного состава

Тип матрицы	Клетки	Кол-во
Метод лиофильной сушки		
поли-L,L-лактид	без клеток	7*
поли-L,L-лактид	МСК	7*
поли-L,L-лактид +целлюлоза 1/2	без клеток	7*
поли-L,L-лактид +целлюлоза 1/2	МСК	7*
поли-L,L-лактид +целлюлоза 1/4	без клеток	7*
поли-L,L-лактид +целлюлоза 1/4	МСК	7*
Метод выщелачивания		
поли-L,L-лактид	без клеток	1*
поли-L,L-лактид +целлюлоза 1/2	МСК	4*
поли-L,L-лактид +фиброин шелка	МСК	3*
поли-L,L-лактид +фиброин шелка	без клеток	3*
поли-L,L-лактид+фиброин шелка, непроницаемые	ГМК+У	3
поли-L,L-лактид+фиброин шелка, непроницаемые	ФБ	3
поли-L,L-лактид+фиброин шелка, непроницаемые	без клеток	3
поли-L,L-лактид+фиброин шелка, непроницаемые	МСК	8

Примечание: * – для подготовительного этапа

На рисунке 6 представлен вид матрицы, заселенной МСК, и без клеток под микроскопом.

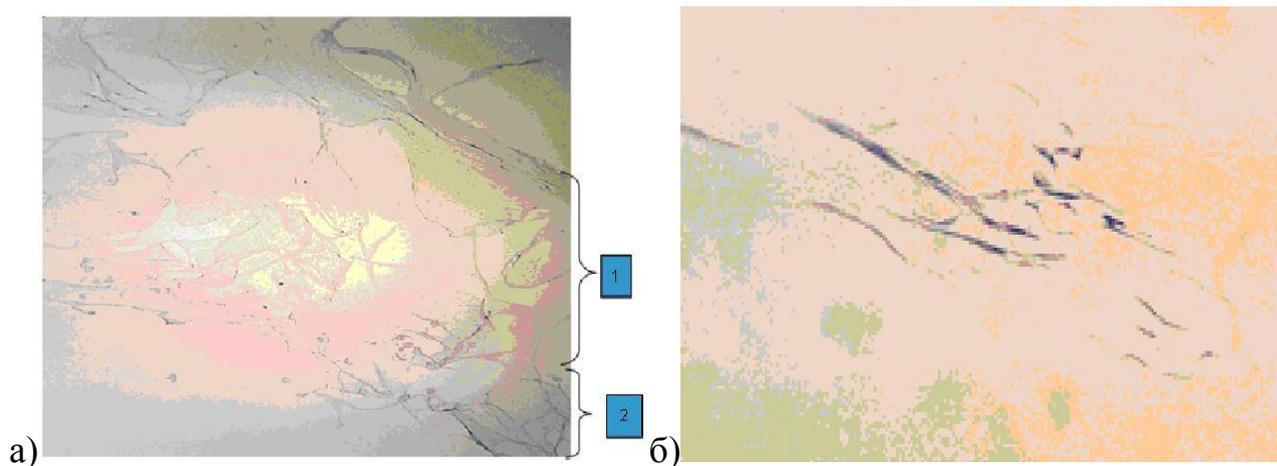


Рисунок 6 – Вид полилактидной матрицы под микроскопом (ув. x40, гематоксилин-эозин): а – без клеток, б – заселенный клетками

При исследовании матрицы, содержащей МСК под микроскопом один из наружных слоев представлен неорганическими волокнами сетчатой направленности. Этот слой intimately связан и незначительно интегрирован в слой сетчатого вида рыхлых коллагеновых волокон, ячейки которых выстланы фибробластоподобными клетками (МСК). Клетки МСК выстилают сформированные ячейки, равномерно распределяясь по матрице, в наружных отделах формируя островками поверхностные слои в 1-2 слоя клеток.

2.3 Имплантация многокомпонентного композита в эксперименте *in vivo*

2.3.1 Характеристика лабораторных животных

Исследование выполнено на самцах беспородных белых крыс и кроликах-самцах породы «шиншилла» (питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН, Санкт-Петербург). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и ГОСТ Р 53434-2009. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура поддерживалась в пределах +23 – +25⁰С, относительная влажность – 50 – 70%. Воздухообмен поддерживался с помощью приточно-вытяжной вентиляции, стерилизация воздуха осуществлялась ежедневно путем кварцевания. Пищевой рацион соответствовал приказу Минздрава СССР «Нормативы затрат кормов для лабораторных животных» №1179 от 10 октября 1983г.

Исследования проводили в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123» и Правилами лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»).

Животных включали в исследование после двухнедельного карантина, при отсутствии внешних признаков патологии, изменений в обще-поведенческих 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.

Забор крови у кроликов, вошедших в основной этап эксперимента, производился из краевой ушной вены за сутки до оперативного вмешательства, забор мочи - интраоперационно шприцом 5 мл.

Исследуемые показатели:

Клинический анализ крови: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты с лейкоцитарной формулой, тромбоциты, СОЭ.

Биохимический анализ крови: общий белок, АЛТ, АСТ, глюкоза, общий билирубин, креатинин, С-реактивный белок.

Общий анализ мочи.

2.3.2 Предварительный этап. Изучение скорости биodeградации поли-L,L-лактида

В качестве предварительного этапа для изучения сроков биodeградации ПЛ+Ц скаффолдов, полученных способом лиофильной сушки, созданы 42 матрицы различного состава. Произведено разделение на 3 группы (по 14 шт. в каждой группе), 1 – матрицы без добавления целлюлозы, 2 – с добавлением целлюлозы в концентрации $\frac{1}{2}$ и 3 – в концентрации $\frac{1}{4}$. Для изучения сроков биodeградации скаффолдов 7 лабораторным крысам подкожно в боковые отделы спины помещены матрицы (6 матриц каждому животному: 3 скаффолда каждого типа - без клеток и 3 – заселенные мезенхимальными стволовыми клетками). На рисунке 7 представлен момент введения ПЛ+Ц матрицы, заселенной МСК, под кожу крысы.



Рисунок 7 – Помещение скаффолда, полученного методом лиофильной сушки, под кожу

Также в рамках предварительного этапа 3 кроликам под кожу в боковые отделы спины введены ПЛ+Ф матрицы, полученные методом выщелачивания (3 – без клеток и 3 – заселенные МСК), с целью определения скорости биодеградации скаффолда (рисунок 8). Матрицы извлечены через 1,2 и 3 недели.



Рисунок 8 – Помещение скаффолда, полученного методом выщелачивания, под кожу: а – скаффолд с МСК; б,в – матрица без клеток

На рисунке представлен момент введения ПЛ+Ф матриц, с МСК и без клеток, под кожу кролика.

На том же этапе 4 кроликам выполнено замещение дефекта стенки МП после его парциальной резекции ПЛ+Ц скаффолдами с содержанием целлюлозы $\frac{1}{2}$, полученными методом выщелачивания и заселенными аллогенными МСК. Период наблюдения составил 3 месяца.

2.3.3 Протокол оперативного вмешательства

Приготовленными многокомпонентными конструкциями на полилактидной основе, заселенными клетками выполнено замещение дефекта стенки МП после его парциальной резекции у 15 кроликов. Еще 2 животным в качестве отрицательного контроля трансплантирован аллогенный лоскут мочепузырной стенки (АЛ). 1 животное оставлено интактным.

Операция завершалась оставлением цистостомического дренажа (подключичный катетер) выведенного под кожей на спину. Длительность катетеризации в этих случаях составила 14 суток.

Анестезиологическое пособие: комбинированный препарат для анестезии тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, France) в дозе 25 мг/кг массы тела внутримышечно; миорелаксант ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в виде 2% раствора в объеме 1,0-1,5 мл внутримышечно.

Протокол операции: Под общей анестезией МП кролика выведен в рану через срединный лапаротомический разрез длиной 4 см (рисунок 9).

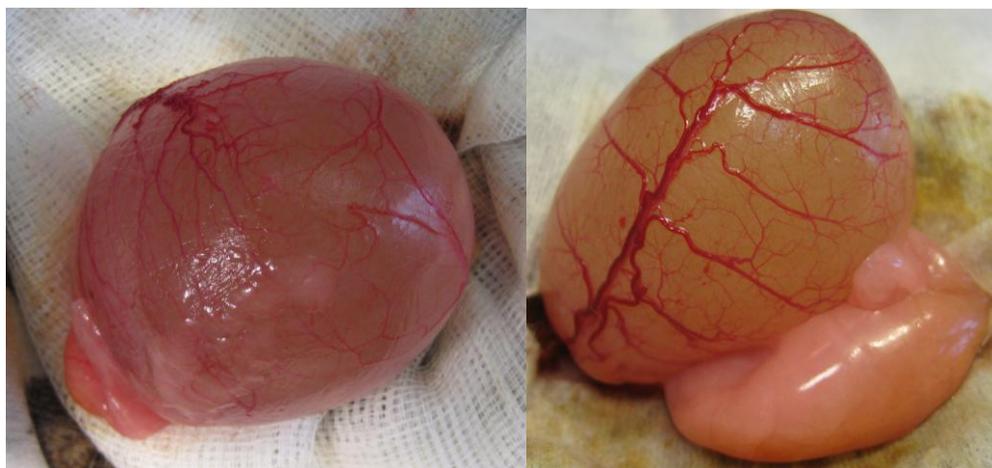


Рисунок 9 – Внешний вид наполненного интактного мочевого пузыря

Выполнена ЭМГ, с определением емкости МП. По передней стенке МП частично отсепарирована паравезикальная клетчатка, резецирован фрагмент стенки пузыря 1,0x1,0 см (рисунок 10).

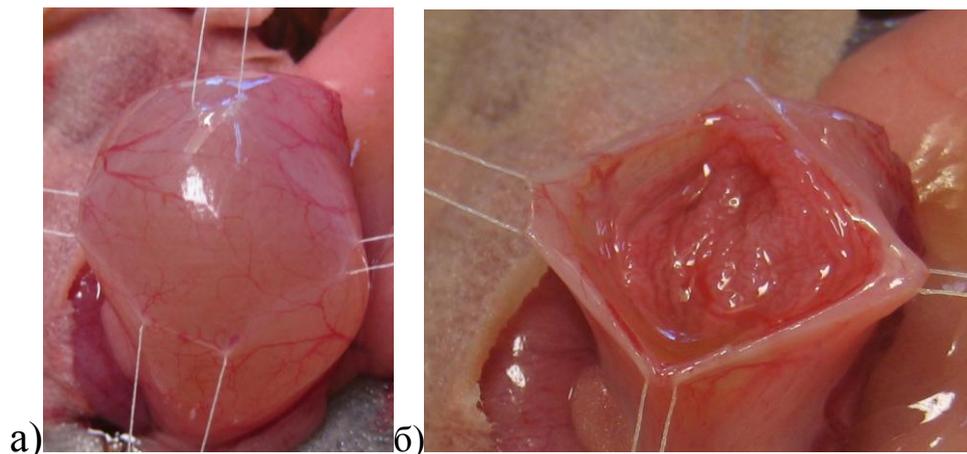


Рисунок 10 – Резекция фрагмента мочевого пузыря: а – выделенный участок стенки мочевого пузыря на держалках, б – вид мочевого пузыря после резекции

В место дефекта фиксирован к стенке МП приготовленный многокомпонентный композит (или аллогенный лоскут) узловыми швами викрил 4-0, снаружи анастомоз укреплен отсепарированной околопузырной клетчаткой. Этапы операции представлены на рисунке 11.

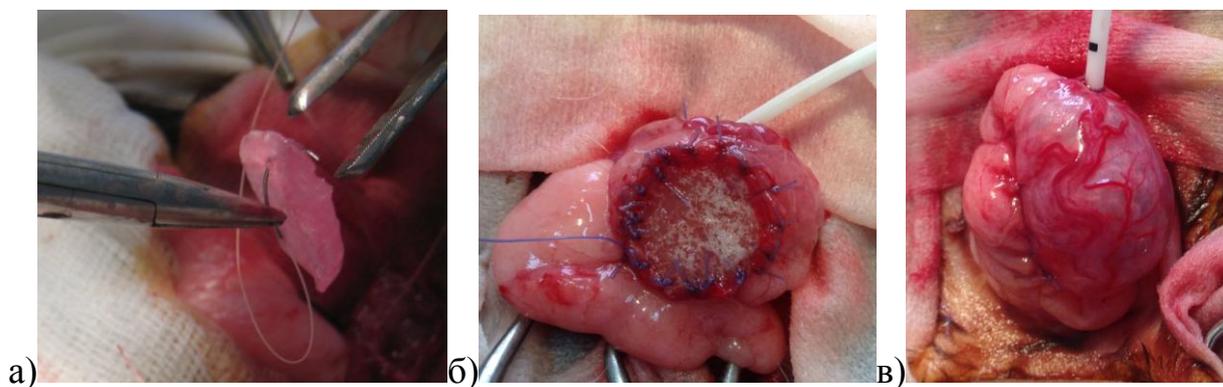


Рисунок 11 – Этапы операции: а – внешний вид трансплантируемого скаффолда; б – скаффолд, фиксированный в месте дефекта; в – вид мочевого пузыря в конце операции

Операционная рана ушита послойно с оставлением цистостомического дренажа, выведенного под кожей на спину.

Антибактериальная терапия: все животные получали интраоперационно цефазолин, в/м в дозировке 10 мг/кг в 2 мл физиологического раствора.

В зависимости от типа пересаженного многокомпонентного композита, сформированы 5 групп. Распределение животных по группам представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение животных по группам в зависимости от пересаженного многокомпонентного композита

Группа (клетки)	Кол-во
1 (ГМК+У)	3
2 (ФБ)	3
3 (МСК)	6*
4 (без клеток)	3
5 (Аллогенный лоскут)	3

Примечание: * – 2 животных выбыли из исследования – летальные исходы на ранних сроках после операции (11 и 7 сут. соответственно).

Из таблицы видно, что образовались следующие группы: животные, получившие скаффолд, заселенный ГМК и У; животные, получившие скаффолд с фибробластами; 3 группа – скаффолд, заселенный МСК; кролики 4 группы получили матрицу без клеток; и животным 5 группы в качестве контроля трансплантирован аллогенный лоскут мочепузырной стенки. Группы 1,2,4,5 состояли из 3 животных, а в группу 3 вошло 6 кроликов.

2.3.4 Период наблюдения и эвтаназия

Период наблюдения в среднем составил 2 месяца ($55,17 \pm 5,11$ суток, 28-86), в течение которых еженедельно измерялась масса тела животного, также исследовались клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи. В конце периода наблюдения повторно выполняли ЭМГ с определением емкости МП.

Животные выведены из эксперимента с использованием препаратов тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoletil, Virbac SA, Франция) и миорелаксант ксилазина гидрохлорид (рометар, Bioveta, Чехия) в дозах в 5 раз превышающих терапевтическую. Сроки выведения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сроки выведения и длительность наблюдения

Группа (клетки)	Сут.
1 (ГМК+У)	61,00±0,00
2 (ФБ)	41,33±3,07
3 (МСК)	61,17±7,22
4 (без клеток)	61,67±14,08
5 (Аллогенный лоскут)	57,33±13,44

Из таблицы видно, что сроки наблюдения мало различаются между группами и составляют в среднем около 2 месяцев.

2.3.5 Методы оценки эффективности

1. Динамика массы тела (еженедельный мониторинг).
2. Выживаемость животных и оценка лабораторных показателей.

Лабораторные анализы: Забор крови из краевой ушной вены производился всем животным перед эвтаназией, а также некоторым животным при ухудшении общего состояния. Забор мочи осуществлялся при некропсии шприцом 5 мл.

Исследуемые показатели:

Клинический анализ крови: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты с лейкоцитарной формулой, тромбоциты, СОЭ.

Биохимический анализ крови: общий белок, АЛТ, АСТ, глюкоза, общий билирубин, креатинин, С-реактивный белок.

Общий анализ мочи.

Сводные данные представлены в таблицах 4-6.

Таблица 4 – Клинический анализ крови до операции

Показатель (реф. зн.)	Гр. 1 (n=3) (M±m)	Гр. 2 (n=3) (M±m)	Гр. 3 (n=6) (M±m)	Гр. 4 (n=3) (M±m)	Гр. 5 (n=3) (M±m)
Эритроциты (5,2-7,8) x10 ⁶ /мкл	5,96±0,11	6,49±0,07	6,50±0,20	6,15±0,07	6,05±0,05
Гемоглобин (100,5-160) г/л	127,00±2,83	148,33±0,27	140,00±2,17	130,33±3,07	135,67±2,33
Гематокрит (35-48) %	38,77±0,76	43,20±0,13	40,18±0,43	38,55±1,18	40,10±0,41
Лейкоциты (2,6-9,9) x10 ³ /мкл	4,80±0,45	8,80±0,42	10,70±0,35	4,00±0,29	10,20±0,94
Палочко- ядерные нейтрофилы, %	0,33±0,22	0	0,83±0,20	0,67±0,11	0,33±0,00
Тромбоциты (130-900) x10 ³ /мкл	387,67±43,89	576,33±52,41	458,33±24,75	177,33±0,72	424,00±23,84
СОЭ, мм/ч	1,67±0,54	2,00±0,00	2,83±0,39	2,00±0,00	2,00±0,00

Из таблицы видно, что анализы всех животных перед операцией были в пределах нормальных значений. У 4-х животных выявлен незначительный лейкоцитоз ($\leq 12,5$) без палочкоядерного сдвига и повышения СОЭ.

Таблица 5 – Биохимический анализ крови до операции

Показатель (реф. зн.)	Гр. 1 (n=3) (M±m)	Гр. 2 (n=3) (M±m)	Гр. 3 (n=6) (M±m)	Гр. 4 (n=3) (M±m)	Гр. 5 (n=3) (M±m)
Общий белок (54-75 г/л)	62,67±3,41	66,00±0,33	65,33±0,12	62,00±0,94	64,33±1,18
АЛТ (25-60 МЕ/л)	37,67±2,59	40,00±3,33	39,70±0,48	26,33±9,90	39,00±3,30
АСТ (5-31 МЕ/л)	18,00±5,00	47,67±5,22	39,00±2,97	26,67±7,18	29,00±2,24
Общий билирубин (3,4-8,5 мкмоль/л)	8,83±0,12	12,07±0,40	8,88±0,11	8,83±0,12	12,75±0,74
Глюкоза (6,1-15,9 ммоль/л)	10,50±0,98	10,93±1,47	9,35±0,77	13,01±0,07	10,11±1,24
Креатинин (44,2-141,4 мкмоль/л)	86,00±11,05	94,00±2,36	97,17±6,82	98,67±2,60	86,67±7,81
С-реактивный белок (мг/л)	0	3,73±0,00	4,43±0,89	1,67±1,11	1,53±1,02

Из таблицы видно, что средние значения показателей крови до операции в пределах нормальных значений.

Таблица 6 – Общий анализ мочи перед операцией

Группа	Плотность (кг/м ³) (M±m)	Глюкоза (г/л) (M±m)	Эпителий в поле зрения (M±m)	Лейкоциты в поле зрения (M±m)	Эритроциты в поле зрения (M±m)	Соли (%)
Группа 1 (n=3)	1021,67±2,48	0,63±0,42	1,33±0,31	2,33±0,09	0,00	Фосфаты (66.6%)
Группа 2(n=3)	1020,00±2,36	0,00	1,00±0,33	0,66±0,11	0,00	Фосфаты (33,3%)
Группа 3 (n=6)	1015,00±1,77	0,70±0,00	0,75±0,09	2,00±0,35	1,00±0,50	Фосфаты (75%)
Группа 4 (n=3)	1015,00±0,00	0,00	1,00±0,50	1,00±0,67	0,67±0,44	Фосфаты (100%), Оксалаты (50%)
Группа 5 (n=3)	1021,67±3,60	1,83±1,22	1,00±0,67	0,00	0,00	Фосфаты (66.6%)

Из таблицы видно, что на дооперационном этапе из отклонений от нормы зафиксировано присутствие солей (фосфатов и в одном случае – оксалатов) в большем количестве практически во всех анализах, что, по-видимому, связано с особенностями рациона. В некоторых случаях получить достаточное для анализа количество мочи не представлялось возможным из-за опорожненного МП.

