

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Антошин Артем Анатольевич

**Биодеградируемые матрицы на основе фибриллярного коллагена для
аугментационной уретропластики**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Тимашев Петр Сергеевич

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Структурно-функциональные свойства мужской уретры	19
1.2. Виды уретропластик	21
1.3. Матрицы для уретропластики	23
1.3.1. Фиброин	23
1.3.2. Бактериальная целлюлоза	26
1.3.3. Полилактид и сополимеры	27
1.3.4. Полиуретан	29
1.3.5. Децеллюляризованные коллагеновые матрицы	31
1.3.6. Реконструированные коллагеновые матрицы	34
1.4. Технология электрофоретического осаждения	37
1.5. Тканеинженерные конструкторы в уретропластике	39
1.6. Биопечать уретры	41
1.6.1. Применение сфероидов для биопечати тканеинженерных конструкторов уретры	42
1.7. LIFT-биопечать для формирования тканеинженерных конструкторов	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Общий дизайн исследования	48
2.2. Получение фибриллярной суспензии коллагена	49
2.3. Производство коллагеновых матриц	50
2.3.1. ЭФО-ППБ матрицы	50
2.3.2. Янус-матрицы	52
2.4. Клетки для экспериментов <i>in vitro</i>	53
2.5. Эксперименты на животных	53
2.5.1. Подкожная имплантация	53
2.5.2. Аугментационная уретропластика	55
2.6. LIFT-биопечать	59

2.6.1. Конструкция установки для LIFT	59
2.6.2. Приготовление биочернил	62
2.6.3. Формирование сфероидов.....	62
2.7. Анализ коллагеновой суспензии	63
2.7.1. Фазово-контрастная микроскопия	63
2.7.2. Атомно-силовая микроскопия.....	63
2.7.3. Характеризация фибрилл.....	64
2.7.4. Определение электрофоретической подвижности	64
2.7.5. Электрофорез	64
2.8. Анализ коллагеновых матриц.....	65
2.8.1. Выход электрофоретического осаждения	65
2.8.2. Индекс сшивки.....	65
2.8.3. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье	66
2.8.4. Набухаемость	66
2.8.5. Температура сваривания	67
2.8.6. Механические свойства	67
2.8.7. Сканирующая электронная микроскопия	68
2.8.8. Измерение остаточной ДНК	68
2.8.9. Плотность матриц.....	68
2.9. Анализ биосовместимости матриц in vitro	69
2.9.1. Экстракционный тест	69
2.9.2. Контактная цитотоксичность	69
2.9.3. Морфологическое исследование клеток	70
2.10. Анализ имплантационного материала.....	71
2.10.1 Гистологическое исследование	71
2.10.2. Иммуногистохимическое исследование.....	71
2.10.3. Морфометрия	72
2.11. Анализы в рамках LIFT-биопечати.....	73
2.11.1. Реологические испытания.....	73
2.11.2. Выживаемость сфероидов	73

2.11.3. Распластывание сфероидов	74
2.11.4. Гистологический анализ	74
2.12. Статистическая обработка	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	75
3.1. Коллагеновые матрицы ЭФО-ППБ.....	75
3.1.1. Анализ экстрагированного коллагена	75
3.1.2. Производство коллагеновых матриц	77
3.1.3. Микроструктурные и механические свойства	81
3.1.4. Биосовместимость <i>in vitro</i>	85
3.1.5. Подкожная имплантация матриц	89
3.2. Янус-матрицы	97
3.2.1. Характеристика Янус-матриц.....	97
3.2.2. Аугментационная уретропластика с применением Янус-матриц.....	99
3.3. Создание модельного ТИК уретры	114
3.3.1. Подбор параметров биопечати	114
3.3.2. Биопечать сфероидов	117
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	120
4.1. Ограничения исследования и дальнейшая работа.....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	132
ВЫВОДЫ	135
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	137
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Стриктура уретры – это распространенное урологическое заболевание, выявляемость которого у мужчин колеблется от 200 до 1200 на 100 000 населения в различных странах, и этот показатель зависит от множества факторов: возраст, наличие хронических заболеваний, вредных привычек и т. д. [1]. Лечение стриктур уретры чаще всего хирургическое и осуществляется путем проведения стандартных операций по уретропластике. Одной из наиболее распространенных уретропластик является аугментационная, при которой выполняется увеличение стриктурированного просвета мочеиспускательного канала с использованием трансплантата [2].

Чаще всего в качестве трансплантата используется слизистая щęki, реже используется кожа половых органов или другие аутооткани пациента. Однако в ряде случаев – например, при протяженных стриктурах, стриктурах после предшествующих аугментационных и заместительных уретропластик, стриктурах с выраженным спонгиозом – могут возникать трудности, связанные с дефицитом тканей в донорской зоне для выполнения аугментационной уретропластики [3]. Кроме того, использование аутологичных тканей для аугментационной уретропластики сопряжено и с другими недостатками: септическими осложнениями в донорской зоне, временными затратами на забор трансплантата/лоскута, морфологическим несоответствием донорской ткани [3, 4].

Чтобы избежать этих осложнений, предпринимаются попытки внедрения альтернативных подходов для замещения суженной части просвета мочеиспускательного канала, например, при помощи матриц или тканеинженерных конструктов (состоящих из клеток и чаще всего имеющих матрицу в качестве основы) [5, 6]. Матрица представляет собой каркас, по которому после его имплантации будут нарастать собственные клетки пациента.

Важными характеристиками в дизайне матриц для уретропластики являются их состав, биосовместимость, биodeградируемость, механические свойства, структура, а также используемая для их производства технология [7]. Матрица должна быть удобной для произведения с ней манипуляций хирургом, прочной и устойчивой к механическим нагрузкам, которым она будет подвергаться в процессе ее прошивания хирургической нитью; после имплантации она не должна вызывать иммунного отторжения; процесс ее биodeградации должен совпадать с темпами прорастания на это место собственной ткани реципиента; по мере биodeградации в ее структуру должны прорасти сосуды, и при этом темп неоангиогенеза должен быть достаточным для того, чтобы предотвратить гибель клеток (если она ими была предварительно заселена); технология ее получения должна быть проста, надежна и масштабируема до серийного производства в целях клинической трансляции.

Для уретропластики было предложено огромное количество различных матриц, и их можно поделить на два вида: небиodeградируемые и биodeградируемые. Применение матриц первого вида не увенчалось успехом в исследованиях [8, 9]. Основными осложнениями при их применении была кальцификация и образование камней, гематурия, формирование фистул, отсутствие прорастания сосудов, а также постимплантационная контрактура матрицы до 50% от ее изначальной длины. Поэтому внимание современных исследований сместилось в сторону разработки биodeградируемых матриц.

Биodeградируемые матрицы могут быть получены на основе как натуральных, так и синтетических полимеров. В сравнении с матрицами из натуральных веществ синтетические имеют ряд преимуществ, таких как: высокие прочностные (механические) характеристики, стабильность и воспроизводимость свойств, а также зачастую более низкая цена. Примерами синтетических биodeградируемых полимеров, из которых производятся медицинские изделия, являются полилактоны: полимолочная кислота (ПМК), полигликолевая кислота (ПГК), поликапролактон (ПКЛ), а также их сополимеры [7, 10]. Тем не менее главным их недостатком является ограниченная биосовместимость, поскольку

они не имеют специфических доменов для связывания с клетками и их белками и часто являются гидрофобными [11], что делает их адгезивность и способность модулировать клеточный ответ, подавая необходимые сигналы, довольно низкой [12].