3. Оценка электромиографической активности в зоне имплантации:

Для определения функциональной активности МП кроликам (из группы 2 (ФБ), из группы 3 (МСК) и из группы 4 (БМ)) выполнялась ЭМГ после наполнения МП физиологическим раствором 24°С до начала мочеиспускания. Одновременно измерялась активность в месте имплантации и интактной части стенки МП при помощи введения 2-х пар одноразовых подкожных нержавеющей игольчатых электродов (12,0 мм x 0,4 мм, Viasys, Santa Monica, CA, США). Рисунок 12 демонстрирует внешний вид наполненного МП с игольчатыми электродами.

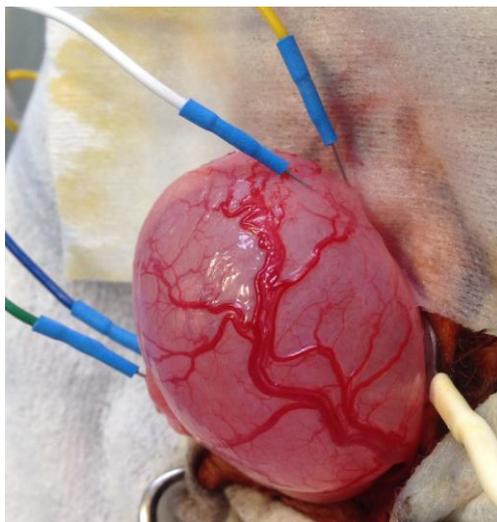


Рисунок 12 – Внешний вид мочевого пузыря кролика при выполнении электромиографии

4. Прижизненное определение меченых клеток в зоне имплантации методом магнитно-резонансной томографии.

Животным выполнена магнитно-резонансная томография под наркозом на базе ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (томограф Magnetom Trio A Tim 3.0 Тесла, Siemens, режим t2). Сроки выполнения исследования представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Сроки выполнения МРТ

Группа	Сутки после операции
Группа 2 (ФБ)	1 неделя - 1 месяц
Группа 3 (МСК)	2.5 месяца
Группа 4 (БМ)	2.5 месяца

5. Макроскопическая оценка паренхиматозных органов и лимфатических узлов.

Оценка проводилась по следующим параметрам: размер, цвет, структура, плотность, наличие изменений в виде рубцов, полостей, кальцинатов, отека.

6. Сканирующая электронная микроскопия:

Для выполнения сканирующей электронной микроскопии образцы фиксировались в 1,25% растворе глутаральдегида (Polyscience) в 0,05 М какодилатном буферном растворе, содержащем 8,5% сахарозы, при значениях pH 7,4 и температуре 4°C на ночь. Затем выдерживались 1 час при комнатной температуре в 1% растворе OsO₄ в том же буфере. После фиксации и обработки этанолом образцы помещались в заливочную среду низкой вязкости “Spurr” (Ted Pella). Затем с помощью микротома Reichert Jung ultracut E приготовлены ультратонкие срезы, которые помещали на никелевые решетки и обрабатывали уранилацетатом и нитратом свинца для контрастирования. Полученные препараты исследовали на электронном микроскопе Libra 120, 80 kV.

7. Гистологическое исследование:

Учитывая очевидные признаки отторжения имплантата в группах 1,2,4,5 принято решение проводить исследование только в случаях наличия хорошо видимого вновь сформированного участка стенки МП в месте имплантации. Таким образом гистологически оценены микропрепараты МП животных из группы 3 - №8 и №11 (выбраны 2 наиболее показательных случая). Также, в качестве контроля, исследован МП интактного кролика №20.

Стенку мочевого пузыря 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.

Для микроскопического исследования срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Для гистохимического исследования с целью выявления фиброза применялась окраска по Ван Гизон, для выявления наночастиц, меченных Fe₃O₄ – окраска на железо и его соединения. При морфометрическом исследовании измерялись толщина эпителия, собственного слоя слизистой оболочки, толщина подслизистой, мышечной и наружной соединительнотканной оболочки мочевого пузыря. Также производился подсчет количества сосудов микроциркуляторного русла на 1 мм² и диаметр просвета сосудов в подслизистой оболочке при помощи морфометрической линейки. Полуколичественно оценивалась степень

выраженности воспалительного инфильтрата лимфоцитами. Морфологическое исследование гистологических препаратов и препаратов, окрашенных гистохимическим методом, проводилось при помощи светооптического микроскопа (Leica DM LS, Германия) при увеличении микроскопа $\times 50 - \times 200$. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры (Leica DC 320, Германия).

8. Конфокальная микроскопия криосрезов мочевого пузыря:

Для приготовления криосрезов ткань заключали в раствор «Tissue tec» (криогель) и замораживали в жидком азоте путем многократного погружения. Криосрезы толщиной 15-20 мкм, полученные на криотоме (Bright Instrument Company Limited), помещали на предметные стекла «super frost» и фиксировали 10%-ным раствором формалина. Для окрашивания ядер клеток после фиксации срезы выдерживали в течение 5 мин в 1%-ном растворе красителя DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). Затем препараты трижды отмывали сбалансированным физиологическим солевым раствором PBS (137 мМ NaCl, 7 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4, 1.5 мМ KH₂PO₄, 2.7 мМ KCl) с использованием реактивов квалификации особо чистых реактивов («Реахим», Россия; «Sigma», США, «Helicon», США). В качестве заключающей среды использовали Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция). Анализ полученных препаратов проводили с помощью Bright конфокального микроскопа Leica TCS SL (Zeiss, Германия), для возбуждения флуоресценции использовали HeNe –лазер с длиной волны 504 нм.

2.4 Статистическая обработка

Математическую обработку полученных клинико-морфологических данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И РЕЗОРБТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРА ПОЛИ-L,L-ЛАКТИДА И КОМПОЗИТНЫХ МАТРИЦ НА ЕГО ОСНОВЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ

После анализа литературы и изучения физических характеристик различных доступных материалов принято решение взять за основу матрицы поли-L,L-лактид. В подобных матрицах отсутствуют специфические сайты связывания с клеточными рецепторами, поэтому клетки в них вводили в геле на основе коллагена 1 типа. Однако заполненная гелем матрица на практике оказалась недостаточно механически прочной для надежной фиксации к стенке МП. Для укрепления в часть скаффолдов введен фиброин шелка.

На рисунке 13 представлены данные сканирующей электронной микроскопии скаффолда, состоящего из поли-L,L-лактида и фиброина шелка. Представлены снимки поперечного среза скаффолда, а также его внешней и внутренней сторон.

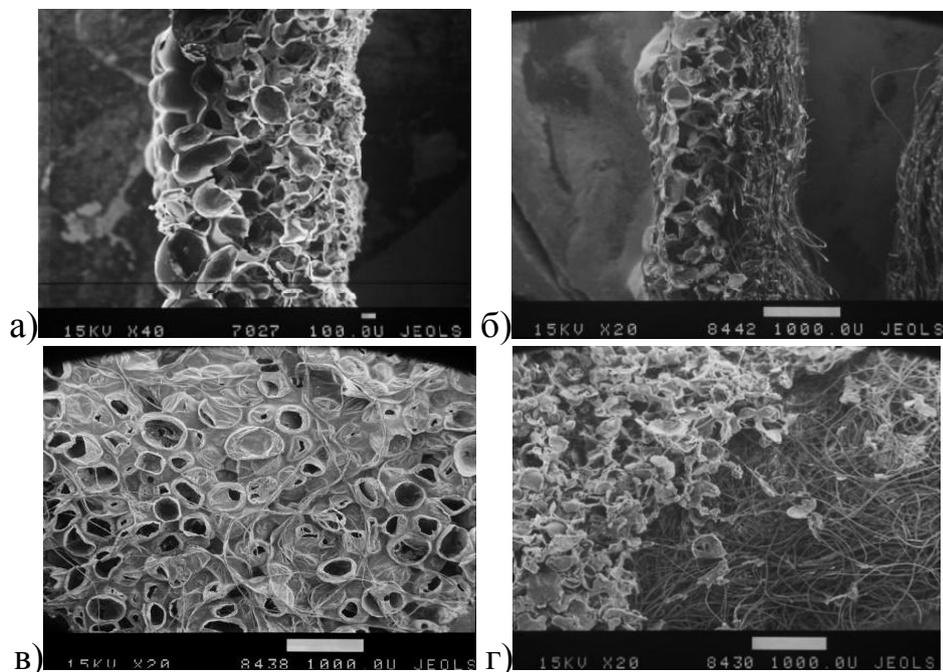


Рисунок 13 – Сканирующая электронная микроскопия готовых скаффолдов (ув. x20): а – поли-L,L-лактид, поперечный срез; поли-L,L-лактид с фиброином шелка: б – поперечный срез; в – внутренняя сторона; г – внешняя сторона

Также, помимо фиброина шелка в часть матриц введена целлюлоза (ПЛ+Ц скаффолд) в концентрациях $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$. Такие матрицы показали очень хорошую механическую прочность и эластичность.

3.1 Скорость биодеградации скаффолдов разного типа

В рамках предварительного этапа изучены сроки биодеградации ПЛ+Ц и ПЛ+Ф скаффолдов.

Для изучения биодеградации ПЛ+Ц скаффолдов 7 крысам под кожу боковых отделов спины имплантированы матрицы 3-х типов: матрицы без добавления целлюлозы, с добавлением целлюлозы в концентрациях $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ (6 матриц каждому животному: 3 скаффолда каждого типа – без клеток и 3 – заселенные МСК). Несмотря на удовлетворительные прочностные характеристики при исследовании биодеградации *in vivo* в течение 3 месяцев после имплантации такой композит практически не резорбировался. При этом вокруг имплантатов во всех случаях отмечено формирование фиброзной капсулы (рисунок 14).



Рисунок 14 – Внешний вид заселенного МСК скаффолда, содержащего целлюлозу в соотношении 1/2, через 3 месяца после введения под кожу крысе

На рисунке хорошо видна фиброзная капсула вокруг скаффолда, сформировавшаяся через 3 месяца после помещения под кожу лабораторной крысы. Размеры его близки к исходным. Такой длительный срок биodeградации обусловлен повышенной плотностью матриц, полученных методом лиофильной сушки. В дальнейшем для приготовления матриц использовался только метод выщелачивания.

Также после 3-х месяцев наблюдения зафиксировано отторжение пересаженного композита всех кроликов ($n=4$), перенесших замещение дефекта МП ПЛ+Ц скаффолдом, содержащим аллогенные МСК (рисунок 15).



Рисунок 15 – Внешний вид мочевого пузыря кролика через 3 месяца после замещения дефекта заселенным МСК скаффолдом, содержащим целлюлозу в соотношении 1/2

На представленном рисунке видны папиллярные разрастания в месте имплантации с выраженным отеком слизистой, матрица вытеснена в просвет МП. Учитывая отсутствие признаков резорбции имплантата и отторжением его во всех случаях, принято решение отказаться от использования и целлюлозы в составе скаффолда.

Для изучения биodeградации ПЛ+Ф скаффолдов 3 кроликам под кожу боковых отделов спины помещены матрицы (3 – без клеток и 3 – заселенные МСК). Через 1 и 2 недели размеры, форма и консистенция бесклеточных матриц и скаффолдов с МСК были сопоставимы с исходными. Выраженного

воспалительного процесса вокруг композитов не отмечалось во всех случаях. Через 3 недели отмечается уменьшение размеров и толщины ПЛ+Ф скаффолда, содержащего МСК почти в 2 раза от первоначальных значений (0,9x1,2 см, при исходном диаметре 2,0 см). В случае трансплантации не заселенного клетками ПЛ+Ф скаффолда, через 3 недели отмечается его инкапсуляция без значимых изменений размеров (1,6x1,9см при исходном диаметре 2,0 см). Внешний вид скаффолдов через 3 недели представлен на рисунке 16.

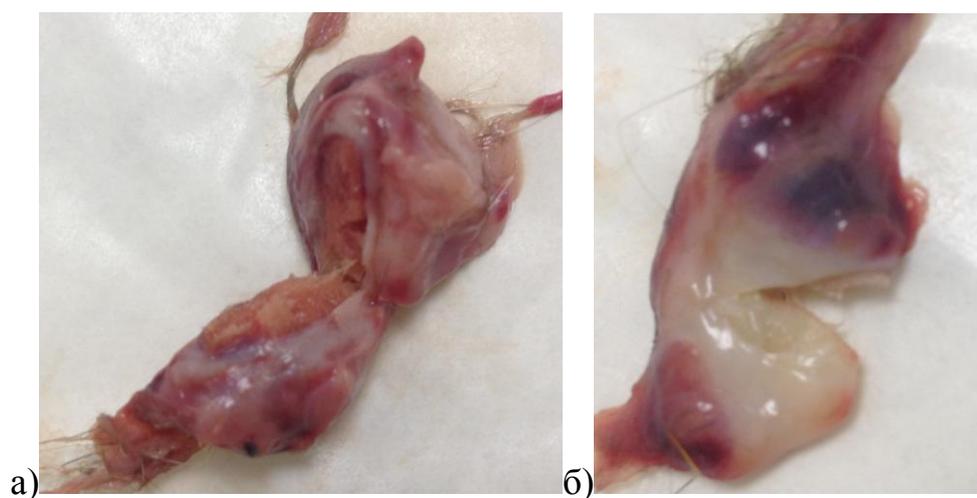


Рисунок 16 – Внешний вид помещенного под кожу скаффолда через 3 недели: а – матрица без клеток, б – скаффолд с МСК

Исходя из сроков резорбции, в качестве критерия исключения принята летальность в течение месяца после операции, так как на более раннем сроке невозможно оценить приживляемость композита.

3.2 Сравнительная характеристика различных типов матриц

По результатам проведенных опытов наиболее подходящей оказалась ПЛ+Ф матрица, полученная методом выщелачивания. Однако такая матрица оставалась проницаема для жидкости, что является существенным недостатком при создании обширных скаффолдов. Поэтому с наружной стороны конструкцию покрыли мелкопористой водонепроницаемой пленкой из поли-L,L-лактида, что, к тому же, добавило дополнительной механической прочности.

Прочностные характеристики 3 типов матриц (ПЛ, ПЛ+Ф, и ПЛ+Ф(Н)) приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Механические свойства матриц из поли-L,L-лактида

	Длина, Мм	Толщина, Um	Ширина, mm	Модуль (автоматический Юнга), MPa	Прочность (стандарт), MPa	Деформация при растяжении (стандарт), %
ПЛ	10,00000	1320,00000	2,50000	0,73093	0,00076	11,12640
ПЛ+Ф	10,00000	1200,00000	2,50000	0,77626	0,01339	17,67459
ПЛ+Ф(Н)	10,00000	1210,00000	2,50000	0,55649	0,00780	19,14004
Среднее	10,00000	1243,33333	2,50000	0,68789	0,00732	15,98034
Коэффициент вариации	0,00000	5,35522	0,00000	16,86776	86,49572	26,70168
Стандартное отклонение	0,00000	66,58328	0,00000	0,11603	0,00633	4,26702

Из таблицы видно, что наиболее механически прочным оказался ПЛ+Ф образец матрицы, что обусловлено относительно высоким содержанием фиброина шелка. Но результат его деформации при растяжении уступает таковому у ПЛ+Ф(Н) скаффолда. К тому же, последний образец является непроницаемым для воды, что существенно в данном опыте.

Сравнительная характеристика всех приготовленных матриц представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Сравнительная характеристика созданных матриц

Тип матрицы	*Возможность культивирования клеток	**Прочность	*Эластичность	*Водонепроницаемость
ПЛ (n=14)	+	+/-	-	-
ПЛ+Ц (n=32)	+	++	+	-
ПЛ+Ф (n=6)	+	+	+	-
ПЛ+Ф(Н) (n=17)	+	++	+	+

Примечания: 1)* «+» – наличие признака, «-» – отсутствие признака; 2)** «+/-» – структура матрицы не позволяет наложить шов, «+» – возможность наложить шов, «++» – матрица достаточно прочная даже для грубых швов

Таблица 9 также, как и таблица 8, наглядно демонстрирует, что наиболее подходящим для эксперимента является скаффолд из поли-L,L-лактида, укрепленный фиброином шелка и покрытый с внешней стороны мелкопористой водонепроницаемой полилактидной пленкой.

Таким образом, можно заключить:

1. Матрица, состоящая только из поли-L,L-лактида, не является достаточно механически прочной для надежной фиксации к стенке МП.
2. Добавление к поли-L,L-лактиду целлюлозы существенно снижает сроки резорбции, делая матрицу непригодной для опыта.
3. Укрепление полилактидной матрицы фиброином шелка делает конструкцию подходящей для замещения дефекта стенки МП по своим механическим характеристикам, однако существенным недостатком является проницаемость для жидкости.
4. При трансплантации ПЛ+Ф скаффолда, содержащего МСК, через 3 недели происходит уменьшение его размеров почти в 2 раза.
5. Скорость резорбции бесклеточной ПЛ+Ф конструкции существенно ниже таковой у содержащего МСК скаффолда за счет инкапсуляции и перипроцесса.
6. Оптимальным для замещения дефекта МП по своим свойствам является скаффолд из поли-L,L-лактида с фиброином шелка, укрепленный с внешней стороны непроницаемой полилактидной пленкой.

ГЛАВА 4. ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОСТОЯЩЕЙ ИЗ КОМПОЗИТНОЙ МАТРИЦЫ И АЛЛОГЕННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

4.1 Оценка ёмкости мочевого пузыря кроликов до операции и к концу периода наблюдения

При анализе результатов патоморфологического исследования видно, что во всех случаях замещения дефекта, кроме случаев трансплантации МСК-содержащих лоскутов, присутствует разной степени выраженности снижение емкости мочевого пузыря, наиболее выраженное при использовании ФБ-содержащего скаффолда (8% от исходной) (рисунок 17).

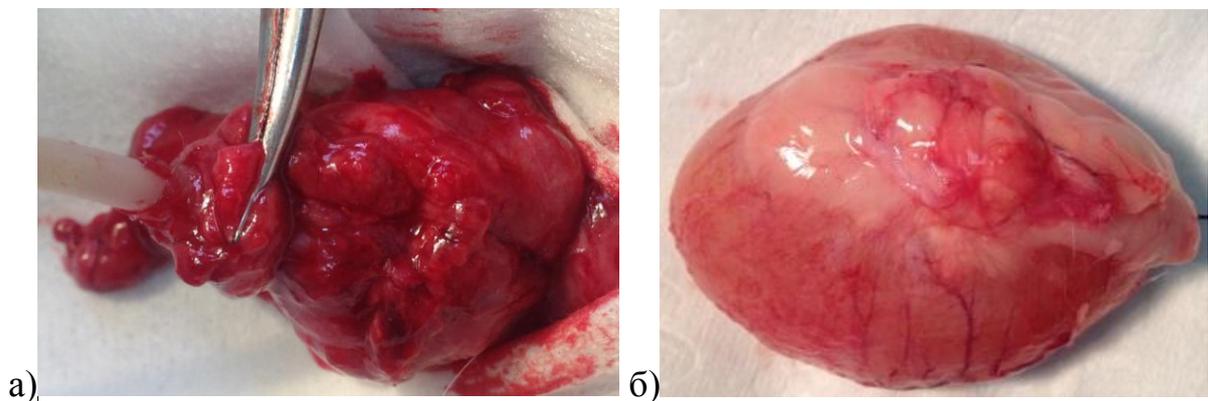
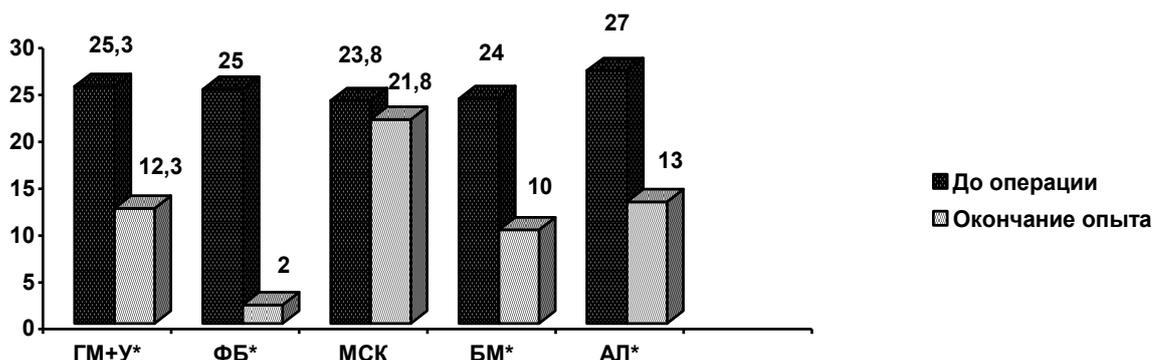


Рисунок 17 – Внешний вид заполненного мочевого пузыря в конце периода наблюдения: а – группа 2 (фибробласты), б – группа 3 (МСК)

На представленных фотографиях хорошо видно снижение емкости МП в случае трансплантации ФБ-содержащего скаффолда, в то время как емкость МП животного из 5 группы близка к нормальной.

Количественное сравнение исходных емкостей МП кроликов и емкостей МП животных в момент выведения из эксперимента представлено на рисунке 18 и в таблице 10.



Примечание: * – разница параметров в начале и конце опыта достоверна, $p < 0,05$.

Рисунок 18 – Емкость мочевого пузыря кроликов до вмешательства и на момент выведения из эксперимента (мл)

Таблица 10 – Сравнительная характеристика емкости мочевого пузыря кроликов до операции и к концу периода наблюдения

Группа	Емкость до операции Мл	Емкость в конце периода наблюдения	
		мл	% от исходного
1 (n=3)	25,33±1,23	12,33±0,72	48,68
2 (n=3)	25,00±0,00	2,00±0,00	8,0
3 (n=6)	23,83±0,71	21,83±0,94	91,61
4 (n=3)	24,00±1,37	10,00±0,94	41,67
5 (n=3)	27,00±0,67	13,00±0,94	48,14

Диаграмма и таблица наглядно показывают, что в группах 1,2,4,5 присутствует различной степени выраженности снижение емкости мочевого пузыря (8-48,68% от дооперационной, $p < 0,05$). У животных же из группы 3 емкость мочевого пузыря практически не изменилась (91,61% от дооперационной).

4.2 Оценка выраженности воспалительной реакции

Вне зоны имплантации наиболее выраженная реакция наблюдается во всех случаях трансплантации аллогенных фибробластов, и в одном случае имплантации БМ (может быть связано с длительным – 72 суток – нахождением конкремента-матрицы в просвете пузыря). Оценка состояния стенок МП вне зоны имплантации представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Состояние стенок мочевого пузыря вне зоны имплантации

Группа	Норма	Признаки воспаления	
		Незначительный отек	Выраженное утолщение стенки
1 (n=3)	3 (100,0%)	-	-
2 (n=3)	-	-	3 (100,0%)
3 (n=6)	6 (100,0%)	-	-
4 (n=3)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)
5 (n=3)	3 (100,0%)	-	-

Из таблицы следует, что изменения стенок МП вне зоны имплантации зафиксировано в группе 2 и группе 4, причем в группе 2 изменения оказались выраженными и отмечены у всех животных.

Выраженный перипроцесс (множественные грубые спайки с петлями кишечника, семенниками, брюшиной) также встречался в группе, получившей скаффолд с фибробластами и в 1 случае трансплантации пустой матрицы. Надо отметить, что у животных, получивших МСК-содержащий скаффолд, выраженного перипроцесса не наблюдалось. Сводные данные по выраженности перипроцесса приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Выраженность спаечного процесса вокруг мочевого пузыря на момент выведения из эксперимента

Группа	Перипроцесс		
	Отсутствует	Единичные спайки	Множественные грубые спайки
1 (n=3)	-	3 (100,0%)	-
2 (n=3)	-	-	3 (100,0%)
3 (n=6)	3 (50,0%)	3 (50,0%)	-
4 (n=3)	-	2 (66,7%)	1 (33,3%)
5 (n=3)	-	3 (100,0%)	-

Из таблицы видно, что единичные спайки с петлями кишечника и брюшиной присутствуют в каждой группе, однако выраженный воспалительный процесс зафиксирован только в группе 2 и в одном случае трансплантации бесклеточной матрицы. Полностью отсутствовали патологические изменения вокруг мочевого пузыря только у половины животных из 3 группы.

4.3 Оценка места имплантации. Макроскопическое исследование

После выведения животных из эксперимента произведена визуальная оценка места имплантации. На рисунке 19 представлена внутренняя поверхность мочевого пузыря кролика из 1 группы (ГМК+У) на 61 сутки периода наблюдения. В месте имплантации определяется втянутый рубец с выраженным отеком слизистой и папиллярными разрастаниями.



Рисунок 19 – Внешний вид места имплантации при некропсии (группа 1)

В околопузырной жировой клетчатке определяется округлое образование диаметром 1 см, эластической консистенции, на разрезе представленное неоднородной бесструктурной массой с явлениями инкапсуляции и частичной организацией, интимно связанное со стенкой МП в месте имплантации (рисунок 20).



Рисунок 20 – Макроскопическое исследование места имплантации (группа 1): а – мочевого пузыря в разрезе; б – округлое образование в жировой клетчатке; в – образование в разрезе

Также отмечается умеренное (около 50% от исходной) снижение емкости МП и единичные спайки с петлями кишечника около места имплантации.

Мочевой пузырь у трех кроликов из группы 2 резко уменьшен в размерах (емкость около 2 мл). У двух животных выявлено расширение полостной системы почек. Отсутствие гидронефроза в третьем случае можно объяснить оставшимся цистостомическим дренажом, прочно фиксированным в МП. внешний вид мочевого пузыря животного из группы 2 представлен на рисунке 21.

Стенка мочевого пузыря резко утолщена. Место имплантации рубцово стянуто. Фрагменты матрицы фиксированы в месте имплантации, смещены в просвет мочевого пузыря. Также определяется выраженный перипроцесс с множественными грубыми спайками с кишечником, семенниками, брюшиной.



Рисунок 21 – Внешний вид места имплантации при некропсии (группа 2)

В группе 4 у одного животного емкость МП снижена умеренно (60,0% от исходной), у 2-х кроликов зафиксировано значительное снижение емкости МП до 10 мл (40,0%) и 8 мл (30,0%) соответственно, стенки его во всех случаях утолщены, гиперемированы (рисунок 22).



Рисунок 22 – Внешний вид места имплантации при некропсии (группа 4)

Матрица вытеснена в просвет МП, в одном случае – с образованием крупного конкремента. В месте имплантации – рубцовое стяжение и отечность слизистой. Спаечный процесс вокруг мочевого пузыря выражен незначительно в 2 случаях из 3-х, у одного животного зафиксированы выраженные спайки с брюшиной, семенниками, жировой клетчаткой.

У животных 5 группы, получивших аллогенный лоскут мочепузырной стенки, как и в группе 1, емкость мочевого пузыря уменьшена практически в 2 раза, слизистая МП стянута в месте имплантации с образованием папилломатозных и кистозных разрастаний и формированием инфильтрата в жировой клетчатке над этой зоной (рисунок 23).



Рисунок 23 – Внешний вид места имплантации при некропсии (группа 5)

Вне зоны имплантации выраженных изменений слизистой не наблюдается. На рисунке видна нормальная слизистая вне зоны имплантации. Спаечный процесс в брюшной полости не выражен.

В 3 группе емкость МП близка к исходной в 3 (50,0%) из 6 случаев в остальных случаях снижение ее незначительное, максимум 72% от исходной. Стенки вне зоны имплантации – визуально нормальные у всех животных. Также, во всех случаях (83,3%), кроме одного, произошла полная резорбция матрицы. В 3

(50,0%) случаях в месте имплантации определяется вновь сформировавшийся участок слизистой с признаками васкуляризации. Внешний вид внутренней поверхности мочевого пузыря с сформировавшимся участком новой слизистой представлен на рисунке 24.

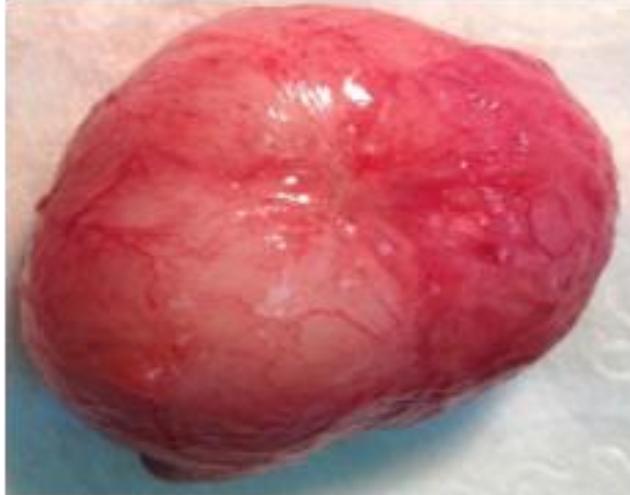


Рисунок 24 – Внешний вид места имплантации при некропии (группа 3)

Стенки вне зоны имплантации – визуально нормальные у всех животных. Также, во всех случаях (83,3%), кроме одного, произошла полная резорбция матрицы. В 3 (50,0%) случаях в месте имплантации определяется вновь сформировавшийся участок слизистой с признаками васкуляризации. Минимальные спайки вокруг мочевого пузыря зафиксированы в 3 (50,0%) случаях, у остальных животных перипроцесс выражен не был.

Сравнительные данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Сравнительная характеристика зоны имплантации

Группа	Отек	Папиллярные разрастания	Втянутый рубец	Наличие вновь сформированного участка слизистой
1 (n=3)	3 (100,0%)	3 (100,0%)	3 (100,0%)	0
2 (n=3)	3 (100,0%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)	0
3 (n=6)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)
4 (n=3)	3 (100,0%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)	0
5 (n=3)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	3 (100,0%)	0

Из таблицы видно, что при осмотре места имплантации в 100% случаев в группах 1,2,4,5 и лишь в 1 (16,7%) случае в группе 3 определяется втянутый рубец с отеком слизистой оболочки различной степени выраженности. У остальных 5 (83,3%) животных из 3 группы в месте имплантации определяется вновь сформировавшийся участок слизистой с признаками васкуляризации.

При некропсии мы обнаружили 2 варианта нахождения пересаженной матрицы: в просвете мочевого пузыря с формированием конкремента или в фиксированной к МП жировой клетчатке, где происходили процессы инкапсуляции, резорбции и некроза. В случаях отсутствия фрагментов матрицы в просвете МП и жировой ткани мы считали, что произошла полная резорбция. варианты состояния матриц на момент выведения кролика представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Состояние матрицы на момент выведения кролика

Группа	Лизис	Отторжение	
		В просвете МП	В жировой клетчатке
1 (ГМК+У)	-	-	2 (100,0%)
2(ФБ)	-	2 (100,0%)	-
3 (МСК)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	-
4 (БМ)	-	3 (100,0%)	-

Из таблицы видно, что из 6 случаев трансплантации МСК-содержащего скаффолда, в 5 (83,0%) произошел полный лизис матрицы, и лишь в 1 – вытеснение ее в просвет МП с формированием конкремента.

И, наоборот, в 100% случаев трансплантации прочих скаффолдов (ГМК+У, ФБ, бесклеточная матрица) произошло вытеснение матрицы или в жировую клетчатку с формированием инкапсулированного некроза, или в просвет МП с формированием конкремента.

4.4 Оценка места имплантации. Гистологическое исследование

Мочевые пузыри с визуально различимым вновь сформированным участком стенки МП в месте имплантации исследованы гистологически. Подтверждено формирование всех слоев стенки МП к концу второго месяца наблюдения: слизистой, подслизистой, мышечной и адвентициальной оболочек.

№8 (группа 3), 46 суток.

Стенка мочевого пузыря представлена слизистой, подслизистой, мышечной и адвентициальной оболочками. Адвентициальная оболочка на некотором протяжении замещена серозной оболочкой. На рисунке 25 представлено строение стенки МП кролика из группы 3.

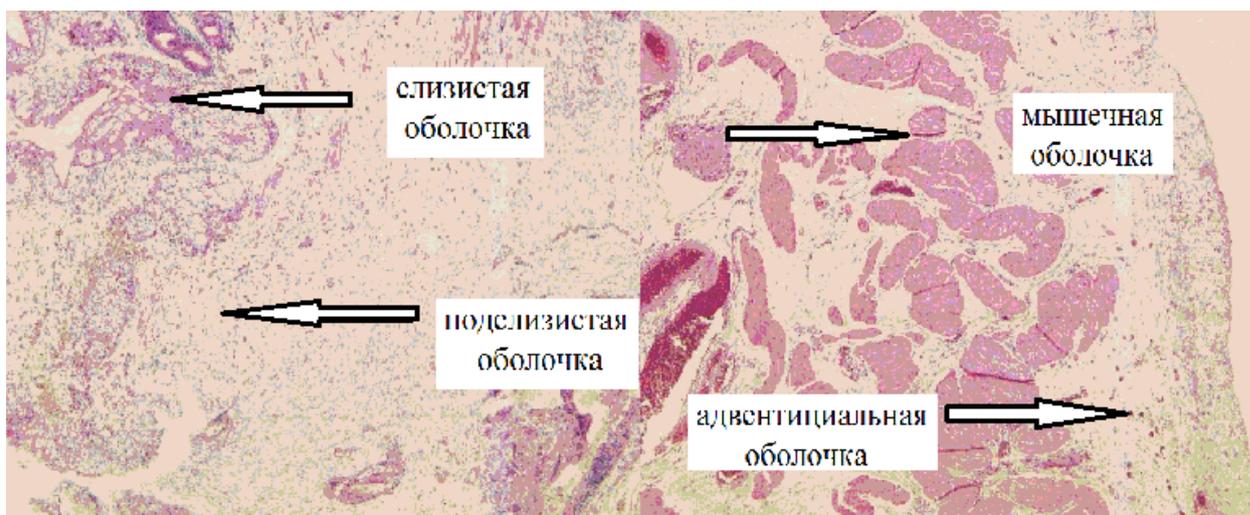


Рисунок 25 – Кролик №8, группа 3, 46 суток. Мочевой пузырь. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$

Слизистая оболочка эпителизирована на всем протяжении, представлена переходным эпителием и собственным слоем, в котором отмечается повышенное содержание коллагеновых волокон, окрашиваемых по Ван Гизон. Толщина переходного эпителия сравнима с контролем ($90,8 \pm 6,0$ мкм). Толщина собственного слоя слизистой увеличена, по сравнению с контролем – $31,7 \pm 3,1$ мкм ($p < 0,05$). Подслизистая оболочка с выраженным отеком, толщина ее также увеличена и составляет $1108,3 \pm 61,8$ мкм ($p < 0,05$). Количество сосудов

микроциркуляторного русла на 1 мм^2 также увеличено до $8,0 \pm 0,4 \text{ мкм}$ ($p < 0,05$). Достоверно увеличен диаметр их просвета, который составляет $95,8 \pm 14,1 \text{ мкм}$ ($p < 0,05$). В мышечной оболочке определяется выраженный межмышечный отек и формирование рыхлой волокнистой соединительной ткани между циркулярными и продольным слоями, толщина ее за счет отека возрастает и составляет $3416,7 \pm 156,5 \text{ мкм}$ ($p < 0,05$). Адвентициальная оболочка утолщена до $283,3 \pm 42,7 \text{ мкм}$ ($p < 0,05$), с повышенным содержанием соединительной ткани.

В месте парциальной резекции стенки мочевого пузыря не определялось мышечной оболочки. Вместо нее находилась соединительная ткань со слабо выраженной лимфоцитарной инфильтрацией и гранулемами инородных тел, содержащими гигантские многоядерные клетки (рис. 26). В них гистологически не определялось ни шовного материала, ни эпителиальных клеток. Окраска на железо дала отрицательный результат.

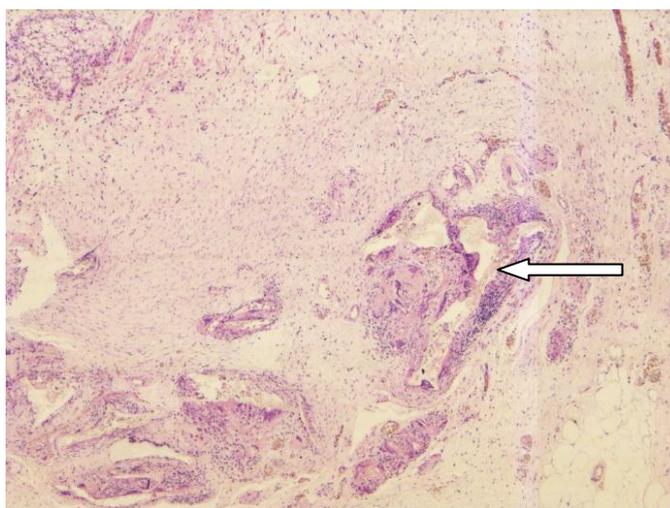


Рисунок 26 – Кролик №8, группа 3, 46 суток. Мочевой пузырь. Гранулемы в рубце, сформировавшемся в области мышечной оболочки (указаны стрелкой). Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 200$

Таким образом, обнаружено восстановление слизистой, подслизистой и адвентициальной оболочек. Целостность мышечной оболочки восстанавливалась за счет формирования соединительнотканного рубца, не содержащего гладкомышечных волокон. также обнаружено увеличение васкуляризации подслизистого слоя, формирование соединительной ткани и отека, которые

вызывали увеличение толщины слоев стенки мочевого пузыря, а также незначительной воспалительной инфильтрации и наличие гранул инородных тел, связанных, наиболее вероятно, с рассасыванием скаффолда.

№11(группа 3), 63 суток.

Стенка мочевого пузыря представлена слизистой, подслизистой, мышечной и адвентициальной оболочками. Адвентициальная оболочка на некотором протяжении замещена серозной оболочкой. Строение стенки МП кролика представлено на рисунке 27.