Матрицы на основе натуральных полимеров обычно получают при помощи обработки природных тканей или методами биосинтеза [13]. В целом натуральные биоматериалы предпочитают больше синтетических, поскольку они обладают специфическими пептидными последовательностями (например, интегриновыми) и структурой поверхности, которые могут способствовать клеточному росту и дифференцировке, а также индуцировать процесс ангиогенеза [14]. Однако недостатком большинства таких материалов являются их неудовлетворительные механические свойства [3].

Наиболее перспективными матрицами из биodeградируемых натуральных полимеров, пригодных для уретропластики, являются матрицы на основе коллагена [15]. Преимуществами коллагена являются его полная биосовместимость, регулируемая и прогнозируемая биodeградация, высокая адгезивная способность, приемлемые механические свойства, а также наличие обусловленных природой прорегенеративных свойств [16]. Коллаген и матрицы на его основе наиболее часто применяются для целей уретропластики у людей, поскольку коллаген одним из первых среди других биоматериалов был разрешен к клиническому применению [17, 18].

С целью улучшения результатов лечения стриктур уретры в сложных случаях (например, заместительной уретропластики) ряд исследователей сообщал о необходимости нанесения на матрицы клеточного компонента для создания тканеинженерных конструкторов (ТИК) [18]. ТИК за счет клеточного компонента более похож по структуре на нативную ткань и поэтому может лучше интегрироваться с окружающими тканями и выполнять специфические функции (в случае уретры – барьерную) [19]. Создание ТИК, максимально схожего с нативной тканью, возможно методом высокоточного нанесения клеточного компонента с высокой выживаемостью – биопечатью [20].

В последние годы для нанесения клеток с целью создания ТИК методами биопечати набирает популярность использование клеточных сфероидов [21, 22]. Клеточные сфероиды имеют ряд преимуществ перед традиционным использованием 2D-клеточных слоев или суспензий, поскольку они позволяют добиться большей структурной схожести с нативной тканью: лучше имитируют естественное 3D-микроокружение, характерное для *in vivo* условий, а также имеют большую плотность, преформированные клеточные контакты и функциональность [23]. Например, при создании ТИК уретры применение 3D-эпителиальных сфероидов вместо 2D-культур позволяет избежать эпителиально-мезенхимального перехода клеток и сохранить барьерную функцию ТИК, играющую важнейшую роль в предотвращении вторичного структурирования [24].

Степень разработанности темы

В общем, способы получения матриц на основе коллагена для уретропластики можно разделить на две категории. Первая категория – получение матриц в результате децеллюляризации нативных тканей, таких как подслизистые тонкой кишки и мочевого пузыря, перикард, кожа [18]. Несмотря на то, что такие матрицы обладают естественной структурой и биоактивностью, возможности модификации их свойств сильно ограничены [25]. Размеры, плотность, структура и биохимический состав этих матриц могут быть искусственно изменены до необходимых значений в очень ограниченном диапазоне, поскольку они определяются свойствами исходной ткани, которая вследствие естественной изменчивости дополнительно обуславливает вариабельность данных параметров от партии к партии [26–29]. В свою очередь вариабельность свойств матриц и отсутствие их стандартизации может вызвать и высокую вариабельность в успешности лечения стриктур уретры, что является неприемлемым для массового клинического применения [18].

Кроме того, одним из острых вопросов при децеллюляризации тканей является наличие остаточных антигенов в структуре материала [30], которые могут вызвать воспаление и фиброз окружающих тканей уретры после имплантации [31]. Все это существенно сужает поле для создания матриц с оптимально заданными и стандартизованными свойствами, необходимыми для лечения стриктур уретры.

Ко второй категории способов получения матриц на основе коллагена для уретропластики относятся различные подходы к его реконструкции [17, 18]. Реконструкция коллагена позволяет получить больше контроля над финальными свойствами матриц и стандартизировать их, а также минимизировать антигенность получаемого продукта, однако реконструктивный подход также не лишен недостатков. Например, сушка на воздухе [32] является довольно длительным процессом [33, 34], а при высоких температурах она способна гидролизовать коллаген [35–37]; лиофильная сушка растворов коллагена [38] приводит к неудовлетворительным механическим свойствам финального продукта [39,40]; электроспиннинг [41] использует потенциально токсичные растворители и также производит материалы с неудовлетворительными механическими свойствами [42, 43].

Неудовлетворительные структурно-механические свойства реконструированных коллагеновых матриц могут представлять трудности для манипулирования хирургом [32], а также являться причиной развития дивертикулов в области имплантации [38]. Вследствие этого исследователями продолжается поиск оптимальных технологий реконструкции коллагена, позволяющих получить матрицы с приемлемыми для уретропластики свойствами [15]. Одной из таких технологий может стать электрофоретическое осаждение (ЭФО) [44]. ЭФО позволяет изготавливать коллагеновые матрицы с необходимыми размерами, структурой и химическим составом воспроизводимым и строго контролируемым способом. Кроме того, ЭФО может быть масштабировано для крупносерийного производства матриц, что крайне важно для их дальнейшей клинической трансляции [45]. Тем не менее одной из главных

проблем ЭФО является инкорпорирование пузырьков газа в структуру осаждаемых матриц при достижении определенного порога напряжения (>3 В), что существенно ухудшает их механические свойства [46]. С другой стороны, повышение напряжения необходимо для увеличения плотности упаковки коллагена, увеличения толщины получаемых матриц и их прочности с целью хирургического применения [44, 47]. Несмотря на то, что полученные при помощи ЭФО коллагеновые матрицы были испытаны *in vitro* для восстановления сосудов [46] и роговицы [48], *in vivo* – кожи [49], в литературе их применения для нужд уретропластики описано не было. В частности, это связано с недостаточной механической прочностью и дефектностью получаемых традиционным способом ЭФО матриц [47].

В данном исследовании нами впервые была разработана уникальная технология электрофоретического осаждения с применением полупроницаемого барьера (ЭФО-ППБ). Технология ЭФО-ППБ позволила решить проблему инкорпорирования пузырей при использовании относительно высоких для этого процесса напряжений (60 В) и получить бездефектные механически прочные матрицы на основе коллагена для хирургического применения – уретропластики. При этом для создания матриц нами был использован фибриллярный коллаген как его наиболее механически прочная форма с максимально сохранной нативной структурой [50–52].

Более того, за счет дополнительной постобработки (механическая перфорация, лиофилизация) матрицы приобрели Янус-структуру (в честь двуликого бога Януса). Одна их сторона становилась перфорированной и доступной для врастания соединительной ткани с сосудами, способствуя более быстрой биоинтеграции импланта. Другая сторона оставалась сплошной – она выполняла барьерную функцию, предотвращая просачивание мочи, и по ней нарастал уротелий. Такой дизайн матриц является оптимальным с точки зрения разработки импланта для уретропластики [53].

В данной работе мы впервые разработали технологию биопечати жизнеспособных клеточных сфероидов на Янус-матрицу при помощи лазерно-

индуцированного прямого переноса (LIFT, от англ. laser-induced forward transfer) и создали модельный тканеинженерный конструкт уретры. Модельным он назван по причине использования сфероидов из мезенхимальных стромальных клеток (МСК). МСК не являются основными клетками стенки уретры, однако они служат удобной моделью для валидации новых способов и модификаций биопечати [54].

В сравнении с другими методами биопечати LIFT обладает одним из самых высоких потенциалов к переносу сфероидов за счет отсутствия сопла и его негативного воздействия на выживаемость клеток, скорости и точности биопечати, позволяющей переносить клетки (их агрегаты или сфероиды) с максимальной плотностью, что крайне важно для создания ТИК с максимально природоподобной структурой [55].

Впервые LIFT был использован для переноса сфероидоподобных структур (микробусин) из мышечных эмбриональных стволовых клеток Phamduy и др. [56]. В дальнейшем и другие исследователи применяли LIFT для упорядоченного переноса микробусин в определенных геометрических паттернах [57, 58]. Однако такие микробусины были сформированы путем погружения альгинатных микрокапель, содержащих клетки, в раствор CaCl_2 , что не соответствует формированию «настоящих» 3D-клеточных сфероидов, применяемых в современных подходах к биофабрикации для создания тканей и органов [59]. Следовательно, перенос клеточных сфероидов является одной из основных проблем LIFT-биопечати, которая до сих пор не была решена [60, 61].

Цель исследования

Целью настоящей работы является создание тканеинженерного конструкта уретры на основе механически прочных коллагеновых Янус-матриц для аугментационной уретропластики.

Задачи исследования

1. Разработать технологию электрофоретического осаждения бездефектных коллагеновых матриц из фибриллярного сырья.
2. Проанализировать структурные и механические свойства коллагеновых матриц.
3. Определить биосовместимость коллагеновых матриц *in vitro* и *in vivo*.
4. Разработать способ модификации коллагеновой матрицы для получения Янус-матрицы.
5. Испытать Янус-матрицу на модели аугментационной уретропластики.
6. Разработать технологию биопечати клеточных сфероидов на Янус-матрицу для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры.

Научная новизна

1. Впервые разработана технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером для производства механически прочных бездефектных матриц из фибриллярной суспензии коллагена.
2. Впервые из электрофоретически осажденных коллагеновых матриц получены Янус-матрицы, которые доказали свою эффективность в качестве трансплантата для аугментационной уретропластики.
3. Впервые разработана технология биопечати клеточных сфероидов при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса с Пи-шейпером для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная методика ЭФО-ППБ продемонстрировала высокий потенциал для производства коллагеновых матриц, которые могут быть использованы в хирургии. Полученные этим способом коллагеновые матрицы

могут найти широкое применение в областях урологии, травматологии и ортопедии, общей хирургии, стоматологии, офтальмологии, колопроктологии, урологии и ЛОР. Данное диссертационное исследование, в частности, имеет высокое практическое значение для развития методики уретропластики с использованием передовых технологий регенеративной медицины, использующих коллагеновые тканеинженерные матрицы в качестве трансплантатов как альтернативу традиционному методу лечения стриктур уретры с помощью буккального трансплантата.

Тканеинженерный конструкт уретры, полученный при помощи разработанного метода LIFT-биопечати, может применяться для сложных случаев уретропластики, где применение клеточных конструктов имеет большой шанс успеха. Более того, разработанный способ LIFT-биопечати универсален и открывает широкие возможности для создания других ТИК тканей и органов (кожи, печени, сердца, сосудов). Еще одной из наиболее перспективных точек приложения LIFT-биопечати сфероидами является создание органов (платформ) на чипе. Такие устройства могут быть применены как с точки зрения фундаментальной науки и изучения клеточных взаимодействий, так и практически – в фармацевтической индустрии для скрининга лекарств.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения диссертационной работы был использован комплекс физико-химических, цитологических и гистологических методов исследования:

1. Выделение фибриллярной суспензии коллагена из животного сырья методом кислотной экстракции с механической обработкой.

2. Характеризация полученной суспензии методами фазово-контрастной и атомно-силовой микроскопий; определение электрофоретической подвижности фибрилл путем измерения дзета-потенциала; определение молекулярного состава суспензии методом гель-электрофореза.

3. Получение коллагеновых матриц методом электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером.

4. Исследование структуры и состава коллагеновых матриц с помощью сканирующей электронной микроскопии, ИК-Фурье спектроскопии, измерения толщины и массы, температуры сваривания.

5. Изучение механических матриц свойств с помощью разрывной машины (модуль Юнга, деформация при разрыве, предел прочности).

6. Определение биосовместимости матриц *in vitro*: культивирование человеческих МСК и мышечных фибробластов линии 3T3 на матрицах, оценка их жизнеспособности и метаболической активности с помощью флуоресцентной микроскопии и флуориметрии.

7. Оценка биосовместимости коллагеновых матриц *in vivo* на модели подкожной имплантации у крыс методами гистологического, иммуногистохимического и морфометрического анализа.

8. Создание коллагеновых Янус-матриц методом механической перфорации и лиофилизации.

9. Оценка регенеративного потенциала Янус-матриц на модели аугментационной уретропластики у кроликов методами гистологического, иммуногистохимического и морфометрического анализа.

10. Перенос жизнеспособных клеточных сфероидов при помощи метода LIFT-биопечати с Пи-шейпером на гидрогелевую основу и на Янус-матрицы для формирования модельного ТИК уретры.

11. Характеризация свойств биочернил при помощи реометрии.

12. Оценка жизнеспособности клеточных сфероидов после биопечати методом фазово-контрастной, флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в разработке метода электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером, а также LIFT-

биопечати клеточных сфероидов. Автор принимал участие в биологических экспериментах *in vitro* и имплантационных экспериментах *in vivo*; самостоятельно планировал и проводил эксперименты по физико-химической характеристике коллагеновых матриц, обрабатывал и интерпретировал результаты, представлял и апробировал результаты исследований на конференциях, подготавливал научные публикации по выполненной работе, осуществлял написание текста диссертации.

Положения, выносимые на защиту

1. Технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером позволяет производить механически прочные фибриллярные коллагеновые матрицы с высоким модулем упругости (7–64 МПа) и растяжением на разрыв (24–60%) в зависимости от химической сшивки.

2. Произведенные коллагеновые матрицы являются биосовместимыми *in vitro* для клеток (выживаемость >70%) и *in vivo* при подкожной имплантации. На 21-й день после имплантации сшитые матрицы резорбируются в 3,5 раза медленнее несшитых и вызывают профибротический ответ.

3. Янус-матрицы, полученные из несшитых матриц, могут применяться для аугментационной уретропластики у кроликов. Янус-матрицы способствуют полной эпителизации дефекта к 45-му дню после операции, отсутствию рубцевания и стриктурирования на 180-й день наблюдения.

4. Биопечать при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса позволяет наносить клеточные сфероиды на Янус-матрицы для создания модельного тканеинженерного конструкта уретры с высокой выживаемостью (95%).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия, в том числе следующим направлениям

исследований согласно пунктам: 10 (создание заменителей органов и тканей); 18 (выращивание методами регенеративной медицины органов и тканей для компенсации утраченных или компенсации их пониженных физиологических функций).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований: в физико-химических и биологических испытаниях было проанализировано не менее 5 образцов в каждой исследуемой группе; в эксперименте подкожной имплантации участвовало 20 крыс, аугментационной уретропластики – 18 кроликов, что является достаточным для получения достоверных данных. Достоверность результатов подтверждается также применением современных методов исследования, использованием сертифицированного научного оборудования и реактивов, строгим следованием общепризнанным исследовательским протоколам, статистической обработкой полученных данных с использованием современных методов количественной статистики и применением сертифицированных компьютерных программ.

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на 18-ой Международной конференции «Оптика Лазеров» (2018, Санкт-Петербург), Научной конференции «Клиническая медицина и фармация – 2021» (Харбин), VI Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (2021, Москва), XI Международной конференции по фотонике и информационной оптике (2022, Москва), Семинаре «Современные тренды в биофотонике 2023» (Нижний Новгород), Международном симпозиуме регенеративной медицины «Хронические и дегенеративные заболевания» (2022, Тегеран), VI Международной конференции «Актуальные проблемы регенеративной медицины и имплантологии. 3D-принтинг и 3D-биопринтинг» (2022, Ставрополь). Также по результатам разработки технологии LIFT автор стал

лауреатом премии Правительства Москвы молодым ученым за 2021 год в области разработок для биотехнологий.