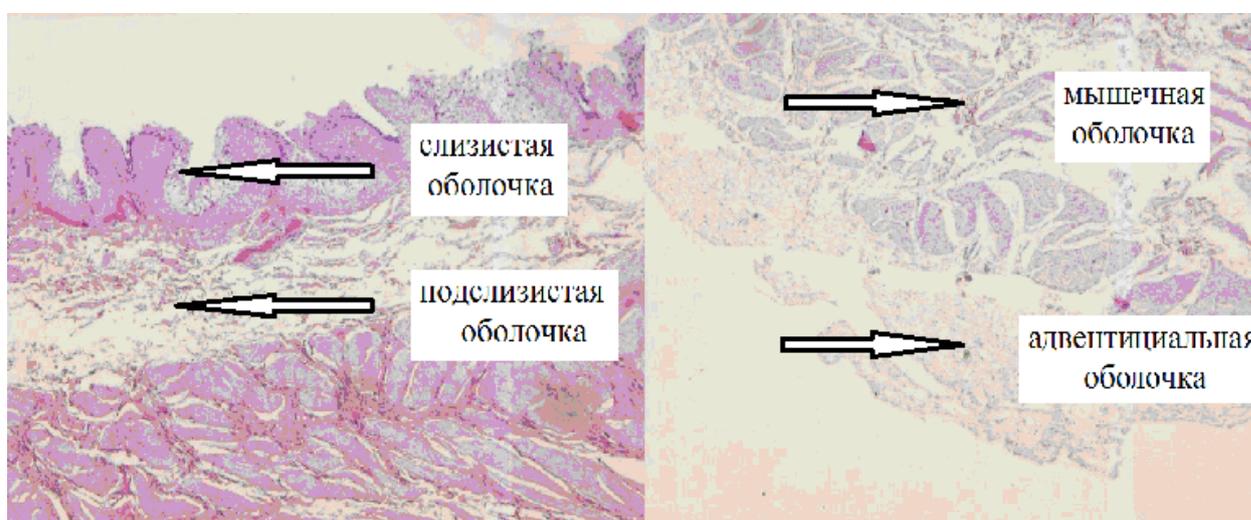


Рисунок 27 – Кролик №11, группа 3, 63 сутки. Мочевой пузырь. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$

Слизистая оболочка на всем протяжении представлена переходным эпителием и собственным слоем с повышенным содержанием коллагеновых волокон. Толщина переходного эпителия достоверно не изменялась и составляла $88,3 \pm 5,3$ мкм. Достоверно по сравнению с интактными кроликами увеличивалась толщина собственного слоя слизистой – $62,5 \pm 5,1$ мкм (таблица 7). Подслизистая оболочка умеренно отечна, толщина ее по сравнению с контролем достоверно увеличена и составляет $416,7 \pm 11,8$ мкм. Количество сосудов микроциркуляторного русла на 1 мм^2 сравнимо с контролем – $4,0 \pm 0,0$ мкм. Сохраняется достоверно увеличенный диаметр просвета сосудов $85,0 \pm 3,5$ мкм (табл. 7). Отек мышечной оболочки менее выражен, чем в случае №8, в ней

нарастает содержание коллагеновых волокон, толщина ее достоверно увеличена и составляет $1583,3 \pm 31,3$ мкм. Толщина адвентициальной оболочки с повышенным содержанием соединительной ткани составляет $83,8 \pm 8,1$ мкм. Сравнительные данные представлены ниже в таблице 19.

Воспаления в стенке мочевого пузыря не обнаружено. Окраска на железо отрицательная.

Таким образом, выявлено восстановление слизистой, подслизистой, мышечной и адвентициальной оболочек.

В различные сроки инкубации у кроликов в стенке мочевого пузыря при окраске на железо и его соединения при световой микроскопии не было обнаружено наличия меченных наночастиц, что, возможно, связано с их размерами.

Таким образом, можно заключить:

1. Положительные результаты трансплантации многокомпонентного композита, содержащего аллогенные клетки, получены только в случаях заселения скаффолда МСК.
2. При пересадке МСК-содержащего скаффолда выраженность воспалительной реакции существенно ниже, чем при трансплантации конструкций, содержащих другие клетки.
3. При трансплантации МСК-содержащего скаффолда происходит полный лизис матрицы, чего не наблюдается в остальных группах.
4. Мезенхимальные стволовые клетки могут использоваться для аллогенной трансплантации.

ГЛАВА 5. ДИНАМИКА КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ОТВЕТ НА ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ КРОЛИКА РАЗРАБОТАННОЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

Все кролики перенесли операцию без осложнений. Раны зажили первичным натяжением. Удаление уретральных катетеров на 4-14 сутки.

5.1 Течение периода наблюдения

После летального исхода у №12 на 2-й недели наблюдения отмечена потеря массы тела у кроликов 11 и 13. Взяты анализы крови у всех, вовлеченных в эксперимент животных, находящихся в данном помещении на тот момент (№9,10,11,13 - там же находился и №12 после операции). В анализах выявлены в разной степени воспалительные изменения в виде лейкоцитоза, палочкоядерного сдвига, увеличения С-реактивного белка. Животным назначена терапия: оксамп внутримышечно, 7 дней. На фоне лечения показатели крови животных №9 и 10 нормализовались, сохранялся незначительный лейкоцитоз у животного №11 без повышения СОЭ, п/я сдвига и увеличения уровня С-реактивного белка.

Сохранялся выраженный лейкоцитоз у животного №13, которое на 3 неделе послеоперационного периода начало худеть, в анализах крови – лейкоцитоз до 16 с п/я сдвигом. На фоне антибактериальной терапии состояние животного улучшилось, масса тела оставалась стабильной. Через 2,5 месяца снова зафиксирована потеря массы, после чего кролик умер. При вскрытии выявлена гнойная пневмония.

Животное №17 через 1.5 месяца наблюдения получило травму нижней конечности, что послужило причиной выраженного инфекционного процесса.

У животного №16 не удалось удалить мочевой дренаж – плотно зафиксирован в мочевом пузыре отложениями солей.

У остальных животных период наблюдения протекал без особенностей.

5.2 Динамика массы тела

У всех животных зафиксирован адекватный прирост массы тела, кроме случая с пневмонией. Отмечается небольшое снижение показателей массы тела после операции у всех животных с нормализацией параметров к 2-3 неделе. Схематически прирост массы тела животных представлен на рисунке 28.

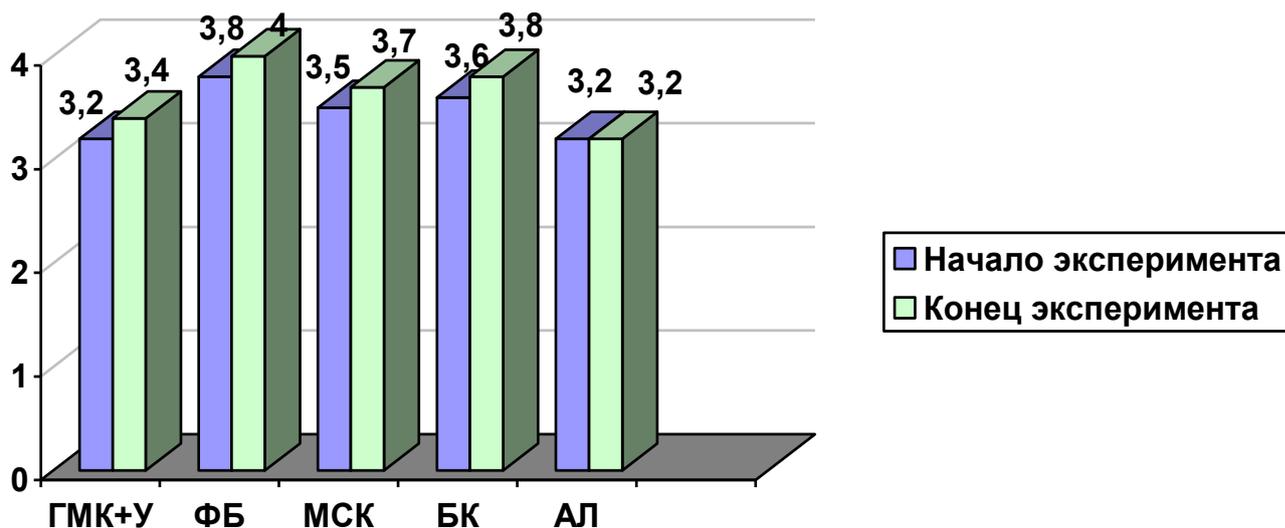


Рисунок 28 – Прирост массы тела животных (кг)

На диаграмме отчетливо видно наличие прироста массы тела во всех группах.

5.3 Лабораторные данные

При изучении показателей клинического анализа крови животных перед эвтаназией, отмечен умеренный лейкоцитоз в группе 1 ($15,6 \pm 0,49 \times 10^3/\text{мкл}$) и группе 2 ($18,5 \pm 6,29 \times 10^3/\text{мкл}$). Также в группе 2 отмечено увеличение СОЭ ($9,08 \pm 1,36$ мм/ч). Других, клинически значимых отклонений во всех группах не зафиксировано. Показатели биохимического анализа крови мало различались между группами и были в пределах референтных значений, кроме повышения среднего значения уровня С-реактивного белка в группе 2 ($20,15 \pm 10,08$ мг/л) и 4 ($16,1 \pm 7,67$ мг/л).

Средние показатели крови животных каждой группы представлены в таблицах 15 и 16.

Таблица 15 – Клинический анализ крови перед эвтаназией

Показатель (реф. зн.)	Группа 1 (M±m)	Группа 2 (M±m)	Группа 3 (M±m)	Группа 4 (M±m)	Группа 5 (M±m)
Эритроциты (5,2-7,8) $\times 10^6$ /мкл	6,71±0,24	4,80±0,63	6,44±0,04	5,78±0,15	6,24±0,04
Гемоглобин (100,5-160) г/л	145,33±6,84	101,67±23,36	134,17±4,29	132,00±3,16	140,33±0,27
Гематокрит (35-48) %	42,50±1,98	30,23±4,46	39,75±0,81	37,83±1,12	40,33±0,25
Лейкоциты (2,6-9,9) $\times 10^3$ /мкл	15,63±0,33	18,27±4,20	10,97±1,24	8,63±0,99	9,03±0,88
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,33±0,22	1,00±0,67	0,00	0,33±0,22	0,00
Тромбоциты (130-900) $\times 10^3$ /мкл	526,67±4,25	795,00±20,38	473,83±51,50	467,00±62,85	450,33±22,86
СОЭ, мм/ч	2,00±0,00	6,00±0,75	2,00±0,00	2,67±0,72	2,33±0,27

Таким образом, видно, что показатели клинического анализа крови, кроме лейкоцитов, перед эвтаназией во всех группах были в пределах нормальных значений. В количестве лейкоцитов наиболее значимые изменения зафиксированы в группе, получившей скаффолд с ФБ, вследствие выраженной воспалительной реакции в месте имплантации. Также повышено среднее значение лейкоцитов в группе 1 ($15,6 \pm 0,49 \times 10^3$ /мкл). Практически не изменились показатели в группе 5 (быстрое отторжение аллогенного лоскута и формирование рубца) и группе 3.

Таблица 16 – Биохимический анализ крови перед эвтаназией

Показатель (реф. зн.)	Группа 1 (M±m)	Группа 2 (M±m)	Группа 3 (M±m)	Группа 4 (M±m)	Группа 5 (M±m)
Общий белок (54-75 г/л)	66,00±0,47	57,00±0,67	60,67±1,34	63,67±2,44	65,00±0,94
АЛТ (25-60 МЕ/л)	44,00±0,94	36,33±1,44	42,17±8,15	46,00±4,11	44,00±2,16
АСТ (5-31 МЕ/л)	32,00±3,30	55,00±2,00	42,67±8,06	36,00±5,47	43,67±7,31
Общий билирубин (3,4-8,5 мкмоль/л)	11,50±0,21	12,45±0,95	10,77±0,55	8,97±1,77	12,27±0,47
Глю. (6,1-15,9 ммоль/л)	7,05±0,11	9,28±0,41	7,67±0,12	8,40±1,27	7,46±0,62
Креат. (44,2-141,4 мкмоль/л)	103,67±4,28	108,00±7,26	95,33±6,06	107,00±15,33	87,67±5,46
С-реактивный белок (мг/л)	1,60±1,07	15,1±9,05	4,17±2,58	16,03±0,00	1,43±0,62

Из отклонений от нормальных значений на момент выведения из эксперимента зафиксировано повышение средних значений АСТ во всех группах, наиболее выраженное в группе 2, и повышение С-реактивного белка в группах 2 и 4. Остальные показатели мало различались между группами и были в пределах нормальных значений.

В таблице 17 представлен сравнительный анализ изменений в анализах крови животных перед эвтаназией, характерных для воспалительной реакции.

Таблица 17 – Сравнительный анализ изменений показателей крови до операции и в конце периода наблюдения

Гр.	Лейкоциты ($\times 10^3$ /мкл)		СОЭ (мм/ч)		С-реактивный белок (мг/л)	
	До	после	до	после	До	после
1	4,80±0,45	15,63±0,33*	1,67±0,54	2,00±0,00	0,00	1,60±1,07
2	8,80±0,42	18,27±4,20*	2,00±0,00	6,00±0,75*	3,73±0,00	15,1±9,05*
3	10,70±0,35	10,97±1,24	2,83±0,39	2,00±0,00	4,43±0,89	4,17±2,58
4	4,00±0,29	8,63±0,99	2,00±0,00	2,67±0,72	1,67±1,11	16,03±0,00
5	10,20±0,94	9,03±0,88	2,00±0,00	2,33±0,27	1,53±1,02	1,43±0,62

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с показателями в других группах, $p < 0,05$

Таблица наглядно демонстрирует, что, если до операции указанные показатели были в пределах нормальных значений, то в конце периода наблюдения отмечается повышение уровня показателей, характерных для воспалительного процесса. Причем наиболее значимые изменения зафиксированы в группе, получившей скаффолд с ФБ, вследствие выраженной воспалительной реакции в месте имплантации. Практически не изменились указанные показатели в группе 5 (вследствие быстрого отторжения аллогенного лоскута и формированием рубца) и группе 3.

В некоторых случаях получить достаточное для анализа количество мочи не представлялось возможным из-за опорожненного МП (№2,5,6,7,11,13,15,19) или же из-за выраженного снижения его емкости (№16,17). Среди остальных животных не выявлено значимых отклонений от нормальных значений. Показатели общего анализа мочи при выведении из эксперимента представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Общий анализ мочи при некропии

Группа	Плотность (M±m)	Глюкоза (M±m)	Эпителий (M±m)	Лей (M±m)	Эр (M±m)	Соли (%)
Группа 1*	1005	0	1	0	35-45-60	ураты
Группа 2*	-	-	-	-	-	-
Группа 3*	1015	0	ед	ед	ед	фосфаты (100%)
Группа 4*	1017,5±1,77	0	2,0±0,71	3,00	14,5±8,84	фосфаты (100%)
Группа 5*	1015	0	1	0-1-3	3-5-7	фосфаты (100%)

Примечание: * – мочу для исследования удалось получить не во всех случаях

На этапе выведения животных из эксперимента также обращает на себя внимание присутствие солей, в основном – фосфатов, во всех полученных анализах. Также отмечается эритроцитурия в случаях №3 и №9 (связана с наличием в просвете пузыря конкремента-матрицы). Выраженной лейкоцитурии или прочих воспалительных появлений в общих анализах мочи зафиксировано не было. Примесь слизи, неизбежно сопровождающая кишечную реконструкцию МП, также отсутствовала во всех случаях.

5.4 Данные патоморфологического исследования

Наиболее выраженные реакция отмечалась вокруг места резекции. Перипроцесс вокруг МП различной степени выраженности присутствует в 86.7% случаев. Сводные данные представлены ранее в таблице 4.

Со стороны других внутренних органов и лимфатических узлов выраженных изменений не выявлено у всех животных, кроме №13 и №17.

№13 (группа 3) умер на 74 сут в день предполагаемой эвтаназии от пневмонии. До этого в течение 2 недель получал антибактериальную терапию. Анализы крови – воспалительные. При некропсии легкие заполнены гнойной мокротой. Другой патологии не выявлено, воспалительный процесс в месте операции отсутствовал.

№17 (группа 2) У кролика 17 через 2 месяца после операции зафиксирована травма левой нижней конечности (рисунок 29).



Рисунок 29 – Внешний вид нижней конечности животного 17

При некропсии отмечается увеличение внутрибрюшных лимфатических узлов (может быть связано с воспалительным процессом в конечности). Выраженный рубцовый процесс вокруг мочевого пузыря с множественными грубыми спайками с кишечником, семенниками, брюшиной. Резкое снижение емкости мочевого пузыря до 2 мл с формированием гидроуретеронефроза.

Таким образом, можно заключить:

1. Трансплантация многокомпонентных композитов, содержащих аллогенные клетки не вызвала выраженных клинических и морфологических изменений макроорганизма ни в одной из групп.
2. Выраженные изменения в анализах крови зафиксированы только у животных с сопутствующим инфекционным процессом, не связанным с перенесенным вмешательством.
3. Выраженной лейкоцитурии или прочих воспалительных появлений в ОАМ зафиксировано не было.
4. Во всех случаях отсутствовала примесь слизи.

ГЛАВА 6. ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ IN SITU ВВЕДЕННЫХ В ОБЛАСТЬ ДЕФЕКТА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ АЛЛОГЕННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В СОСТАВЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЧЕРЕЗ 2.5 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ

О жизнеспособности пересаженного аллогенного многокомпонентного композита косвенно можно судить по сохранению клеточных меток в месте имплантации в течение длительного времени после операции, а также по наличию морфологического подтверждения процессов регенерации в месте имплантации с формированием идентичной нормальной гистологической структуры стенки МП.

6.1 Данные магнитно-резонансной томографии

Через 2,5 месяца после операции в группе 4 (бесклеточная матрица) в режиме t2 в поперечной проекции визуализируется заполненный мочевой пузырь с уменьшенной емкостью (рисунок 30). В просвете МП определяется конкремент-матрица.



Рисунок 30 – Кролик №9 (группа 4), 69 сутки наблюдения, режим t2_spc_rst_tra_iso (матрица указана стрелкой)

Также МРТ выполнено 2-м животным, получившим скаффолд с ФБ через 7 дней и через 1 месяц после трансплантации. Данные исследования представлены на рисунках 31 и 32.

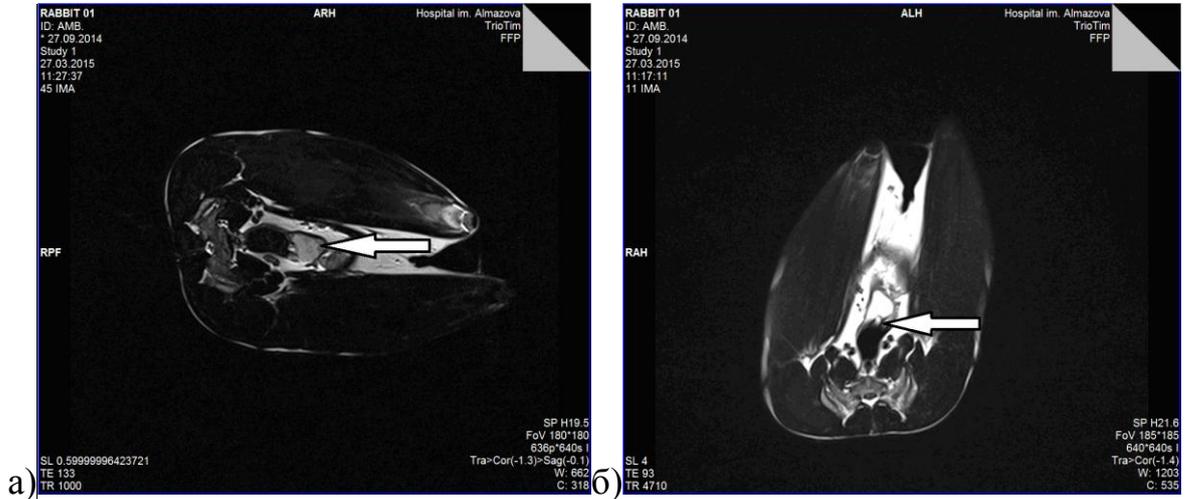


Рисунок 31 – Кролик №16 (группа 2), 7 дней наблюдения: а – режим $t2_spc_rst_tra_iso$ (матрица указана стрелкой), б – режим $t2_tse_tra_320_p2$ (катетер указан стрелкой)

В режиме $t2$ в поперечной проекции на 7 день наблюдения определяется резкое снижение емкости МП. В просвете мочевого пузыря визуализируются вытесненная матрица и цистостомический катетер.



Рисунок 32– Кролик №16 (группа 2), 1 месяц наблюдения, режим $t2_spc_rst_tra$. Матрица указана стрелкой слева, катетер указан стрелкой справа.

К концу 1 месяца наблюдения также сохраняется небольшая емкость МП. В просвете его визуализируется катетер. Матрица определяется в месте имплантации, смещенная в просвет МП.

Через 2,5 месяца после операции у животного из 3 группы (аллогенные МСК) в режиме t_2 в сагиттальной и поперечной проекциях визуализируется заполненный МП нормальной емкости. В месте имплантации хорошо виден наводящий артефакт от введенных в клетки железосодержащих меток. Снимки представлены на рисунке 33.