Апробация диссертации состоялась на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 8 от 21.08.2023.

Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения №075-15-2021-596.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 10 научных работ, в том числе 6 статей в международной базе данных Scopus; 1 иная публикация по теме диссертационного исследования; 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) для преподавания образовательных курсов: «3D принтинг», «Биопечать», «Введение в регенеративную медицину». Результаты исследования были приняты к внедрению в промышленное производство коллагеновых биоматериалов ЗАО «Зеленая дубрава».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц, 45 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, четыре стандартные главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и обсуждение), заключение, выводы, практические рекомендации, список использованных сокращений и список литературы (260 источников: 3 отечественных и 257 иностранных).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональные свойства мужской уретры

Поскольку мужской пол страдает стриктурами уретры значительно чаще женского и эта проблема является более актуальной и исследованной у мужчин [62], то в данном литературном обзоре будут рассматриваться анатомические особенности мужской уретры [3].

Уретра представляет собой полую трубку, берущую начало от мочевого пузыря и заканчивающуюся наружным отверстием мочеиспускательного канала. Как видно из Рисунка 1А, уретру можно разделить на четыре части, исходя из наименования тех анатомических структур мочеполовой системы, через которые она проходит, – простатическую, мембранозную, бульбозную и пенильную. Простатическая и мембранозная части уретры составляют так называемую заднюю уретру. При этом мембранозная часть уретры окружена наружным сфинктером, отвечающим за произвольное мочеиспускание и способным выдерживать внутрипросветное давление мочи до 100 см Н₂О. Передняя уретра представлена бульбозной и пенильной частями и окружена губчатым телом, богатым сосудами, питающими уретру. Гистологически стенку уретры и периуретральных тканей в ее пенильной части можно разделить на 5 частей: эпителиальная выстилка, собственная пластинка, губчатое тело, белочная оболочка и фасция Бука [63–65]. На Рисунке 1Б представлен гистологический срез части стенки уретры в области ее эпителиальной выстилки, собственной пластинки и начальной части губчатого тела.

Эпителий в зависимости от части уретры может быть переходным (простатическая и мембранозная части), многорядным цилиндрическим (бульбозная и пенильная части), а также многослойным плоским неороговевающим (в ладьевидной ямке).

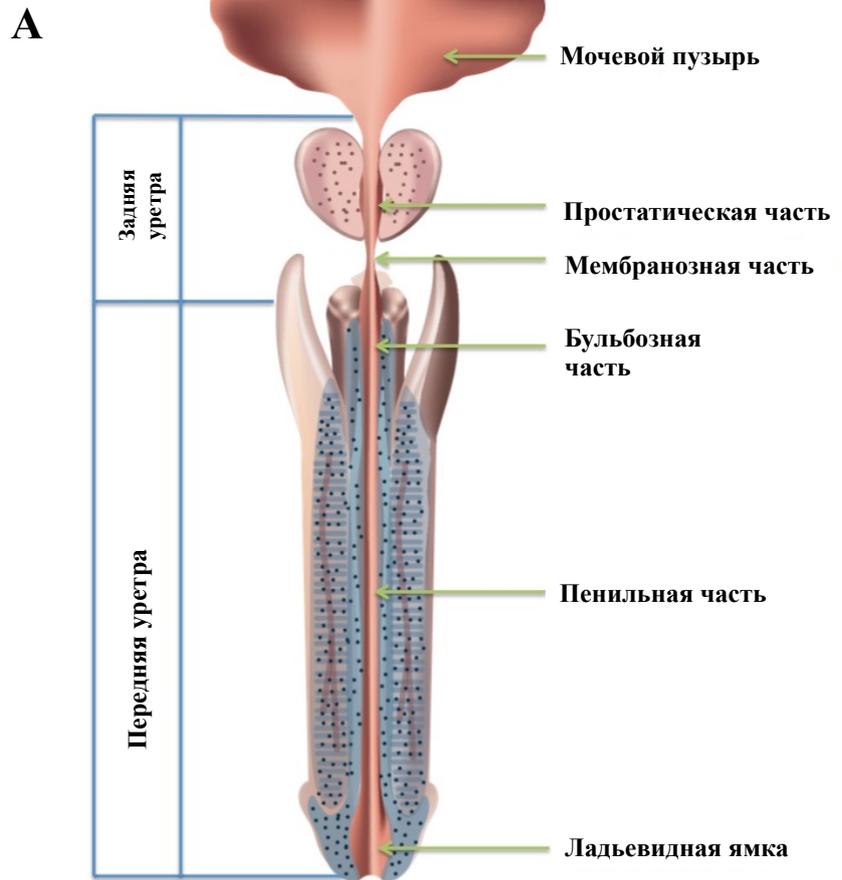


Рисунок 1 – Анатомические отделы уретры (А) и гистологическое строение ее стенки в области пенильной части (Б). Материалы адаптированы из источника [66]

Собственная пластинка эпителия (иногда в литературе ее объединяют с подслизистой основой или называют подслизистой основой [67]) представляет собой слой рыхлой волокнистой и эластической ткани, представленной коллагенами I и III типа, гликозаминогликанами и эластином [68, 69]. Губчатое тело состоит из широко взаимосвязанных сосудистых пространств различного калибра, разделенных трабекулами. Эти сосудистые пространства выстланы эндотелиальными клетками и окружены тонким слоем гладкомышечных волокон. Вместе с кавернозными телами они обеспечивают эректильную функцию полового члена, а также препятствуют сдавливанию уретры во время эрекции.

Белочная оболочка представляет собой толстую оболочку из частично гиалинизированных коллагеновых волокон, покрывающих губчатое и пещеристые тела. Белочная оболочка слабо васкуляризована, и через нее проходят лишь несколько ветвей огибающих сосудов.

Фасция Бака – это хорошо развитая и непрерывная фиброваскулярная оболочка, покрывающая не только губчатое тело, но и кавернозные тела полового члена. Она состоит из рыхлой соединительной ткани с множественными кровеносными сосудами и периферическими нервными пучками.

1.2. Виды уретропластик

Выделяют три основных вида уретропластики [70]:

- резекция с анастомозом «конец в конец» (Рисунок 2А);
- аугментационная уретропластика (Рисунок 2Б);
- заместительная уретропластика (Рисунок 2В).

При резекции уретры с анастомозом «конец в конец» выполняется полное удаление поврежденного рубцовыми изменениями участка уретры с периуретральными тканями и последующим наложением анастомоза между здоровыми участками мочеиспускательного канала. Важно проведение анастомозирования без создания натяжения между сшиваемыми концами мочеиспускательного канала во избежание последующей ишемии тканей и

вторичного стриктурирования. Рекомендуется выполнять при стриктурах уретры в бульбозном, простатическом и мембранозном отделах при протяженности стриктур менее 2 см.

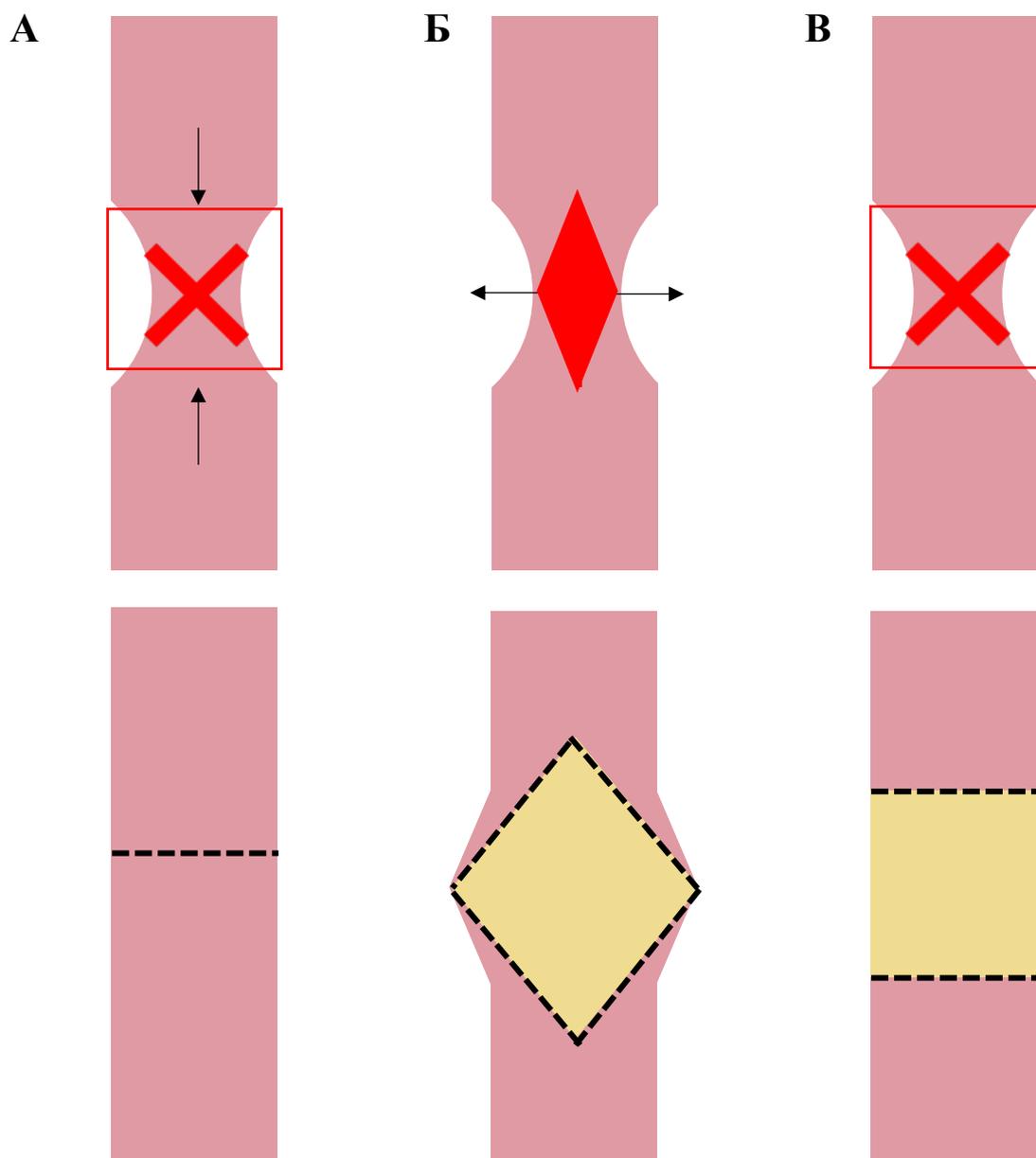


Рисунок 2 – Виды уретропластик. А – пластика с анастомозом «конец в конец»,
Б – аугментационная уретропластика, В – заместительная уретропластика

При аугментационной пластике выполняют иссечение суженного участка уретры и последующее увеличение просвета мочеиспускательного канала с использованием трансплантата или лоскута. Аугментационную уретропластику рекомендуется проводить при стриктурах пенильного отдела уретры, причем трансплантат фиксируют также к белочной оболочке пещеристых тел.

При заместительной уретропластике выполняется полное удаление поврежденного участка уретры с последующим формированием нового сегмента уретры за счет трансплантата (проводится, как правило, в несколько этапов).

1.3. Матрицы для уретропластики

Существующие тенденции тканевой инженерии и материаловедения предполагают не только создание матриц на монокомпонентной основе, но и комбинированное применение различных биоматериалов для улучшения биологических и физико-химических свойств получаемых матриц [71]. Например, натуральные биополимеры часто комбинируются с синтетическими для синергии биологических и механических эффектов соответственно; в то же время натуральные биополимеры могут комбинироваться между собой, дополняя производимые биологические эффекты друг друга; синтетические полимеры также комбинируют между собой для повышения биосовместимости, биоинтегративного потенциала и регулировки биodeградационных свойств [72].

Все это делает затруднительной четкую категоризацию исследований по принципу используемого биоматериала для создания матрицы: в одном исследовании могут быть использованы не только комбинации одного биоматериала с другими в его составе, но и в принципе сравниваться матрицы и тканеинженерные конструкции с совершенно разным составом [73]. Далее в обзоре литературы принцип систематизации и категоризации исследований на основе используемой матрицы будет основан на том, какой биоматериал в составе матрицы авторы ставят в центр своего исследования и уделяют его свойствам больше всего внимания.

1.3.1. Фиброин

Фиброин является натуральным биополимером с удовлетворительными механическими свойствами, хорошей клеточной биосовместимостью и

контролируемой биодegradацией. Фиброин разрешен к использованию в медицинских целях организацией FDA (Food and Drug Administration, рус. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) в качестве шовного материала, однако он также широко используется и для целей тканевой инженерии [74].

В исследовании Algarrahi и др. [75] была использована матрица на основе фиброина с бислойной (Янус) структурой, в которой одна сторона была более плотной и способствовала нарастанию на нее эпителия, а другая сторона была пористой и способствовала прорастанию в нее сосудов со стороны губчатого тела. Через 3 месяца после уретропластики наблюдалось частичное морфологическое восстановление стенки уретры на месте импланта исходя из экспрессии цитокератинов, α -SMA, и белка NF200. Тем не менее ее диаметр увеличился всего до 80% от изначального просвета, и такую регенерацию нельзя назвать полноценной.

Фиброин, несмотря на биосовместимость, не обладает специфическими структурными доменами, отвечающими за подачу сигналов клеткам млекопитающих и их адгезию. Вследствие этого исследователями предпринимаются различные подходы по его комбинации с биоактивными материалами, например, децеллюляризованными тканями животных. Один из способов повышения биосовместимости и улучшения результатов с использованием фиброиновых матриц был предложен Сао и др. [76]. В данном исследовании также была использована матрица с Янус-структурой: к плотному слою фиброина, полученному при помощи электроспиннинга, добавляли при помощи лиофилизации налитого на него раствора внеклеточный матрикс мочевого пузыря (ВММП) или коллаген 1-го типа (для создания пористой части матрицы). В отличие от исследования Algarrahi и др. полученную матрицу предварительно пришивали к брюшине на 2 недели для преваскуляризации и улучшения ее биоинтеграции после имплантации в уретру. Такой подход позволил через 3 месяца добиться полного сохранения просвета уретры после имплантации Янус-конструктов на основе фиброина и ВММП, однако

конструкты из фиброина с коллагеном показали неудовлетворительные результаты, приводя к полному стриктурированию просвета уретры.

В исследовании Fan и др. [77] также создавался Янус-имплант из фиброина и ВММП. При этом ВММП использовался в качестве механически прочной и биосовместимой основы, на которую наносилась при помощи электроспиннинга смесь из фиброина и хитозана. Полученный конструкт обладал, помимо структурной схожести со стенкой уретры, также антибактериальными свойствами в отношении *S. aureus* и *E. coli* вследствие добавления хитозана. Имплантация *in vivo* проводилась в два этапа: подкожная имплантация для превакуляризации на один месяц и последующая ортотопическая имплантация конструкта в уретру. Через месяц после имплантации в уретру матрица была покрыта эпителием, в нее прорастали сосуды и наблюдалось минимальное количество воспалительных клеток, что свидетельствует о ее отличной биосовместимости. Тем не менее авторы не приводят статистики по наличию/отсутствию стриктур на исследуемый срок, а также не уточняют количества животных, на которых был проведен эксперимент.