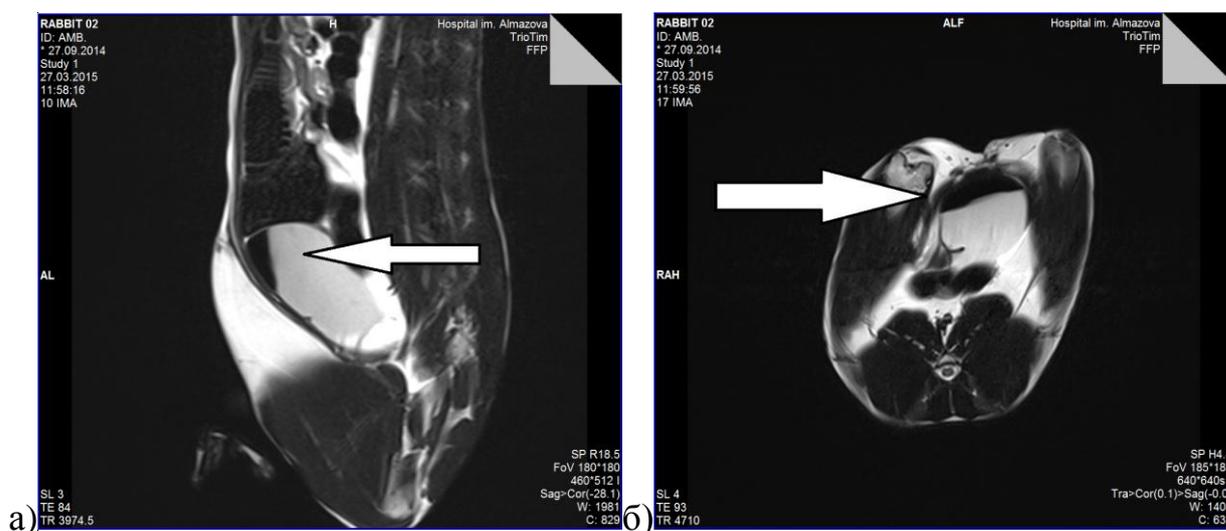


Рисунок 33 – Кролик №11 (группа 3): а) – режим $t_2_tse_sag_p2$, б) – $t_2_tse_tra_320_p2$. Наводящий артефакт указан стрелкой

Таким образом видно, что из всех представленных исследований визуально нормальный МП сохранился только в случае с использованием МСК-содержащей конструкции. Косвенно о жизнеспособности пересаженного композита может говорить наличие железосодержащих меток в месте имплантации.

6.2 Данные электромиографического исследования.

При выполнении ЭМГ исследования животному из группы 3 (МСК) через 2,5 месяца зафиксирована функциональная активность в месте имплантации (рисунок 34).

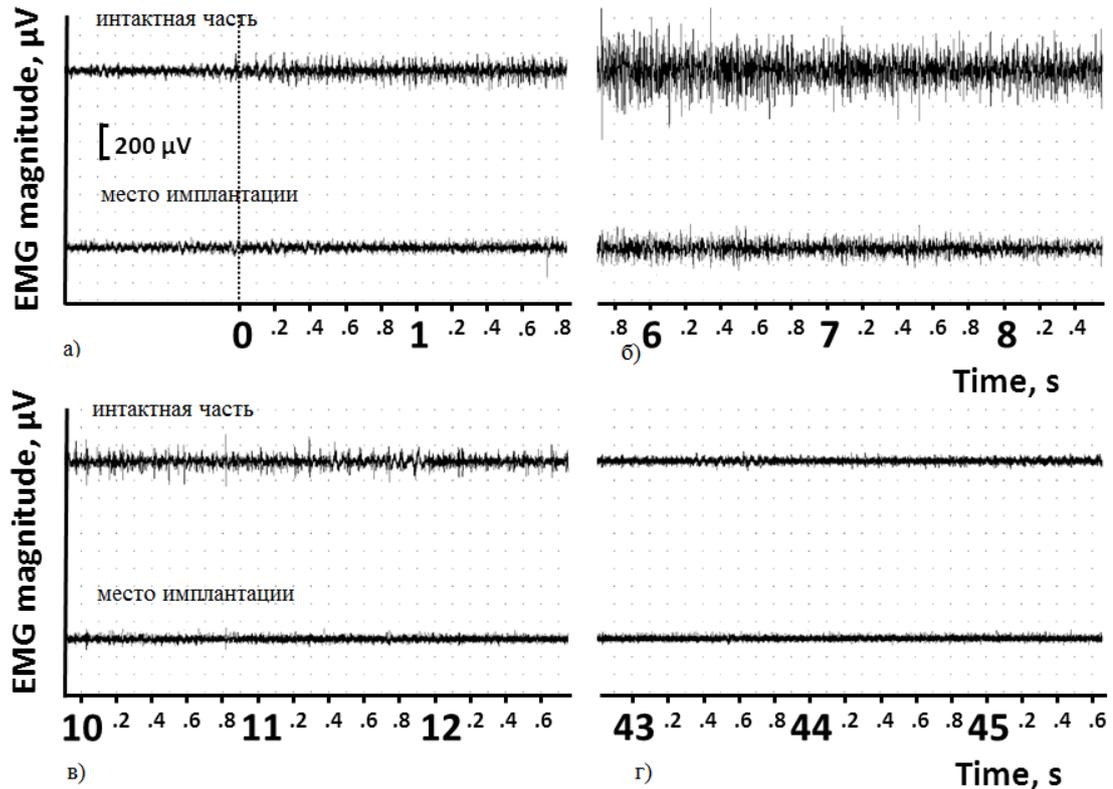


Рисунок 34 – Исследование электромиографической активности через 2.5 месяца после операции (группа 3): а – до наполнения мочевого пузыря; б – при индуцированном мочеиспускании; в – сразу после мочеиспускания; г – через 30 секунд после мочеиспускания

При наполнении МП физиологическим раствором емкость пузыря оказалась сравнима с дооперационной (20-24 мл). ЭМГ-мониторинг стенки МП при наполнении выявил электрическую активность во время индуцированного мочеиспускания. В процессе наполнения через 7-10 секунд зафиксирована низкоамплитудная ЭМГ активность в интактной части стенки МП, а также в месте обнаружения вновь сформированной слизистой. По сравнению с интактной частью стенки МП, выявленная ЭМГ активность в зоне имплантации существенно

ниже по своей длительности и магнитуде. Наличие мышечной активности в реконструированном участке стенки МП косвенно может подтверждать функциональную активность пересаженной тканеинженерной конструкции.

6.3 Данные гистологического исследования

Гистологически подтверждено формирование всех слоев стенки МП к концу второго месяца наблюдения у животного 3 группы: слизистой, подслизистой, мышечной и адвентициальной оболочек. Подробно результаты гистологического исследования описаны в пункте 2.1.4. Сравнительные данные морфометрического анализа представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Морфометрическая характеристика стенки мочевого пузыря у кроликов после парциальной резекции и подшивания скаффолда, содержащего МСК

Показатель/Группа (M±m)	Контроль	Группа 3 (МСК)	
	№20	№8 (46 сут)	№11 (63 сут)
Толщина эпителия, мкм	91,7±5,9	90,8±6,0	88,3±5,3
Толщина собственного слоя слизистой оболочки, мкм	22,5±1,1	31,7±3,1*	62,5±5,1*
Толщина подслизистой оболочки, мкм	325,0±44,4	1108,3±61,8*	416,7±11,8*
Количество сосудов в подслизистой оболочке на 1 кв.мм	3,0±0,0	8,0±0,4*	4,0±0,0
Диаметр сосудов подслизистой оболочки, мкм	52,5±9,8	95,8±14,1*	85,0±3,5*
Толщина мышечной оболочки, мкм	1700,0±108,4	3416,7±156,5*	1583,3±31,3
Толщина адвентициальной оболочки, мкм	27,5±5,0	283,3±42,7*	83,8±8,1*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактным кроликом

Из таблицы следует, что при парциальной резекции стенки МП кролика и внесения скаффолда с МСК наблюдалась регенерация слизистой оболочки за счет эпителизации и формирования соединительной ткани, подслизистой оболочки за счет увеличения васкуляризации и формирования соединительной ткани, адвентициальной оболочки за счет формирования соединительной ткани, частичное восстановление мышечной оболочки с незначительной лимфоцитарной инфильтрацией и продуктивным гранулематозным воспалением.

6.4 Данные конфокальной микроскопии криосрезов

При конфокальной микроскопии криосрезов МП кроликов из группы 3 (МСК) в месте имплантации определяются меченые клетки, принимающие участие в формировании структуры, сходной с уротелием. На рисунке 35 представлены данные конфокальной микроскопии.

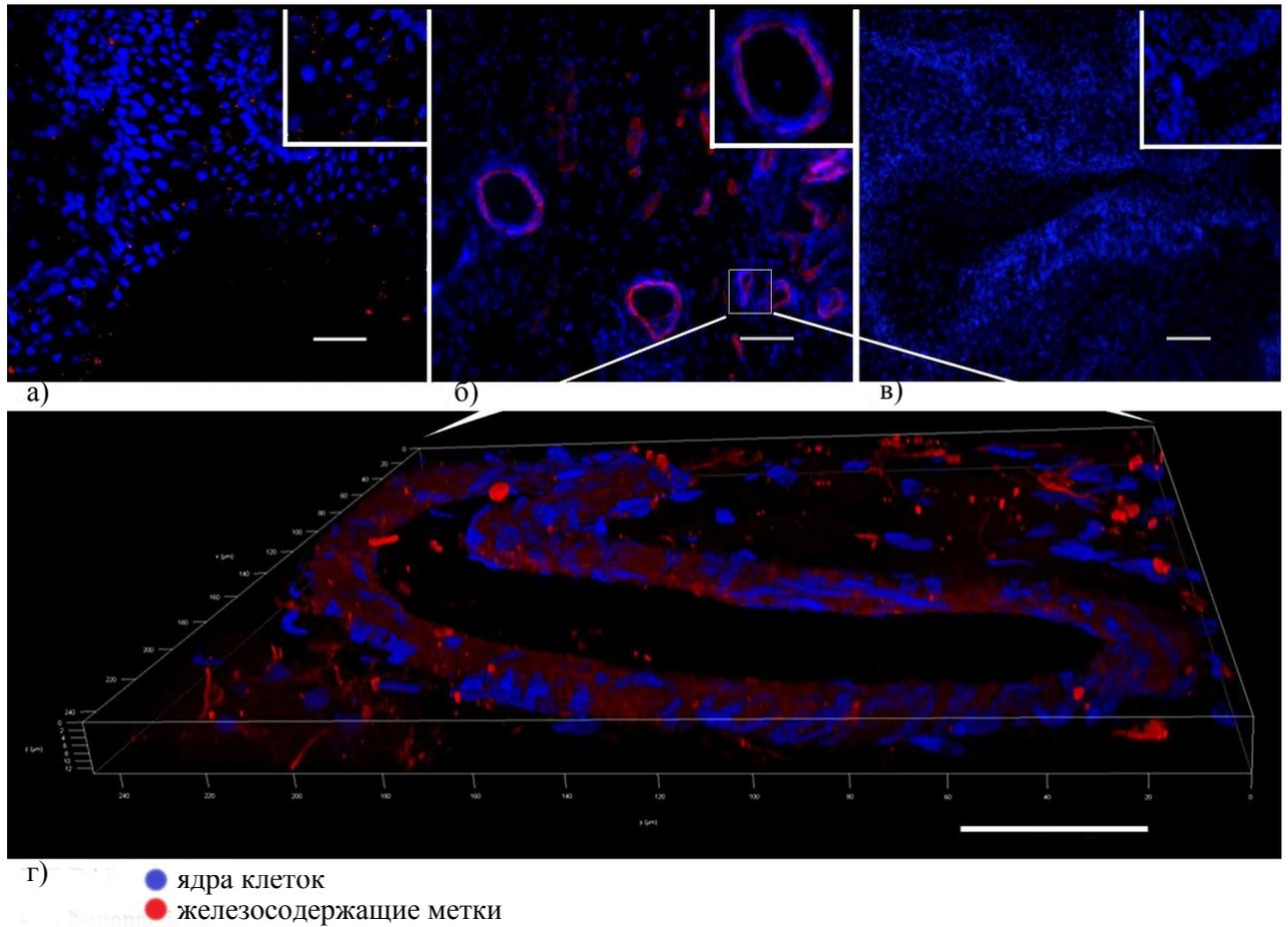


Рисунок 35 – Конфокальная микроскопия криосреза стенки мочевого пузыря в месте имплантации (группа 3): а – мышечная оболочка, масштаб 50 μm, б – железосодержащие метки во всех слоях, масштаб 100 μm, в – контроль, интактная стенка мочевого пузыря, масштаб 100 μm, г – увеличенное изображение немеченых клеток, и клеток, содержащих метки, ув. ×20

На рисунке хорошо различим многослойный пласт клеток в месте имплантации – ядра светятся синим цветом. В клетках определяются красные метки – суперпарамагнитные наночастицы на основе магнетита.

Таким образом, можно заключить:

1. Наводящий артефакт от суперпарамагнитных железосодержащих меток, введенных в МСК, определяется в месте имплантации при МРТ через 2,5 месяца после операции, что косвенным образом указывает на присутствие трансплантированных клеток.
2. Отсутствие в микропрепаратах, окрашенных на железо и его соединения при световой микроскопии меченных наночастиц, возможно, связано с их размерами.
3. У кроликов при парциальной резекции стенки мочевого пузыря и внесения скаффолда с МСК наблюдалась регенерация слизистой оболочки за счет эпителизации и формирования соединительной ткани.
4. У кроликов при парциальной резекции стенки мочевого пузыря и внесения скаффолда с МСК наблюдалось восстановление подслизистой оболочки за счет увеличения васкуляризации и формирования соединительной ткани.
5. У кроликов при парциальной резекции стенки мочевого пузыря и внесения скаффолда с МСК наблюдалось восстановление адвентициальной оболочки за счет формирования соединительной ткани.
6. У кроликов при парциальной резекции стенки мочевого пузыря и внесения скаффолда с МСК через 3 месяца наблюдения определяется снижение отека мышечной оболочки, нарастание в ней содержания коллагеновых волокон, увеличение ее толщины, в то время, как через 2 месяца пролиферации мышечных волокон и восстановления целостности мышечной оболочки не наблюдалось.
7. Формирование в месте имплантации структуры, схожей с уротелием и содержащей меченые клетки, подтверждено данными конфокальной микроскопии криосрезов.

8. Сгенерированный *in vitro* многокомпонентный композит, содержащий аллогенные МСК костного мозга кролика, сохраняет жизнеспособность через 2.5 месяца после его трансплантации с целью замещения дефекта МП в эксперименте *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует множество патологических состояний в урологической практике, которые требуют частичного или полного замещения мочевого пузыря. Перспективным решением является поиск подходящего материала для замещения МП с последующим заселением его клетками. На сегодняшний день предложены различные клеточные источники, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, человеческие пуповинные МСК, уротелиальные и гладкомышечные клетки. В проведенном исследовании использовались аллогенные МСК, которые обладают уникальным иммуномодулирующим действием и способны дифференцироваться в различные клеточные линии.

Исследования, посвященные созданию многокомпонентного трансплантата на основе трехмерной полилактидной матрицы и клеток различного тканевого происхождения, завершились получением матрицы на основе поли-L,L-лактида, который не обладает токсигенными свойствами и способен к биодegradации. Однако матрицы на основе поли-L,L-лактида не обладают достаточной прочностью и не могут использоваться для замещения обширных дефектов мочевого пузыря, поэтому оптимальным является введение в состав скаффолда фиброина шелка 1:1 и укрепление конструкции снаружи непроницаемой пленкой.

Замещение дефекта мочевого пузыря кролика с помощью полученных многокомпонентных композитов, содержащих аллогенные клетки и без них, не вызвало выраженных клинических и морфологических изменений в органах и тканях. Мы не обнаружили признаков отторжения имплантата в случаях трансплантации МСК-содержащего скаффолда, в отличие от остальных групп. Более того при трансплантации скаффолда, заселенного МСК подтверждено формирование аналогичной нормальной структуры стенки МП (включая уротелий, мышечную оболочку и сосуды). Предположительно, введенные в композит МСК не только стимулировали миграцию собственных клеток организма в зону дефекта, но и сами дифференцировались в необходимые клеточные типы.

Методом МРТ удалось визуализировать меченные клетки в виде наводящего артефакта в месте имплантации. Неожиданной находкой явилось наличие меток только в пересаженном лоскуте, что может означать отсутствие миграции клеток в окружающие ткани. Данные конфокальной микроскопии криосрезов стенки МП также подтвердило наличие меток во всех слоях мочепузырной стенки при полном их отсутствии в интактной зоне. Эти данные не противоречат ранее опубликованным результатам применения меченных SPION стволовых клеток (Yun S., Ja H., 2007, Geburek F. et al., 2016).

Таким образом, применение трехслойного ПЛ-Ф скаффолда, заселенного МСК, оказалось эффективным для реконструкции экспериментального дефекта мочевого пузыря. Восстановление структуры стенки МП подтверждено гистологически. Проведенный эксперимент показывает необходимость дальнейшего научного поиска в области реконструкции МП. Разработка новых многокомпонентных конструкций, содержащих аллогенные клетки, может привести к улучшению результатов хирургической коррекции состояний, при которых использование аутоклеток не представляется возможным. В настоящее же время вопрос возможности клинического применения МСК пока остается открытым до сих пор полностью не изучены, уникальные свойства этих клеток. Поэтому исследования данного направления и представляют собой огромный научный интерес. Полного понимания механизмов, отвечающих за их защитные и регенеративные эффекты, пока не достигнуто. Полученные за последние годы результаты обнадеживают и, однако, требуют более детального изучения.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее благоприятными для замещения дефекта мочевого пузыря физико-механическими свойствами обладает разработанная композитная матрица на основе поли-L,L-лактида с фиброином шелка (1:1), имеющая наружный водонепроницаемый слой из поли-L,L-лактида.

2. Разработанная композитная матрица, содержащая аллогенные стромальные клетки костного мозга, подвергается резорбции на 50% за 3 недели.

3. Замещение дефекта мочевого пузыря разработанной композитной матрицей, заселенной аллогенными стромальными клетками костного мозга, не приводит к ее отторжению в 83% случаев. Композитные матрицы без клеточного наполнения и содержащие аллогенные фибробласты, гладкие миоциты и уротелий отторгались в 100% случаев.

4. Замещение дефекта мочевого пузыря разработанной тканеинженерной конструкцией, не вызывает выраженных отрицательных клинических проявлений и изменений лабораторных показателей в течение 3.0 месяцев после операции.

5. Жизнеспособность *in situ* введенных в область дефекта мочевого пузыря аллогенных стромальных клеток костного мозга в составе тканеинженерной конструкции сохраняется в течение 2,5 месяцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве основы для экспериментального замещения мочевого пузыря подходит композитная матрица, состоящая из поли-L,L-лактида и фиброина шелка (1:1), покрытая с наружной стороны водонепроницаемой пленкой из поли-L,L-лактида.
2. В качестве аллогенного клеточного источника для создания тканеинженерного аналога стенки мочевого пузыря целесообразно использовать стромальные клетки костного мозга.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведенное диссертационное исследование является только начальным звеном на пути решения проблемы реконструкции мочевого пузыря с применением тканевой инженерии и клеточных технологий.

Возможность успешного замещения дефекта мочевого пузыря многокомпонентной конструкцией дает предпосылки для замещения всего органа тканеинженерным резервуаром.

Важным направлением является разработка методики идентификации введенных в МСК меток при гистологическом исследовании, что даст полное понимание процессов клеточной миграции и дифференцировки в зоне имплантации.