Фиброин также комбинировался в исследовании Lv и др. [78] с кератином и желатином для улучшения биомеханических и биологических свойств. Отличительной особенностью данного исследования являлось внедрение в матрицу частичек пероксида кальция как кислородогенерирующего субстрата, способного регулировать газообмен клеток на матрице. Такой состав матриц позволил поддерживать постоянное высвобождение кислорода в течение двух недель *in vitro*, при этом повышая пролиферативную активность засеянных на него гладкомышечных клеток. Через 6 месяцев после имплантации этих матриц у животных не наблюдалось процессов стриктурирования или каких-либо других осложнений, что было сопоставимо с результатами для группы позитивного контроля (подслизистой тонкой кишки, используемой в качестве золотого стандарта в уретропластике [79]).

1.3.2. Бактериальная целлюлоза

Другим натуральным биополимером, который использовался в доклинических испытаниях, являлась бактериальная целлюлоза (БЦ). В отличие от фиброина, сроки рассасывания которого составляют от 2 до 6 месяцев [78], бактериальная целлюлоза не деградирует и покрывается после имплантации фиброзной капсулой, как и любое инородное тело [80].

В исследовании Yang и др. [81] бактериальная целлюлоза подвергалась двойной обработке – лазерной перфорации и селективной оксидации для придания биodeградационных свойств, а также покрывалась изолятом соевого белка для повышения биосовместимости. Созданная матрица на основе модифицированной БЦ через месяц после имплантации способствовала регенерации стенки уретры, статистически значимому приросту коллагеновых волокон на месте имплантации в сравнении с контрольными группами и не вызвала иммунного воспалительного ответа. Просвет восстановленной уретры был гладким и бездефектным. В то же время немодифицированный имплант на основе БЦ (контрольная группа) не рассасывался и был покрыт неорганическим слоем осевших из мочи солей, а количество слоев выросшего эпителия было существенно меньше, чем в экспериментальной группе.

В исследовании Zhu и др. [82] также использовалась модифицированная целлюлоза: она подвергалась механической перфорации и сульфированию для улучшения адгезивности и биodeградации. Для улучшения постимплантационных результатов созданную матрицу заселяли также двумя типами мезенхимальных стромальных клеток (МСК), один из которых был модифицирован для экспрессии большего количества рецепторов фактора роста фибробластов-2 (FGFR2) и последующего высвобождения проангиогенных факторов. Действительно, группа модифицированных матриц БЦ, заселенных этим типом мезенхимальных клеток, показала наилучший результат: 100% эпителизацию, биodeградацию матрицы, отсутствие стриктур и смертей животных через 3 месяца наблюдения.

В некоторых исследованиях утверждается, что допустимо использование небиodeградирующих форм БЦ при условии заселения матриц эпителиальной выстилкой [83]. Так, в исследовании Huang и др. [84] были использованы матрицы из немодифицированной БЦ: как в форме обычной плотной мембраны, получаемой при стандартных способах культивирования *Acetobacter xylinum*, так и в форме 3D-пористых структур, если в питательной среде при культивировании содержался желатин. Сравнивали матрицы из непористой БЦ, пористой БЦ, а также пористой БЦ, заселенной лингвальными кератиноцитами. Спустя 3 месяца после имплантации в первых двух группах наблюдались стриктуры и была отмечена невысокая плотность сосудов (исходя из экспрессии CD31) и гладкомышечных волокон (исходя из синтеза α -SMA), в то время как у последней группы стриктур не наблюдалось, а экспрессия CD31 и α -SMA была статистически значимо выше. Таким образом, авторы показали, что гипотеза о возможности имплантации небиodeградирующей матрицы с клетками при отсутствии формирования стриктур имеет право на существование.

1.3.3. Полилактид и сополимеры

L-полилактид (Л-ПЛА) – это полимер, одобренный FDA и Европейским союзом к медицинскому применению. Л-ПЛА имеет потенциал к использованию в регенеративной медицине в связи с приемлемой биосовместимостью, контролируемой биodeградацией и механическими свойствами. Существуют различные способы приготовления матриц на основе Л-ПЛА, такие как прядение, литье и горячее прессование. Однако ни один из этих методов не способен воспроизвести нативную структуру внеклеточного матрикса, а получаемые при этом матрицы слабоадгезивны и могут вызывать профибротический ответ [85].

В исследовании Song и др. [86] был применен инновационный метод по послойному формированию мембраны на основе Л-ПЛА со структурой, подобной нативному внеклеточному матриксу человека, с помощью аддитивных технологий. Подобная структура матрицы не оказала негативного влияния на

уротелиальные клетки *in vitro* и обладала достаточными механическими свойствами для манипулирования хирургом: она удерживала натяжение хирургической нити с усилием до 2.0 Н, что в целом принято как приемлемое для хирургической имплантации биоматериала [87].

Через 3 месяца после имплантации кроликам успешность операции составила 83%, в то время как у контрольной группы с незакрытым дефектом стриктуры развились в 100% случаев. При этом на гистологическом исследовании наблюдались высокие уровни экспрессии цитокератинов в эпителии (при иммуногистохимическом окрашивании антителами АЕ1/АЕ3), а также отмечался неоангиогенез в импланте (исходя из окрашивания на CD31). Более того, данные матрицы были далее имплантированы 20 пациентам, и всего у 5 из них развились постоперационные вторичные стриктуры (успешность операции – 75%), что свидетельствует о высоком потенциале созданных матриц для уретропластики.

К методам прядения матриц из полилактида, как и из большинства других биоматериалов, для уретропластики относят электроспиннинг. Wang и др. [88] сравнили эффективность обычных матриц на основе Л-ПЛА, полученных электроспиннингом, а также заселенных мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани. Спустя 6 недель успешность операции с применением незаселенных клетками матриц составила 50%, в то время как матрицы с клетками (тканеинженерные конструкции) показали результат в 75% успешности. Незаселенные полилактидные матрицы привели к значительно большей воспалительной инфильтрации окружающих тканей, чем матрицы с клетками, а также медленнее эпителизировались. Полученные результаты свидетельствуют о том, что полилактид сам по себе способен вызывать иммунный ответ, и для минимизации этого эффекта для матриц важна структура, схожая с естественным внеклеточным матриксом тканей [86].

Авторы утверждают, что у заселенных клетками матриц наблюдалась гораздо более быстрая эпителизация по следующим причинам: МСК напрямую дифференцировались в уротелий, так как сокультивирование МСК и уротелия может приводить к дифференцировке первых *in vitro* [89]; МСК выделяли

специфические паракринные факторы, способствовавшие более быстрой миграции эпителия из здоровых участков и его более быстрой пролиферации. Кроме того, известно, что МСК обладают противовоспалительным действием [90], что объясняет меньшую воспалительную инфильтрацию заселенных клетками матриц.

Интересно, что предыдущие исследования использовали аугментационные техники для уретропластики у животных. В исследовании Ни и др. [91] была предпринята попытка создать тубулярную матрицу на основе полилактида-ко-гликолида (ПЛГ) или его комбинации с желатином методом электроспиннинга для заместительной уретропластики. Эта задача является гораздо более сложной по сравнению с созданием «заплаточных» матриц для аугментационной уретропластики как с технологической, так и с биологической точки зрения, поскольку приживаемость и результаты имплантации тубулярных матриц всегда хуже [92]. Созданная матрица обладала достаточными механическими характеристиками, удерживала натяжение хирургической нити около 4.0 и 6.0 Н (для ПЛГ и ПЛГ с желатином соответственно), а также была биосовместима с уротелиальными клетками *in vitro*, способствуя их адгезии и пролиферации. Тем не менее после имплантации собакам в 100% случаев на 3-й месяц развивалась стриктура у обеих типов матриц. Кроме того, периимплантационные ткани содержали большое количество воспалительного инфильтрата, а также не наблюдалось полной эпителизации поверхности матриц, особенно в их средней части. Авторы заключили, что матрицы на основе ПЛГ или ПЛГ с желатином не подходят для заместительной уретропластики и требуют доработки для снижения воспалительного ответа и улучшения эпителизации и васкуляризации.

1.3.4. Полиуретан

Полиуретаны – это широкий класс синтетических биоактивных биоматериалов, который привлекает исследователей биомедицины для создания тканеинженерных конструкторов. У полиуретана и его производных высокая

биосовместимость, регулируемые химические, механические и структурные свойства, а также они способны к биодegradации, что делает их отличной альтернативой натуральным биополимерам [93]. Особо стоит отметить способность полиуретанов к биодegradации: при подкожной имплантации матриц на их основе крысам сроки рассасывания составляли до 3 лет [94].

В целом такая особенность биодegradации полиуретанов нашла отклик и у исследователей, занимающихся тканевой инженерией уретры, где важно, чтобы матрица, помимо биосовместимости и адгезивности для клеток, как можно более длительно сохраняла барьерную функцию для предотвращения экстравазации мочевины и химического раздражения клеток стенки уретры с последующим формированием стриктуры [3].

В исследовании Wang и др. [95] был использован сополимер полиуретана-мочевины для получения пористых волоконных мембран методом электроспиннинга. Полученные матрицы также дополнительно покрывали коллагеном I типа для большей биосовместимости и адгезивности. Матрицы обладали отличной деформацией при разрыве (до 404%), а также высоким модулем Юнга (до 2 МПа), что сопоставимо и превосходит механические параметры нативной уретры [96]. Через три месяца в обеих группах с имплантированными полиуретановыми матрицами на месте импланта наблюдалась гладкая поверхность, покрытая эпителиальной выстилкой. Однако инцидентность стенозов уретры была выше в группе, где полиуретановая матрица не была покрыта коллагеном (успех операции был в 88% и 63% для покрытых и не покрытых коллагеном полиуретановых матриц соответственно), хотя гистологически разница в качестве регенерации стенки уретры у животных была незначительной. В отличие от контрольной группы (анастомоз «конец в конец»), где успешность операции была 0%, группы с применением матриц на основе полиуретана-мочевины показали хорошие результаты, и поэтому они могут быть рассмотрены для проведения дальнейших экспериментов по уретропластике.

В исследованиях от Niu и др. [97,98] был использован блок-сополимер на основе полиуретана, гидрофильного полиэтиленгликоля и гидрофобного

поликапролактона для создания матрицы с оптимальными физико-химическими, биомеханическими и биологическими свойствами. Изменяя технологию синтеза блок-сополимеров, можно внедрить в структуру полиуретана ряд биологически активных полимерных материалов с необходимыми параметрами для придания кастомизированных под определенные биомедицинские задачи свойств, в данном случае для уретропластики.

Матрицы в виде трубок на основе сополимера полиуретана получали методом электроспиннинга, а затем иерархично заселяли его нановолоконную структуру различными видами клеток: эпителиальными и гладкомышечными. При этом формировали трехслойную структуру, в которой внутренний слой был заселен эпителиальными клетками, а внешние – гладкомышечными клетками. Нановолоконные матрицы способствовали хорошей адгезии клеток, их направленному распластыванию и пролиферации, а также повысили экспрессию кератина в эпителиальных клетках и α -SMA в гладкомышечных клетках. Природоподобное иерархическое строение тубулярной матрицы позволило получить исследователям отличные результаты: через 3 месяца после уретропластики в экспериментальных группах не наблюдалось ни одного случая стеноза, в то время как в контрольной группе с использованием заселенной клетками матрицы на поликапролактоновой основе стриктура развилась у 100% животных. Подобные результаты с комбинацией блок-сополимера полиуретана с клетками делают его потенциальным кандидатом для дальнейшей клинической трансляции.

1.3.5. Децеллюляризованные коллагеновые матрицы

Среди коллагеновых матриц, используемых для уретропластики, наиболее часто используются децеллюляризованные ткани животных, такие как подслизистая основа тонкой кишки (ПОТК) и подслизистая основа мочевого пузыря (ПОМП). В результате *in vivo* экспериментов на животных было показано, что ПОТК обладает мощным прорегенеративным потенциалом, способствуя

клеточному росту и процессам ангиогенеза, сравнимыми с таковыми для имплантов на основе кожи и слизистых щеки [6, 99–101]. Несомненными преимуществами ПОТК также являются: средний срок биодеградации, составляющий от четырех до восьми недель и попадающий в окно полной эпителизации замещенного дефекта уретры [102]; механические свойства – высокая растяжимость и высокий предел прочности на разрыв [103].

Тем не менее результаты доклинических исследований с использованием ПОТК имеют довольно высокую вариабельность в плане успешности операций. Так, в исследовании Guo и др. [104] авторы сравнивали бесклеточные матрицы ПОТК с заселенными клетками в двух вариациях: с кератиноцитами, а также кератиноцитами и фибробластами. Успешность уретропластики после 24 недель наблюдения группы с использованием бесклеточной матрицы составила 71%, и при этом в месте восстановленного дефекта не наблюдалось непрерывной эпителизации, а сформированный эпителий имел мало слоев. Именно с недостаточной эпителизацией места дефекта авторы связывают низкий процент успеха операции. Моча смогла пройти через эпителиальный барьер в окружающие ткани, вызывая хроническое воспаление, что обусловило плохую васкуляризацию и прорастание гладкомышечных волокон в собственной пластинке эпителия и, как результат, появление стриктуры. В то же время успешность в группе с заселенными клетками имплантами на аналогичный срок была выше (до 88%), эпителий был более сформированным и многослойным, а васкуляризация места импланта была статистически достоверно более интенсивной.

В другом исследовании [105] авторы модифицировали структуру ПОТК при помощи 5% надуксусной кислоты с целью повышения ее микропористости и сравнили ее с немодифицированной версией. При использовании модифицированных матриц на основе ПОТК без клеток успешность операции по уретропластике составила 0%, и у всех кроликов на 24-й неделе развилась стриктура. В то же время заселение клетками имплантов (немодифицированных и модифицированных) повысило успешность операций до 100%, однако в группе с

немодифицированными матрицами ПОТК наблюдалось большее число осложнений: изъязвление кожных покровов в месте имплантации, а также образование фистул. Аналогичная статистика была приведена и в другом исследовании, где использовались заселенные уротелиальными клетками и бесклеточные матрицы на основе ПОТК [106]. В случае бесклеточных матриц успешность операции составила 0%, и осложнения развились у всех животных в исследуемой группе, в то время у группы с заселенными клетками матрицами стриктурирования не наблюдалось, хотя осложнения развились у половины из экспериментальных животных.

ПОМП также широко и успешно используется в качестве матриц для уретропластики [107–109], однако для этих матриц также характерна высокая вариабельность успешности операций. Так, в исследовании Chun и др. [108] на 12-й неделе после имплантации бесклеточных матриц ПОМП ни у одного из животных в экспериментальной группе не наблюдалось осложнений, и успешность составила 100% (так же, как и для матриц ПОМП, заселенных клетками). Тем не менее предзаселение ПОМП клетками имело эффект на гистологическом уровне: у заселенных матриц эпителий был более однородным и сформированным, имел характерную сосочковость, а количество гладкомышечных волокон было больше, что, возможно, может сказаться на меньшем риске возникновения стриктур при более продолжительных сроках наблюдения.