До внедрения разработанных технологий в клиническую практику необходимо досконально изучить природу уникальных свойств мезенхимальных стволовых клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛ – аллогенный лоскут

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаргатаминотрансфераза

БМ – бесклеточная матрица

ГМК – гладкомышечные клетки

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МП – мочевой пузырь

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПЛ – поли-L,L-лактид

ПЛ+Ф – поли-L,L-лактид, укрепленный фиброином шелка

ПЛ+Ф(Н) – поли-L,L-лактид, укрепленный фиброином шелка и непроницаемой пленкой

ПМР – пузырно-мочеточниковый рефлюкс

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

У – уротелий

ФБ – фибробласты

ЦНС – центральная нервная система

ЭМГ – электромиография

СDAI – Crohn's disease and Esophageal cancer activity index

HLA – human leukocyte antigens

IBDQ – inflammatory bowel disease questionnaire

IL – interleukin

PGA – poly glycolic acid

PLGA – poly lactic-co-glycolic acid

SPION – superparamagnetic iron oxide nanoparticles

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аничков, Н.М. Морфофункциональные особенности вариантов искусственного мочевого пузыря из сегментов желудочно-кишечного тракта при долгосрочном его функционировании / Н.М. Аничков Н.В. Бодарева, Б.К. Комяков // Нефрология. – 2013. – Том 17. – № 6. – С. 94-97.
2. Аничков, Н.М. Сравнительная клиническая и морфофункциональная оценка тонко-, толстокишечного и желудочного искусственных мочевого резервуаров в разные сроки функционирования / Н.М. Аничков, Б.К. Комяков, Н.В. Бодарева и соавт. // Урология. – 2013. – № 1. – С. 24-28.
3. Атдуев, В.А., Камнеобразование в кишечных мочевого резервуарах / В.А. Атдуев, Д.В. Абрамов, А.Б. Строганов и соавт. // Медицинский альманах. – 2008. – № 5. – С. 120-121.
4. Бондарь, Г.В. Использование прямой кишки в восстановительной хирургии мочевого пузыря: Автореф. дисс. докт. мед. наук / Бондарь Григорий Васильевич. – Донецк. – 1973. – 24 с.
5. Васильченко, М.Н., Оценка методов отведения мочи после радикальной цистэктомии. М.Н. Васильченко, М.В. Забелин, И.В. Семенякин и соавт. // Хирургическая практика. – 2014. – № 4. – С. 44-48.
6. Волков, А.В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины /А.В. Волков // Гены и клетки. – 2005. – № 1. – С. 57-63.
7. Галимзянов, В.З. Профилактика и лечение поздних осложнений после кишечной пластики мочевого пузыря / В.З. Галимзянов, А.А. Казихинуров, Л.М. Кутляров и соавт // Урология. – 2009. – № 1. – С. 50-55.
8. Глыбочко П.В. Экспериментальное обоснование создания гибридной матрицы и тканеинженерной конструкции на основе сетки из полилактогликолида и реконструированного коллагена с целью последующей заместительной уретропластики / П.В. Глыбочко, Ю.Г. Аляев, А.Б. Шехтер и соавт. // Урология. – 2015. – № 6. – С. 5-13.

9. Даренков, С.П., Осложнения радикальной цистэктомии с орто- и гетеротопической кишечной пластикой (обзор литературы) / С.П. Даренков, Г.Г. Кривобородов, С.В. Котов и соавт. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2013. – № 4. – С. 49-53.
10. Дубровин, В.Н., Применение различных вариантов кишечной пластики мочевого пузыря и модифицированных операций в лечении инвазивного рака мочевого пузыря / В.Н. Дубровин, А.В. Табаков, Г.А. Мельник и соавт. // Медицинский альманах. – 2008. – № 5. – С. 128-129.
11. Зубань, О.Н. Хирургическая коррекция малого мочевого пузыря / О.Н. Зубань, Б.К. Комяков. – СПб: Стикс. – 2011. – 227с.
12. Зубань, О.Н. Случай малигнизации кишечечно-пузырного анастомоза через 38 лет после аугментационной сигмоцистоластики / О.Н. Зубань, А.Н. Муравьев // Онкоурология. – 2010. – № 1. – С. 78-80.
13. Коган, М.И. Современная диагностика и хирургия рака мочевого пузыря / М.И. Коган, В.А. Перепечай // Ростов-на-Дону. – 2002. – 199 с.
14. Комяков, Б.К. Восстановление мочевыводящих путей различными отделами желудочно-кишечного тракта / Б.К. Комяков, А.И. Новиков, Б.Г. Гулиев и соавт. // Урология. – 2005. – № 5. – С.12-17.
15. Лелявин, К.Б. Профилактика послеоперационных осложнений в хирургии рака мочевого пузыря / К.Б. Лелявин, В.В. Дворниченко, О.Т. Халмуратов // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – № 1. – С. 69-70.
16. Лопаткин, Н.А. Радикальное лечение инвазивного рака мочевого пузыря / Н.А. Лопаткин, С.П. Даренков, И.В. Чернышев // Урология. – 2003. – № 4. – С. 3-8.
17. Лоран, О.Б. Диагностика и лечение интерстициального цистита у женщин / О.Б. Лоран, А.В. Зайцев, В.С. Липский // Саратов: Приволжское книжное издательство. – 2001. – 191 с.
18. Матвеев, Б.П. Рак мочевого пузыря / Б.П. Матвеев, К.М. Фигурин, О.Б. Карякин. – М., 2001. – 243 с.

19. Мельцова, А.Ж. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении больных с трофическими язвами венизной этиологии / А.Ж. Мельцова, В.В. Гриценко, П.И. Орловский и соавт. // Вестник хирургии. – 2007. – Том 166, – № 1. – С. 72-77.

20. Мочалова, Т.П. Лечение туберкулеза мочеполовой системы / Т.П. Мочалова, Н.К. Данилова, А.А. Довлатян и соавт. // Рук-во для врачей “Туберкулез мочеполовой системы” под ред. проф. Т.П. Мочаловой. М. Медицина. – 1993. – С. 138-233.

21. Муравьев, А.Н. Роль суправезикального отведения мочи в комплексном лечении больных туберкулезом почек и мочеточников / А.Н. Муравьев, О.Н. Зубань // Урология. – 2012. – № 6. – С. 16-20.

22. 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.

23. Орлова, Н.В. Положительный опыт трансплантации многокомпонентного композита, содержащего аллогенные мезенхимальные стволовые клетки после резекции стенки мочевого пузыря кролика (описание эксперимента) / Н.В. Орлова, А.Н. Муравьев, Т.И. Виноградова и соавт. // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 26-30.

24. Павлов, В.Н. Илеоцистопластика при инвазивном раке мочевого пузыря / В.Н. Павлов, В.З. Галимзянов, Л.М. Кутлияров и соавт. // Онкоурология. – 2009. – N 4. – С. 37-41.

25. Переверзев, А.С. Опухоли мочевого пузыря / А.С. Переверзев, С.Б. Петров. – Харьков: Факт.– 2002. – 304 с.

26. Семенов, С.А. Влияние хронической задержки мочеиспускания на качество жизни больных туберкулезом мочевого пузыря, перенесших аугментационную илеоцистопластику / С.А. Семенов, А.Н. Муравьев // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2014. – № 3. – С. 13-17.

27. Семенякин, И.В. Осложнения после цистэктомии и их лечение / И.В. Семенякин, М.И. Васильченко, Д.А. Зеленин, Е.А. Яшин // J. Act. Biomed. Scient. – 2012. – Vol. 4-1, Issue 86. – P. 84-86.
28. Семенякин, И.В. Динамика морфофункциональных преобразований слизистой оболочки искусственного тонкокишечного мочевого пузыря в отдаленные сроки после операции / И.В. Семенякин, Н.Н. Шевлюк, М.И. Васильченко, Д.А. Зеленин // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 229-232.
29. Серняк, П.С. Ректоцистопластика при суправезикальной деривации мочи / П.С. Серняк, Г.В. Бондарь, В.Г. Кобец и соавт. // Урология. – 1987. – № 6. – С. 9-12.
30. Серняк, П.С. К проблеме отведения мочи при раке мочевого пузыря / П.С. Серняк, Ю.П. Серняк, В.Г. Кобец и соавт. // Мат. 2-й Всерос. конф. «Актуальные вопросы онкоурологических заболеваний». – Обнинск. – 1997. – С. 70-71.
31. Файзулин, А.К. Пластика мочеиспускательного канала с использованием аутологичных кератиноцитов на биodeградирующем матриксе у детей с проксимальными формами гипоспадии / А.К. Файзулин, И.В. Поддубный, А.В. Кононов и соавт. // Андрология и генитальная хирургия. – 2016. – Том 17, № 2. – С. 85-97.
32. Чотчаев, Р.М. Илеоцистопластика укороченным и стандартным кишечным сегментом / Р.М. Чотчаев, О.Н. Зубань, А.Ф. Семченко, А.Н. Муравьев, Н.В. Орлова // Врач-аспирант. – 2011. – Т. 44. – № 1. – С. 34-40.
33. Швед, Ю.А. Создание клеточного продукта на основе клеток кожи человека – кератиноцитов и биodeградируемой полимерной пленки / Ю.А. Швед, М.И. Блинова, А.Ю. Билибин, Г.Л. Пинаев // Гены и клетки. – 2010. – Том 5, № 3. – С.54.
34. Abdel, H.S. Urothelial ingrowth over demucosalized gastrocystoplasty: an experimental study / H.S. Abdel, S.M. Soliman, M.E. Debeky // B.J.U. Int. – 2002. – Vol. 90, Issue 9. – P. 945-949.

35. Abdel-Azim, M.S. Gastrocystoplasty in patients with an areflexic low compliant bladder / M.S. Abdel-Azim, A.M. Abdel-Hakim // *Eur. Urol.* – 2003. – Vol. 44, Issue 2. – P. 260-265.

36. Adamowicz, J. New amniotic membrane based biocomposite for future application in reconstructive urology / J. Adamowicz, M. Pokrywczyńska, J. Tworkiewicz et al. // *PlosOne.* – 2016. – Vol. 11, Issue 1. – e0146012. doi: 10.1371/journal.pone.0146012.

37. Ajallouelian, F. Constructs of electrospun PLGA, compressed collagen and minced urothelium for minimally manipulated autologous bladder tissue expansion / F. Ajallouelian, S. Zeiai, M. Fossum, J.G. Hilborn // *Biomaterials.* – 2014. – Vol.35, Issue 22. – P. 5741-48.

38. Alberti, C. Tissue engineering technologies: just a quick note about transplantation of bioengineered donor trachea and augmentation cystoplasty by de novoengineered bladder tissue / C. Alberti // *G Chir.* – 2009. – Vol. 30, № 11/12. – P. 514-519.

39. Alberti, C. Quick note on tissue engineering-based surgical measures to treat patients with neurogenic bladder-due detrusor/sphincter dyssynergia / C. Alberti // *Ann. Ital. Chir.* – 2015. – Vol. 86, Issue 3. – P. 252-257.

40. Alwein, J.E. Use of the colon as a conduit for urinary diversion / J.E. Alwein, R. Hohenfellner // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1975. – Vol. 140. – P. 33-38.

41. Amiel, G.E. Tissue engineered stents created from chondrocytes / G.E. Amiel, J.J. Yoo, B.S. Kim et al. // *Journal of Urology.* – 2001. – Vol. 165, № 6, Part 1. – P. 2091-95.

42. Atala, A. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro / A. Atala, J.P. Vacanti, C.A. Peters et al. // *J Urol.* – 1992. – Vol.148, Issue 2, Part 2. – P. 658-662.

43. Atala, A. Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle / A. Atala, M.R. Freeman, J.P. Vacanti et al. // *J Urol.* – 1993. – Vol.150, Issue 2, Part 2. – P. 608-612.

44. Atala, A. Pediatric urology – future perspectives / A. Atala, A. Retik // *Clinical Urology*. Editors: R.J. Krane, M.B. Siroky, J.M. Fitzpatrick. – Philadelphia: Lippincott JB. – 1994. – P. 507-524.
45. Atala, A. Tissue engineering in the genitourinary system / A. Atala, D.J. Mooney // *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. – Boston: Birkhauser Press. – 1997. – P. 149-164.
46. Atala, A. Autologous cell transplantation for urologic reconstruction / A. Atala // *J Urol*. – 1998. – Vol. 159. – P. 2-3.
47. Atala, A. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty / A. Atala, S.B. Bauer, S. Soker et al. // *Lancet*. – 2006. – Vol. 367. – P. 1241-46.
48. Atala, A. Tissue engineering of human bladder / A. Atala // *Br Med Bull*. – 2011. – Vol. 97. – P. 81-104.
49. Baker, S.C. The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering / S.C. Baker, G. Rohman, J. Southgate et al. // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 1321-28.
50. Barry, F.P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F.P. Barry, J.M. Murphy // *Int J Biochem Cell Bio*. – 2004. – Vol. 36, Issue 4. – P. 568-584.
51. Bartholomew, A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo / A. Bartholomew, C. Sturgeon, M. Siatskas et al. // *Exp Hematol*. – 2002. – Vol. 30. – P. 42-48.
52. Biarreau, X. Risk of malignancy after augmentation cystoplasty: A systematic review / X. Biarreau, E. Chartier-Kastler, M. Rouprêt, V. Phé // *Neurourol. Urodyn*. – 2016. – Vol. 35, Issue 6. – P. 675-682.
53. Biers, S.M. The past, present and future of augmentation cystoplasty / S.M. Biers, S.N. Venn, T.J. Greenwell // *BJU Int*. – 2012. – Vol. 109, Issue 9. – P. 1280-93.
54. Bleustein, C.B. Laser-assisted demucosalized gastrocystoplasty with autoaugmentation in a canine model / C.B. Bleustein, B. Cuomo, G.C. Mingin et al. // *J.Urol*. – 2000. – Vol. 55, Suppl.3. – P. 437-442.

55. Boari, A. An easy and rapid method of fixing the ureters in the intestines without sutures by the aid of a special button: With experimental researches / A. Boari // *Columbus Med. J.* – 1897. – Vol. 19. – P. 1-20.
56. Bogash, M. Replacement of the urinary bladder by a plastic reservoir with mechanical valves / M. Bogash, F.P. Kohler, R.H. Scott et al. // *Surg Forum.* – 1960. – № 10. – P. 900-903.
57. Bohne, A.W. Experience with urinary bladder regeneration / A.W. Bohne, K.L. Urwiller // *J Urol.* – 1957. – Vol. 77. – P. 725-732.
58. Bona, A.V. Partial substitution of urinary bladder with Teflon prosthesis / A.V. Bona, A. De Gresti // *Minerva Urol.* – 1966. – Vol. 18. – P. 43.
59. Borelius, J. Eine neue Modification der Meidlschen Operationsmethode bei angeborener Blasenekstrophie / J. Borelius // *Zentrabalt Chir.* – 1903. – Vol. 30. – P. 780-782.
60. Bouhout, S. A novel and faster method to obtain a differentiated 3-dimensional tissue engineered bladder / S. Bouhout, F. Goulet, S. Bolduc // *J Urol.* – 2015. – Vol. 194, Issue 3. – P. 834-41.
61. Bouhout, S. Maintenance of bladder urothelia integrity and successful urothelialization of various tissue-engineered mesenchymes in vitro / S. Bouhout, J. Tremblay, S. Bolduc // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2015. – Vol.51, Issue 9. – P. 922-931.
62. Brehmer, B. Different types of scaffolds for reconstruction of the urinary tract by tissue engineering / B. Brehmer, D. Rohrman, C. Becker et al. // *Urol Int.* – 2007. – Vol. 78. – P. 23-29.
63. Brown, A.L. 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model / A.L. Brown, W. Farhat, P.A. Merguerian et al. // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 2179-90.
64. Bury, M.I. Bone marrow derived cells facilitate urinary bladder regeneration by attenuating tissue inflammatory responses / M.I. Bury, N.J. Fuller, L. Wethekam, A.K. Sharma // *Cent. European J. Urol.* – 2015. – Vol. 68, Issue 1. – P. 115-120.

65. Burt, R.K. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus / R.K. Burt, A. Traynor, L. Statkute et al. // JAMA. – 2006. – Vol. 295. – P. 527-535.
66. Caione, P. Bladder augmentation using acellular collagen biomatrix: a pilot experience in exstrophic patients / P. Caione, R. Boldrini, A. Salerno, S.G. Nappo // *Pediatr. Surg. Int.* – 2012. – Vol. 28, Issue 4. – P. 421-428.
67. Chang, S.S. Analysis of Early Complications After Radical Cystectomy: Results of a Collaborative Care Pathway / S.S. Chang, M.S. Cookson, R.G. Baumgartner et al. // *J. Urol.* – 2002. – Vol. 167, Issue 5. – P. 2012-16.
68. Chen, K.L. Bioengineered corporal tissue for structural and functional restoration of the penis / K.L. Chen, D. Eberli, J.J. Yoo et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol.107, Issue 8. – P. 3346-50.
69. Chen, F.M. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering / F.M. Chen, M. Zhang, Z.F. Wu // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – P. 6279-308.
70. Cheng, E. Reversed seromuscular flaps in the urinary tract in dogs / E. Cheng, R. Rento, J.T. Grayhack et al // *J Urol.* – 1994. – Vol. 152. – P. 2252-57.
71. Cheng, E.Y. Editorial comment / E.Y. Cheng // *J Urol.* – 2014. – Vol. 191. – P. 1395.
72. Cheng, K. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms / Cheng K., Rai P., Plagov A. et al. // *Experimental and Molecular Pathology.* – 2013. – Vol. 94, Issue 3. – P. 466–473.
73. Chun, Y.W. The role of polymer nanosurface roughness and submicron pores for improving bladder urothelial cell density and inhibiting calcium oxalate stone formation / Y.W. Chun, D. Khang, K.M. Haberstroh et al. // *Nanotechnology.* – 2009. – Vol.20, № 8. – P. 085104.
74. Chung, S.Y. Bladder tissue-engineering: a new practical solution? / S.Y. Chung // *Lancet.* – 2006. – Vol. 367. – P. 1215-6.

75. Chung, Y.G. The use of bi-layer silk fibroin scaffolds and small intestinal submucosa matrices to support bladder tissue regeneration in a rat model of spinal cord injury / Y.G. Chung, K. Algarrahi, D. Franck et al. // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, Issue 26. – P. 7452-9.
76. Chung, S.Y. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition / S.Y. Chung, N.P. Krivorov, V. Rausei et al // *J Urol*. – 2005. – Vol. 174. – P. 353-359.
77. Cilento, B.G. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro / B.G. Cilento, M.R. Freeman, F.X. Schneck et al. // *J Urol*. – 1994. – Vol. 152, Issue 2, Part 2. – P. 665-70.
78. Cohen, A.J. Comparative Outcomes and Perioperative Complications of Robotic Vs. Open Cystoplasty and Complex Reconstructions / A.J. Cohen, K. Brodie, P. Murthy et al. // *Urology*. – 2016. – Vol. 97. – P. 172-178.
79. Coutu, D.L. Tissue Engineering of Rat Bladder Using Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bladder Acellular Matrix / D.L. Coutu., W. Mahfouz, O. Loutochin, et al. // *PlosOne*. – 2014. – Vol. 9, Issue 12. – e111966.
80. 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. – P. 3233-43.
81. Dahms, S.E. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: Comparative analysis in rat, pig and human / S.E. Dahms, H.J. Piechota, R. Dahiya et al. // *Br J Urol*. – 1998. – Vol. 82. – P. 411-419.
82. Dalal, J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease / J. Dalal, K. Gandy, J. Domen // *Pediatr Res*. – 2012. – Vol. 71. – P. 445-451.
83. Danielsson, C. Modified collagen fleece, a scaffold for transplantation of human bladder smooth muscle cells / C. Danielsson, S. Ruault, A. Basset-Dardare et al. // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – P. 1054-60.

84. DaPozzo, L.F. Detubularized sigmoid colon for bladder replacement after radical cystectomy / L.F. Da Pozzo, R. Colombo, Pompa et al. // *J. Urol.* – 1994. – Vol. 152, Suppl. 5. – P. 1409-12.

85. DaSilva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues / L. Da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119. – P. 2204-13.

86. Davis, N.F. Evaluation of viability and proliferative activity of human urothelial cells cultured onto xenogenic tissue-engineered extracellular matrices / N.F. Davis, A. Callanan, B.B. McGuire et al. // *Urology.* – 2011. – Vol. 77, Issue 4. – P. 1007.

87. DeFilippo R. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices / R.E. De Filippo, J.J. Yoo, A. Atala // *Journal of Urology.* – 2002. – Vol. 168, №4. – P. 1789-92.

88. DeFoor, W. Gastrocystoplasty: Long-Term Followup / W. DeFoor, E. Minevich, D. Reeves // *J.Urol.* – 2003. – Vol. 170, Suppl. 4. – P. 1647-50.

89. DeFreitas Filho, L.G. Gastrocystoplasty and chronic renal failure: an acid-base metabolism study / L.G. de Freitas Filho, J. Carnevale, J.Q. Leão et al. // *J. Urol.* – 2001. – Vol. 166, Issue 1. – P. 251-254.

90. Denham, M. Neurons derived from human embryonic stem cells extend long-distance axonal projections through growth along host white matter tracts after intra-cerebral transplantation / M. Denham, C.L. Parish, B. Leaw, et al. // *Front Cell Neurosci.* – 2012. – № 6. – P. 11.

91. Derek, J. Tissue engineering in urology / J. Derek, D.J. Matoka, E.Y. Cheng // *Can Urol Assoc J.* – 2009. – Vol. 3. – P. 403-408.

92. Dozmorov, M.G. Differentially expressed gene networks in cultured smooth muscle cells from normal and neuropathic bladder / M.G. Dozmorov, B.P. Kropp, R.E. Hurst et al. // *J Smooth Muscle Res.* – 2007. – Vol. 43. – P. 55–72.

93. Drewa, T. Tissue engineering for the oncologic urinary bladder / T. Drewa, J. Adamowicz, A. Sharma // *Nat Rev Urol.* – 2012. – Vol. 9, Issue 10. – P. 561-72.

94. Du, T. The Regulation of Inflammatory Mediators in Acute Kidney Injury via Exogenous Mesenchymal Stem Cells / T. Du, Y.-J. Zhu // *Mediators of Inflammation*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 261697.
95. DyOrazio, O.R. Milking action: a new functional concept of different orthotopic neobladder: 4-year followup / O.R. Dy Orazio, O.L. Lambert, J.D. Otranto et al. // *J. Urol.* – 1998. – Vol. 160, Suppl. 4. – P. 1274-77.
96. Elbert, D.L. Surface treatments of polymers for biocompatibility / D.L. Elbert, J.A. Hubbell // *Annual Review of Materials Science*. – 1996. – Vol. 26. – P. 365-394.
97. El-Taji, O.M.S. Bladder reconstruction: The past, present and future (Review) / O.M.S. El-Taji, A.Q. Khattak, S.A. Hussain // *Oncol Lett.* – 2015. – Vol. 10, Issue 1. – P. 3-10.
98. Fabre, J.W. Epidermal allografts / J.W. Fabre // *Immunol Lett.* – 1991. – Vol. 29. – P. 161-165.
99. Farhat, W.A. Editorial comment / W.A. Farhat // *J Urol.* – 2014. – Vol. 191. – P. 1394.
100. Fehrer, C. Mesenchymal stem cell aging / C. Fehrer, G. Lepperdinger // *Exp Gerontol.* – 2005. – Vol. 40. – P. 926–930.
101. Fraser, M. A surgical model of composite cystoplasty with cultured urothelial cells: a controlled study of gross outcome and urothelial phenotype / M. Fraser, D.F. Thomas, E. Pitt et al. // *BJU Int.* – 2004. – Vol. 93. – P. 609–16.
102. Freed, C. R. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease / C.R. Freed, P.E. Greene, R.E. Breeze et al. // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 710-719.
103. Fujita, K. The use of resin-sprayed thin paper for urinary bladder regeneration / K. Fujita // *Invest Urol.* – 1978. – Vol. 15. – P. 355.
104. Geburek, F. Tracking of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with in vivo magnetic resonance imaging and histology after intralesional treatment of artificial equine tendon lesions – a pilot study / F. Geburek, K. Mundle, S. Conrad et al // *Stem Cell Res Ther.* – 2016. – Vol. 7, Issue 1. – P. 21.

105. Ghoneim, M.A. Further experience with the rectosigmoid bladder / M.A. Ghoneim, A.K. Ashamalla // *Br.J.Urol.* – 1974. – Vol. 46. – P. 511-517.
106. Gleeson, M.J. The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution / M.J. Gleeson, D.P. Griffith // *J Urol.* – 1992. – Vol. 148. – P. 1377-82.
107. Gong, Z. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) / Z. Gong, L.E. Niklason // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – P.1635-48.
108. Gratwohl, A. Hematopoietic stem cell transplantation / A. Gratwohl, H. Baldomero, M. Aljurf et al. // *JAMA.* – 2010. – Vol. 303. – P. 1617-24.
109. Guan, Y. The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds / Y. Guan, S. Liu, C. Sun et al. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol.6, № 34. – P. 36126-38.
110. Hanna, J. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration / J. Hanna, K. Saha, B. Pando et al. // *Nature.* – 2009. – Vol.462, Issue 7273. – P. 595-601.
111. Hara I. Health-related quality of life after radical cystectomy for bladder cancer: a comparison of ileal conduit and orthotopic bladder replacement / I. Hara, H. Miyake, S. Hara et al. // *BJU Int.* – 2002. – № 89. – P. 10.
112. Harrington, D.A. Bladder tissue engineering through nanotechnology / D.A. Harrington, A.K. Sharma, B.A. Erickson et al. // *World J Urol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 315-322.
113. Hidas, G. Aerosol transfer of bladder urothelial and smooth muscle cells onto demucosalized colonic segments for bladder augmentation: in vivo, long term, and functional pilot study / G. Hidas, H.J. Lee, A. Bahoric et al. // *J. Pediatr.Urol.* – 2015. – Vol. 11, Issue 5. – P. 260.
114. Hoogenkamp, H.R. Scaffolds for whole organ tissue engineering: Construction and in vitro evaluation of a seamless, spherical and hollow collagen bladder construct with appendices / H.R. Hoogenkamp, M.W. Pot, T.G. Hafmans et al. // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 43. – P. 112-121.

115. Horst, M. A bilayered hybrid microfibrinous PLGA—acellular matrix scaffold for hollow organ tissue engineering. / M. Horst, S. Madduri, V. Milleret et al. // *J. Biomaterials*. – 2013. – Vol.34, Issue 5. – P. 1537-45.

116. Horst, M. Polyesterurethane and acellular matrix based hybrid biomaterial for bladder engineering / M. Horst, V. Milleret, S. Noetzli et al. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2017. – Vol. 105, Issue 3. – P. 658-667.

117. Horst, M. Scaffolds for the Engineering of Functional Bladder Tissues / M. Horst, M. Srinivas, R. Gobet et al. // *Tissue Engineering*. Editor: D. Eberli. – Croatia: InTech. – 2010. – Chapter 6. – P. 119-140.

118. Hou, X. Transplantation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on a bladder acellular matrix for bladder regeneration in a canine model / X. Hou, C. Shi, W. Chen et al. // *J. Biomed. Mater.* – 2016. – Vol. 11, Issue 3. – e031001. doi: 10.1088/1748-6041/11/3/031001.

119. Huang, J.W. Tissue performance of bladder following stretched electrospun silk fibroin matrix and bladder acellular matrix implantation in a rabbit model / J.W. Huang, Y.M. Xu, Z.B. Li et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2016. – Vol. 104, Issue 1. – P. 9-16.

120. Ideguchi, M. Murine embryonic stem cell-derived pyramidal neurons integrate into the cerebral cortex and appropriately project axons to subcortical targets / M. Ideguchi, T.D. Palmer, L.D. Recht et al. // *J Neurosci*. – 2010. – Vol. 30. – P. 894–904.

121. Jackson, C.J. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium / C.J. Jackson, P.K. Garbett, B. Nissen et al. // *Journal of Cell Science*. – 1990. – Vol. 96, Part 2. – P. 257–262.

122. Jayne, D. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus / D. Jayne, J. Passweg, A. Marmont et al. // *Lupus*. – 2004. – Vol. 13. – P. 168-176.

123. Jerman, U.D. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable

to that of native urothelium / U.D. Jerman, P. Veranič, M.E. Kreft // *Tissue Eng. Part.C. Methods.* – 2014. – Vol. 20, Issue 4. – P. 317-327.

124. Joseph, D.B. Autologous cell seeded biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: phase II study in children and adolescents with spina bifida / D.B. Joseph, J.G. Borer, R.E. De Filippo et al. // *J. Urol.* – 2014. – Vol. 191, Issue 5. – P. 1389-95.

125. Kaefer, M. Reservoir calculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments / M. Kaefer, W.H. Hendren, S.B. Bauer et al. // *J. Urol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 2187-90.

126. Kaefer, M. Continent urinary diversion: the children's hospital experience / M. Kaefer, M.S. Tobin, W.H. Hendren et al. // *J. Urol.* – 1997. – Vol. 157. – P. 1394-99.

127. Kaigler, D. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled, feasibility trial / D. Kaigler, G. Pagni, C. Park et al. // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 22, Issue 5. – P. 767-777.

128. Kajbafzadeh, A.M. Application of different scaffolds for bladder wall regeneration: the bladder as a natural bioreactor / A.M. Kajbafzadeh, S.A. Esfahani, Z. Sadeghi et al. // *Tissue Eng. Part. A.* – 2012. – Vol. 18, Issue 7-8. – P. 882-887.

129. Kajbafzadeh, A.M. In-vivo autologous bladder muscular wall regeneration: application of tissue-engineered pericardium in a model of bladder as a bioreactor / A.M. Kajbafzadeh, S.A. Esfahani, S.S. Talab et al. // *Pediatr. Urol.* – 2011. – Vol. 7, Issue 3. – P. 317-323.

130. Kajbafzadeh, A.M. In vivo regeneration of bladder muscular wall using decellularized colon matrix: an experimental study / A.M. Kajbafzadeh, R. Khorramirouz, S. Sabetkish et al. // *Pediatr. Surg. Int.* – 2016. – Vol. 32, Issue 6. – P. 615-622.

131. Kajbafzadeh A.M., Bladder muscular wall regeneration with autologous adipose mesenchymal stem cells on three-dimensional collagen-based tissue-engineered prepuce and biocompatible nanofibrillar scaffold / A.M. Kajbafzadeh, A. Tourchi, A.A. Mousavian et al. // *J. Pediatr. Urol.* – 2014. – Vol. 10, Issue 6. – P. 1051-58.

132. Kanematsu, A. Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor / A. Kanematsu, S. Yamamoto, T. Noguchi et al. // *J Urol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 1633-38.

133. Kates, M. Tissue-engineered urinary conduits / M. Kates, A. Singh, H. Matsui et al. // *Curr. Urol. Rep.* – 2015. – Vol. 16, Issue 3. – P. 8.

134. Kelâmi, A. Experimental investigations of bladder regeneration using teflon-felt as a bladder wall substitute / A. Kelâmi, H.O. Dustmann, A. Lüdtké-Handjery // *J Urol.* – 1970. – Vol. 104. – P. 693-698.

135. Kelâmi, A. Alloplastic replacement of the urinary bladder wall with lyophilized human dura / A. Kelâmi, A. Ludtke-Handjery, G. Korb et al. // *Europ Surg Res.* – 1970. – Vol. 2. – P. 195.

136. Kikuno, N. Nerve growth factor combined with vascular endothelial growth factor enhances regeneration of bladder acellular matrix graft in spinal cord injury-induced neurogenic rat bladder / N. Kikuno, K. Kawamoto, H. Hirata et al. // *BJU Int.* – 2009. – Vol. 103. – P. 1424-28.

137. Kingham, P.J. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. / P.J. Kingham, M.K. Kolar, L.N. Novikova et al. // *Stem Cells Dev.* – 2014. – Vol. 23. – P. 741-754.

138. Kisku, S. Bladder calculi in the augmented bladder: a follow-up study of 160 children and adolescents / S. Kisku, S. Sen, S. Karl et al. // *J. Pediatr.Urol.* – 2015. – Vol. 11, Issue 2. – P. 66.

139. Kispal, Z.F. Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment / Z.F. Kispal, D. Kardos, T. Jilling et al. // *J. Pediatr. Urol.* – 2015. – Vol. 11, Issue 6. – P. 349.

140. Kordower, J.H. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease / J.H. Kordower, Y. Chu, R.A. Hauser et al. // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 504-506.

141. Kråling, B.M. A simplified method for growth of human microvascular endothelial cells results in decreased senescence and continued responsiveness to

cytokines and growth factors / B.M. Kråling, J. Bischoff // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 1998. – Vol. 34, Issue 4. – P. 308-315.

142. Kudish, H.G. The use of polyvinyl sponge for experimental cystoplasty / H.G. Kudish // *J Urol.* – 1957. – Vol. 78. – P. 232.

143. Kwon, T.G. Autologous penile corpora cavernosa replacement using tissue engineering techniques / T.G. Kwon, J.J. Yoo, A. Atala // *J Urol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 1754-58.

144. Kwon, TG. Local and systemic effects of a tissue engineered neobladder in a canine cystoplasty model. / T.G. Kwon, J.J. Yoo, A. Atala // *J. Urol.* – 2008. – Vol. 179. – P. 2035-41.

145. Lai, J.Y. Phenotypic and functional characterization of in vivo tissue engineered smooth muscle from normal and pathological bladders / J.Y. Lai, C.Y. Yoon, J.J. Yoo et al. // *J Urol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 1853-57.

146. Langer, R. Tissue engineering / R. Langer, J.P. Vacanti // *Science.* – 1993. – Vol. 260. – P. 920-926.

147. Lee, H. Improvement in spinal cord injury-induced bladder fibrosis using mesenchymal stem cell transplantation into the bladder wall / H. Lee, J. An, S. Doo et al. // *Cell Transplantat.* – 2015. – Vol. 24, Issue 7. – P. 1253-63.

148. Li, L. Cystectomy and rehabilitation training for treatment of neurogenic bladder dysfunction with hyperreflexia / L. Li, Y. Fan, H. Li, Q. Zhang et al. // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2016. – Vol. 30, Issue 2. – P. 224-228.

149. Liang, J. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease / J. Liang, H. Zhang, D. Wang et al. // *Gut.* – 2012. – Vol. 61. – P. 468-469.

150. Liao, W. Tissue-engineered tubular graft for urinary diversion after radical cystectomy in rabbits / W.Liao, S. Yang, C. Song et al. // *J. Surg. Res.* – 2013. – Vol. 182, Issue 2. – P. 185-191.

151. Lin, H.K. Biomatrices for bladder reconstruction / H.K. Lin, S.V. Madihally, B. Palmer et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 82-83. – P. 47-63.

152. Liu, H. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins / H. Liu, Y. Kim, S. Sharkis et al. // *Sci Transl Med.* – 2011. – Vol. 3, Issue 82. – 82ra39.
153. Ma, D. Research progress of cell sheet technology and its applications in tissue engineering and regenerative medicine / D. Ma, L. Ren, T. Mao // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* – 2014. – Vol. 31, Issue 5. – P. 1164-67.
154. Mahfouz, W. Fundamentals of bladder tissue engineering / W. Mahfouz, S. Elsalmy, J. Corcos et al. // *Afr J Urol.* – 2013. – Vol. 19. – P. 51-57.
155. Martínez-Montiel, M.P. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease / M.P. Martínez-Montiel, G.J. Gómez-Gómez, A.I. Flores // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20, Issue 5. – P. 1211-27.
156. Matoka D.J. Tissue engineering in urology / D.J. Matoka, E.Y. Cheng // *Can Urol Assoc J.* – 2009. – Vol. 3, Issue 5. – P. 403-408.
157. McConnell, J.B. The long-term management and social consequences of ereterosigmoid anastomosis / McConnell J.B., Stewart W.K. // *Br. J.Urol.* – 1975. – Vol. 47. – P. 607-611.
158. Mendez, I. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years / I. Mendez, A. Vinuela, A. Astradsson et al. // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14, Issue 5. – P. 507-509.
159. Meng, L.C. Seeding homologous adipose-derived stem cells and bladder smooth muscle cells into bladder submucosa matrix for reconstructing the ureter in a rabbit model / L.C. Meng, W.B. Liao, S.X. Yang et al. // *Transplant. Proc.* – 2015. – Vol. 47, Issue 10. – P. 3002-11.
160. Mikulicz, Y. Operation der angeborenen Blasenpalte / Y. Mikulicz // *Zentralbl.Chir.* – 1899. – Vol. 26. – P. 641.
161. Mills, R.D. Metabolic consequences of continent urinary diversion / R.D. Mills, U.E. Studer // *J.Urol.* – 1999. – Vol. 161. – P. 1057-66.
162. Mogg, R.A. Urinary diversion using the colonic conduit / R.A. Mogg // *Brit. J.Urol.* – 1967. – Vol. 39. – P. 687-692.

163. Monsour, M.J. An assessment of a collagen/vicryl composite membrane to repair defects of the urinary bladder in rabbits / M.J. Monsour, R. Mohammed, S.D. Gorham // *Urol Res.* – 1987. – Vol. 15. – P. 235-238.

164. Montie, J.E. Formation of orthotopic neobladder following radical cystectomy: historical perspective, patient selection and contemporary outcomes / J.E. Montie, J.T. Wei // *J. Pelvic Surg.* – 2002. – Vol. 8. – P. 141.

165. Moon, S.J. Bladder reconstruction using bovine pericardium in a case of enterovesical fistula / S.J. Moon, D.H. Kim, J.K. Jo et al. // *Korean J Urol.* – 2011. – Vol. 52. – P. 150-153.

166. Morales, P. Colonic urinary diversion: 10 years of experience / P. Morales, M. Golimby // *J. Urol.* – 1975. – Vol. 113. – P. 302-307.

167. Muraishi O. Gastrocystoplasty in adults and postoperative acidural / O. Muraishi, A. Ogawa, H. Kato et al. // *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* – 1994. – Vol. 85, Suppl. 8. – P. 1263-68.

168. Nakanishi, Y. Tissue-engineered urinary bladder wall using PLGA mesh-collagen hybrid scaffolds: a comparison study of collagen sponge and gel as a scaffold. / Y. Nakanishi, G. Chen, H. Komuro et al // *J Pediatr Surg.* – 2003. – Vol. 38. – P. 1781-84.

169. Neuhof, H. Fascial transplantation into visceral defects: an experimental and clinical study / H. Neuhof // *Surg Gynecol Obst.* – 1917. – Vol. 25. – P. 383.

170. Nishikawa, S. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy / S. Nishikawa, R.A. Goldstein, C.R. Nierras // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 725-729.

171. Nuininga, J.E. A rabbit model to tissue engineer the bladder / J.E. Nuininga, H. Van Moerkerk, A. Hanssen et al. // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25. – P. 1657-61.

172. Ohishi, T. Bladder cancer stem-like cells: their origin and therapeutic perspectives / T. Ohishi, F. Koga, T. Migita // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 17. – P. 43.

173. Oberpenning, F. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering / F. Oberpenning, J. Meng, J.J. Yoo // *Nat Biotechnol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 149-155.
174. Onken, J. Successful outpatient treatment of refractory Crohn's disease using adult mesenchymal stem cells / J. Onken, D. Gallup, J. Hanson et al. // *ACG 2006 Final Program Book.* – 2006. – P. 121.
175. Orabi, H. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study / H. Orabi, T. AbouShwareb, Y. Zhang et al. // *Eur. Urol.* – 2013. – Vol. 63, Issue 3. – P. 531-538.
176. Orabi, H. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: Advances from bench to patients / H. Orabi, S. Bouhout, A. Morissette et al. // *ScientificWorldJournal.* – 2013. – e:154564.
177. Orikasa, S. Enlargement of contracted bladder by use of gelatin sponge bladder / S. Orikasa, I. Tsuji // *J Urol.* – 1970. – Vol. 104. – P. 107-110.
178. Orlova, N.V. Experimental urinary bladder reconstruction using allogenic tissue engineering products / *Cellular Therapy and Transplantation* // 2019. – Vol. 8. – Issue 2. – P. 68-73.
179. Ott, H.C. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung / H.C. Ott, B. Clippinger, C. Conrad et al. // *Nat Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 927-933.
180. Ott, H.C. Perfusiondecellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart / H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S-K. Goh et al. // *Nat Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 213-221.
181. Ouyang, B. Human urine-derived stem cells alone or genetically-modified with FGF2 Improve type 2 diabetic erectile dysfunction in a rat model / B. Ouyang, X. Sun, D. Han et al. // *PlosOne.* – 2014. – Vol. 9, Issue 3. – e:92825. doi: 10.1371/journal.pone.0092825.
182. Pareek, G. Hand-assisted demucosalized gastrocystoplasty comparing different tissue closure methods / G. Pareek, M. Specht, D.D. Lin et al. // *J.Urol.* – 2001. – Vol. 58, Suppl. 4. – P. 625-630.

183. Pariente, J.L. In vitro biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells / J.L. Pariente, B.S. Kim, A. Atala // *J Biomed Mater Res.* – 2001. – Vol. 55. – P. 33-39.

184. Pariente, J.L. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells / J.L. Pariente, B.S. Kim, A. Atala // *J Urol.* – 2002. – Vol. 167. – P. 1867-71.

185. Patel, M.N. Tissue Engineering of the Penis / M.N. Patel, A. Atala // *The Scientific World J.* – 2011. – Vol. 11. – P. 2567-2578.

186. Pattison, M.A. Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications / M.A. Pattison, S. Wurster, T.J. Webster et al. // *Biomaterials.* – 2005. – Vol. 26. – P. 2491-2500.

187. Petrovic, V. Tissue engineering of the urinary bladder: current concepts and future perspectives / V. Petrovic, J. Stankovic, V. Stefanovic // *Scientific World Journal.* – 2011. – Vol. 28, Issue 11. – P. 1479-88.

188. Pittenger, M.F. Mesenchymal Stem Cells / M.F. Pittenger, G. Mbalaviele, M. Black et al. // *Human Cell Culture.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. – 2001. – Vol. 5. – P. 189-207.

189. Pittenger, M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, et al. // *Science.* – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.

190. Pokrywczynska, M. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering – an analysis of 131 clinical cases / M. Pokrywczynska, J. Adamowicz, A.K. Sharma et al. // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2014. – Vol. 239. – P. 264-271.

191. Pokrywczynska, M. Is the poly (L-lactide-co-caprolactone) nanofibrous membrane suitable for urinary bladder regeneration? / M. Pokrywczynska, A. Jundzill, J. Adamowicz et al. // *PlosOne.* – 2014. – Vol. 9, Issue 8. – e105295. doi: 10.1371/journal.pone.0105295.

192. Portilla, S.R. Vesical regeneration in the human after total cystectomy and implantation of a plastic mould / S.R. Portilla, F.L. Blanco, A. Santamarina et al. // *Br J Urol.* – 1958. – Vol. 30. – P. 180-188.

193. Probst, M. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement / M. Probst, R. Dahiya, S. Carrier et al. // *Br J Urol.* – 1997. – Vol. 79. – P. 505-515.
194. Qian, L. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes / L. Qian, Y. Huang, C.I. Spencer et al. // *Nature.* – 2012. – Vol. 485. – P. 593-598.
195. Qin, D. Urine-derived stem cells for potential use in bladder repair / D. Qin, T. Long, J. Deng, Y. Zhang // *Stem Cell. Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5, Issue 3. – P. 69.
196. Rama, P. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration / P. Rama, S. Matuska, G. Paganoni et al. // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 147-155.
197. Remedi, V. Un caso di extrophia della vesica / V. Remedi // *Clin. Chir.* 1906. – Vol. 14. – P. 608-640.
198. Roelofs, L.A. Tissue engineering of diseased bladder using a collagen scaffold in a bladder exstrophy model / L.A. Roelofs, B.B. Kortmann, E. Oosterwijk et al. // *BJU Int.* – 2014. – Vol. 114, Issue 3. – P. 447-457.
199. Rohrman, D. Alloplastic replacement of the urinary bladder / D. Rohrman, D. Albrecht, J. Hannappel et al. // *J Urol.* – 1996. – Vol. 156. – P. 2094-97.
200. Rossetto, V.J. Grafts of porcine small intestinal submucosa seeded with cultured homologous smooth muscle cells for bladder repair in dogs / V.J. Rossetto, L.S. da Mota, N.S. Rocha et al. // *Acta Vet. Scand.* – 2013. – Vol. 55. – P. 39.
201. Rubinstein, P. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution / P. Rubinstein, R.E. Rosenfield, J.W. Adamson et al. // *Blood.* – 1993. – Vol. 81. – P. 1679-90.
202. Sabetkish, N. Augmentation cystoplasty using decellularized vermiform appendix in rabbit model / N. Sabetkish, A.M. Kajbafzadeh, S. Sabetkish, S.M. Tavangar // *J.Pediatr. Surg.* – 2014. – Vol. 49, Issue 3. – P. 477-483.

203. Sack, B.S. Silk Fibroin Scaffolds for Urologic Tissue Engineering / B.S. Sack, J.R. Mauney, C.R. Estrada // J.Curr. Urol. Rep. – 2016. – Vol. 17, Issue 2. – P. 16.

204. Sangha, N. Isolation of Urothelial Cells from Bladder Tissue / N. Sangha // Organ Regeneration: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Tension Inc. Winston-Salem. NC. USA. – 2013. – Vol. 1001. – P. 21-33.

205. Schmidt, J.D. Longterm Follow-up. Further Experience with and Modification of the Transverse Colon-Conduit in Urinary Tract Diversion / J.D. Schmidt, H.J. Buchsbaum, D.A. Nachtsheim // Brit. J. Urol. – 1985. – Vol. 57. – P. 284-288.

206. Schoeller, T. Bladder reconstruction using a prevascularized capsular tissue seeded with urothelial cells / T. Schoeller, S. Lille, A. Stenzl et al. // J Urol. – 2001. – Vol. 165. – P. 980-985.

207. Schultheiss, D. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model / D. Schultheiss, A.I. Gabouev, S. Cebotari et al. // J Urol. – 2005. – Vol. 173. – P. 276-280.

208. Shakhssalim, N. Bladder tissue engineering using biocompatible nanofibrous electrospun constructs: Feasibility and safety investigation / N. Shakhssalim, M.M. Dehghan, R. Moghadasali et al. // Urol J. – 2012. – Vol. 9. – P. 410-419.

209. Sharma, A.K. Cotransplantation with specific populations of spina bifida bone marrow stem/progenitor cells enhances urinary bladder regeneration / A.K. Sharma, M.I. Bury, N.J. Fuller et al. // Proc Natl Acad Sci. USA. – 2013. – Vol. 110. – P. 4003-08.

210. Sharma, A.K. A nonhuman primate model for urinary bladder regeneration using autologous sources of bone marrow-derived mesenchymal stem cells / A.K. Sharma, M.I. Bury, A.J. Marks et al. // Stem. Cells. – 2011. – Vol. 29, Issue 2. – P. 241-250.

211. Shi, Y. Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy and Tissue Regeneration in Urology / Y. Shi, Y. Zhang // *Regen. Med. and Tissue Engin. – Cells and Biomat.* – 2011. – P. 209-228.
212. Shreck, E. Indications for augmentation cystoplasty in the era of onabotulinumtoxin / E. Shreck, K. Gioia, A. Lucioni // *Curr. Urol. Rep.* – 2016. – Vol. 17, Issue 4. – P. 27.
213. Shokeir, A.A. Tissue engineering and stem cells: Basic principles and applications in urology / A.A. Shokeir, A.M. Harraz, A.B. El-Din // *Int J Urol.* – 2010. – Vol. 17. – P. 964-973.
214. Sievert, K.D. Collagen I:III ratio in canine heterologous bladder acellular matrix grafts / K.D. Sievert, T. Fandel, J. Wefer et al. // *World J Urol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 101-109.
215. Sinaiko E.S. Artificial bladder from segment of stomach and study of effect of urine on gastric secretion / E.S. Sinaiko // *Sur.Gin.Obst.* – 1956. – Vol. 102. – P. 443-438.
216. Sivaraman, S. Tetronic®-based composite hydrogel scaffolds seeded with rat bladder smooth muscle cells for urinary bladder tissue engineering applications / S. Sivaraman, R. Ostendorff, B. Fleishman, J. Nagatomi // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2015. – Vol. 26, Issue 3. – P. 196-210.
217. Sloff, M. Tissue engineering of the bladder – reality or myth? A systematic review / M. Sloff, V. Simaioforidis, R. de Vries et al. // *J. Urol.* – 2014. – Vol. 192, Issue 4. – P. 1035-42.
218. Snow-Lisy, D.C. The Role of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells in Urinary Bladder Regeneration / D.C. Snow-Lisy, E.C. Diaz, M.I. Bury, A.K. Sharma // *PlosOne.* – 2015 . – Vol. 10, Issue 9. – e0138643.
219. Soergel, T.M. Transitional cell carcinoma of the bladder following augmentation cystoplasty for the neuropathic bladder / T.M. Soergel, M.P. Cain, R. Misseri et al. // *J Urol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 1649-51.

220. Song, J.J. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney / J.J. Song, J.P. Guyette, S.E. Gilpin et al. // *Nat Med* . – 2013. – Vol. 19, Issue 5. – P. 646-651.

221. Southgate, J. Bladder reconstruction—from cells to materials / J. Southgate, W. Cross, I. Eardley et al. // *Proc Inst Mech Eng H*. – 2003. – Vol. 217. – P. 311-316.

222. Stein, J.P. The orthotopic T pouch ileal neobladder: experience with 209 patients / J.P. Stein, M.D. Dunn , M.L, Quek et al. // *J. Urol*. – 2004. – Vol. 172, Issue 2. – P. 584-587.

223. Steinbeck, J.A. Human embryonic stem cell-derived neurons establish region-specific, long-range projections in the adult brain / J.A. Steinbeck, P. Koch, A. Derouiche et al. // *Cell Mol Life Sci*. – 2012. – Vol. 69. – P. 461–470.

224. Stonington, O.G. Perineal sigmoidostomy in cases of total cystectomy / O.G. Stonington, B. Eiseman // *J. Urol*. – 1956. – Vol. 76. – P. 74-78.

225. Studer, U.E. Bladder Replacement and Urinary Diversion / U.E. Studer, A. Stenzl, W. Mansson et al. // *European J.Urol*. – 2000. – Vol. 38, Suppl. 6. – P. 1-11.

226. Subramaniam, R. Tissue engineering potential of urothelial cells from diseased bladders / R. Subramaniam, J. Hinley, J. Stahlschmidt et al. // *J Urol* . – 2011. – Vol. 186. – P. 2014-20.

227. Sutherland, R.S. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix / R.S. Sutherland, L.S. Baskin, S.W. Hayward et al. // *J Urol*. – 1996. – Vol. 156. – P. 571-577.

228. Tanaka, T. Long-term functional outcome and late complications of Studer's ileal neobladder / T. Tanaka, H. Kitamura, A. Takahashi et al. // *Jpn. J. Clin. Oncol*. – 2005. – Vol. 35, Issue 7. – P. 391-394.

229. Telli, O. Preoperative risk factors predicting complications rates of augmentation cystoplasty using the modified clavien classification system in pediatric population / O. Telli, C. Ozcan, N. Hamidi et al. // *Urology*. – 2016. – Vol. 97. – P. 166-171.

230. Thepot, A. Assessment of Transformed Properties In Vitro and of Tumorigenicity In Vivo in Primary Keratinocytes Cultured for Epidermal Sheet Transplantation / A. Thepot, A. Desanlis, E. Venet et al. // *J. of Skin Cancer*. – 2011. – e:936546.

231. Thomas, E.D. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy / E.D. Thomas, H.L. Lochte Jr, W.C. Lu et al. // *N Engl J Med*. – 1957. – Vol. 257. – P. 491-496.

232. Tizzoni, G. Die Wiederherstellung der Harnblase / G. Tizzoni, A. Foggi // *Zentralbl.Chir*. – 1888. – Vol. 15. – P. 921-924.

233. Tögel, F. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury / F. Tögel, K. Weiss, Y. Yang et al. // *American Journal of Physiology: Renal Physiology*. – 2007. – Vol. 292, Issue 5. – P. F1626-F1635.

234. Tsuji, I. Experimental cystoplasty using preserved bladder graft / I. Tsuji, H. Ishida, J. Fujieda // *J Urol*. – 1961. – Vol. 85. – P. 42-44.

235. Tsuji, I. Clinical experience of bladder reconstruction using preserved bladder and gelatin sponge in the case of bladder cancer / I. Tsuji, K. Kuroda, J. Fujieda et al. // *J Urol*. – 1967. – Vol. 98. – P. 91-92.

236. Tu, D.D. Evaluation of biomaterials for bladder augmentation using cystometric analyses in various rodent models / D.D. Tu, A. Seth, E.S. Gil et al. // *J.Vis. Exp*. – 2012. – Vol. 9. – P. 66.

237. Ulery, B.D. Biomedical applications of biodegradable polymers / B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin // *J Polym Sci B Polym Phys*. – 2011. – Vol. 49. – P. 832-864.

238. Vardar, E. IGF-1-containing multi-layered collagen-fibrin hybrid scaffolds for bladder tissue engineering / E. Vardar, H.M. Larsson, E.M. Engelhardt et al. // *Acta Biomater*. – 2016. – Vol. 41. – P. 75-85.

239. Vaught, J.D. Detrusor regeneration in the rat using porcine small intestinal submucosal grafts: functional innervation and receptor expression / J.D. Vaught, B.P. Kropp, B.D. Sawyer et al. // *J Urol*. – 1996. – Vol. 155. – P. 374-378.

240. Voswinkel, J. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells / J. Voswinkel, S. Francois, N.C. Gorin et al. // *Immunol. Res.* – 2013. – Vol. 56. – P. 241-248.

241. Wang, S. Clinical applications of mesenchymal stem cells / S. Wang, X. Qu, R.C. Zhao // *J Hematol Oncol.* – 2012. – Vol. 5. – P. 19.

242. Warren, L. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA / L. Warren, P.D. Manos, T. Ahfeldt et al. // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7, Issue 5. – P. 618-630.

243. Wezel, F. Plasticity of in vitro-generated urothelial cells for functional tissue formation / F. Wezel, J. Pearson, J. Southgate // *Tissue Eng. Part. A.* – 2014. – Vol. 20, Issue 9-10. – P. 1358-68.

244. Wilmut, I. The first direct reprogramming of adult human fibroblasts / I. Wilmut // *Cell Stem Cell.* – 2007. – Vol. 1, Issue 6. – P. 593-594.

245. Wood, D. Current status of tissue engineering in urology / D. Wood, J. Southgate // *Curr Opin Urol.* – 2008. – Vol. 18, Issue 6. – P. 564-569.

246. Wu, S. Urothelial differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in vitro / S. Wu, Z. Cheng, G. Liub, et al. // *Analytical Cellular Pathology.* – 2013. – Vol. 36. – P. 63-69.

247. Xiao, Y. Fabrication and biocompatibility evaluation of polyurethane -acellular matrix composite scaffold in vitro and in vivo / Y. Xiao, J. Zhang, Y. Lu et al. // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* – 2015. – Vol. 29, Issue 8. – P. 1016-21.

248. Yamanaka, S. Pluripotency and nuclear reprogramming / S.Yamanaka // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2008. – Vol. 363. – P. 2079-87.

249. Yan, S. A big step forward in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus: allogenic mesenchymal stem cell transplantation / S. Yan, X. Deng, W. Wei. // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2013. – Vol. 34. – P. 453-454.

250. Yao, L. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn / L. Yao, Z-r. Li, W-r. Su et al. // PlosOne. – 2012. – Vol. 7. – e30842. doi: 10.1371/journal.pone.0030842.
251. Yashi, M. Gastrocystoplasty in a woman with radiation-induced ureteral obstruction and low-compliance bladder / M. Yashi, O. Muraishi, Y. Kobayashi et al. // Urol Int. – 1998. – Vol. 61, Suppl. 1. – P. 55-57.
252. Yokoyama, T. Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle / T. Yokoyama, J. Huard, R. Pruchnic et al. // Urology. – 2001. – Vol. 57. – P. 826-831.
253. Yoo, J.J. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells / J.J. Yoo, J. Meng, F. Oberpenning et al. // Urology. – 1998. – Vol. 51. – P. 221-225.
254. Yoo, J.J. Regenerative Medicine Strategies for Treating Neurogenic Bladder / J.J. Yoo., J.Olson, A. Atala, B. Kim // Int. Neurourol. J – 2011. – Vol. 15. – P. 109-119.
255. Yuan, H. Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells-Seeded Bladder Acellular Matrix Grafts for Reconstruction of Bladder Defects in a Canine Model / H. Yuan, Y. Zhuang, J. Xiong et al. // PlosOne. – 2013. – Vol. 8, Issue 11. – e80959.
256. 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. 4521-33.
257. Yun, S. Monitoring transplanted human mesenchymal stem cells in rat and rabbit bladders using molecular magnetic resonance imaging. / S. Yun, H. Ja // Neurourol Urodyn. – 2007. – Vol. 26, Issue 4. – P. 584-593.
258. Zappia, E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy / E. Zappia, S. Casazza, E. Pedemonte et al. // Blood. – 2005. – Vol. 106. – P. 1755-61.

259. Zhang, Y. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder / Y. Zhang, H.K. Lin, D. Frimberger et al. // *BJU Int.* – 2005. – Vol. 96. – P. 1120-25.
260. Zhang, M. Differentiation of human adipose-derived stem cells co-cultured with urothelium cell line toward a urothelium-like phenotype in a nude murine model. / M. Zhang, Y. Peng et al. // *Urology.* – 2013. – Vol. 81, Issue 2. – P. 465.
261. Zhao, R. From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors / R. Zhao, G.Q. Daley // *J Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 105, Issue 4. – P. 949-955.
262. Zhao, Y. Time-dependent bladder tissue regeneration using bilayer bladder acellular matrix graft-silk fibroin scaffolds in a rat bladder augmentation model / Y. Zhao, Y. He, J.H. Guo et al. // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 23. – P. 91-102.
263. Zhe, Z., Bladder acellular matrix grafts seeded with adipose-derived stem cells and incubated intraperitoneally promote the regeneration of bladder smooth muscle and nerve in a rat model of bladder augmentation / Zhe Z., Jun D., Yang Z. et al. // *Stem Cells Dev.* – 2016. – Vol. 25, Issue 5. – P. 405-414.
264. Zhu, W.D. Different bladder defects reconstructed with bladder acellular matrix grafts in a rabbit model / W.D. Zhu, Y.M. Xu, C. Feng et al. // *Urologe A.* – 2011. – Vol. 50, Issue 11. – P. 1420-25.
265. Zuk, P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian et al. // *Mol Biol Cell.* – 2002. – Vol. 13. – P. 4279-95.
266. Zwi-Dantsis, L. Derivation and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells from heart failure patients / L. Zwi-Dantsis, I. Huber, M. Habib, et al. // *Eur Heart J.* – 2012. – Vol. 34, Issue 21. – P. 1575-86.