Однако в исследовании Li и др. [110] группа с имплантированной бесклеточной матрицей на основе ПОМП через 8 недель имела 100% стриктур у всех экспериментальных животных, в то время как заселение матриц клетками позволило получить диаметрально противоположный результат: ни у одного животного из этой группы не наблюдалось осложнений и признаков стриктурирования. В данном случае неудовлетворительный исход уретропластики можно объяснить сложностью операции: у животных проводилась заместительная уретропластика тубуляризованным конструктором на

основе ПОМП, отдаленные результаты проведения которой, как правило, хуже аугментационной уретропластики [111].

Все вышеперечисленные работы по применению децеллюляризованных матриц для уретропластики были выполнены в рамках доклинических испытаний. Тем не менее наблюдается схожая ситуация с вариабельностью результатов применения этих матриц у людей: успешность операций колеблется от 20% [112, 113] до 90 и более % [114, 115]. Несомненно, при интерпретации этих результатов стоит учитывать технику операции, анатомическое расположение и протяженность стриктуры, предшествующий анамнез каждого конкретного пациента и прочие особенности. Однако нельзя исключать и возможность влияния и свойств самих децеллюляризованных матриц на исход операций.

Остаточные иммуногенные компоненты (ДНК, РНК, другие ксеноантигены) могут оставаться после децеллюляризации в тканях импланта (матрицы) [31], что может вызвать воспаление и фиброз окружающих тканей уретры после проведения уретропластики. Дальнейшие улучшения свойств матриц и исхода операций с их применением могут быть связаны с усовершенствованием процедуры децеллюляризации и очистки тканей от иммуногенных компонентов.

Более того, структура, состав, степень старения и сшивки коллагена в децеллюляризованной матрице, а также наличие биоактивных компонентов и ее общий прорегенеративный потенциал могут сильно зависеть от возраста, пола и участка забора ткани у животного [116, 117]. Это делает вариабельность свойств децеллюляризованных матриц довольно широкой от партии к партии и, соответственно, не позволяет считать их идеальными для осуществления уретропластик.

1.3.6. Реконструированные коллагеновые матрицы

Существенно меньше в литературе упоминается использование матриц на основе реконструированного коллагена для уретропластики в рамках доклинических испытаний [17, 18]. Среди имеющихся исследований методы

реконструкции коллагена можно разделить на лиофильную сушку, воздушную сушку и электроспиннинг.

В исследовании Pinnagoda и др. [32] коллагеновая матрица была получена на основе коллагена 1-го типа, выделенного из хвостов крыс. Для этого растворенный в кислоте гель нейтрализовали, получившуюся гелеобразную массу наливали в форму с расположенным в центре стержнем, на котором она за счет дальнейшей желефикации фиксировалась, а затем получившийся гелеобразный стержень осушали и уплотняли при помощи лабораторных салфеток. Процедуру повторяли еще раз, не снимая со стержня ранее образовавшийся плотный слой коллагена, и таким образом получалась коллагеновая матрица с двойной структурой. Результаты имплантации такой тубулярной матрицы были довольно удовлетворительными: у 80% кроликов сохранился созданный просвет уретры в месте имплантации через 9 месяцев, а сформированная стенка уретры была полностью эпителизирована. Однако авторы отмечают, что созданные матрицы были механически непрочными и слабо выдерживали натяжение хирургической нити при имплантации.

Довольно противоречивый эффект был получен в исследовании Nuininga и др. [38], где также замещали участок уретры при помощи тубуляризованного импланта на основе коллагена 1-го типа. Коллаген был выделен в нерастворимой (фибриллярной) форме из сухожилий крупного рогатого скота (КРС), затем помещен в форму со стержнем в центре, заморожен и лиофилизирован. В отличие от коллагена из крысиных хвостов коллаген из сухожилий КРС отличается большей прочностью [47], и поэтому получаемые матрицы будут обладать также более высокой способностью удерживать натяжение хирургической нити при имплантации в сравнении с микрофибриллярными и молекулярными формами коллагена.

Противоречивый эффект данного исследования заключался в том, что в матрицу добавляли различные факторы роста клеток (фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста), что, по мнению авторов, должно было усилить процессы регенерации и снизить

вероятность послеоперационных осложнений; однако введение дополнительных факторов роста в матрицу, напротив, привело к 100% стриктурированию уретры у животных на 6-й месяц наблюдения, в то время как в группе контрольной матрицы без факторов роста было отмечено 0% стриктур у животных. Тем не менее в обеих группах наблюдалось формирование дивертикулов, что авторы связывают с пористой и недостаточно жесткой структурой матрицы, полученной в результате лиофилизации. Кроме того, авторы выражают опасения, что моча может протекать не вдоль матрицы, а через ее толщу, особенно при несформированном эпителиальном барьере, что создаст условия для выхода мочи в периуретральные ткани и образованию стриктуры.

Создание матриц на основе коллагена также возможно и при помощи методики электроспиннинга [41]. При этом были получены как матрицы на основе чистого коллагена, так и покрытого гиалуроновой кислотой (ГК) при помощи методики коаксиального электроспиннинга. Примечательно, что покрытие ГК матриц в испытаниях *in vitro* продемонстрировало способность изменять морфологию макрофагов к вытянутой форме (для непокрытого коллагена форма макрофагов была круглой). В результате иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализа было показано, что вытянутая форма макрофагов способствует экспрессии маркеров M2 фенотипа, которые отвечают за противовоспалительное действие [118]. Тем не менее в результате экспериментов на собаках обе коллагеновые матрицы показали одинаковую 100% эффективность на 4-й месяц наблюдения, хотя в группе непокрытых ГК коллагеновых матриц ток мочи был немного ниже (10 мл/с и 15 мл/с для непокрытых и покрытых матриц соответственно).

Несмотря на успешность испытаний матриц из реконструированного коллагена в рамках доклинических испытаний по уретропластике, в литературе практически отсутствует информация об их клиническом применении [119]. Вполне вероятно, что ныне существующие реконструктивные методы имеют ряд ограничений по части механических и барьерных свойств производимых матриц, а также технологического масштабирования и экономической обоснованности.

Исходя из этих ограничений, можно сделать вывод о том, что существует потребность в усовершенствовании ныне существующих методов реконструкции коллагена (а также разработки новых) с целью создания матриц с необходимыми свойствами для их дальнейшей клинической трансляции [4, 120].

1.4. Технология электрофоретического осаждения

Одним из перспективных методов по реконструкции коллагена является метод ЭФО [44]. Во время ЭФО заряженные частицы, растворенные или диспергированные в растворе, двигаются к электроду с противоположным зарядом под действием электрического поля и агрегируют вблизи его поверхности или на нем [121]. ЭФО позволяет получать матрицы с большой площадью поверхности, необходимой структурой и составом из различных биополимеров и других веществ высоковоспроизводимым и четко регулируемым образом. Данный метод особо привлекателен для получения материалов для биомедицинского применения, поскольку получаемые материалы обладают высокой чистотой, а стоимость и время их производства при этом довольно низкие [45].

Существует два типа ЭФО: катодное осаждение, при котором положительно заряженные частицы двигаются к катоду (заряженному отрицательно), и анодное осаждение, при котором отрицательно заряженные частицы двигаются к аноду (заряженному положительно) [122]. Для коллагена возможны оба варианта ЭФО, поскольку его молекула амфотерна и может быть заряжена как положительно в кислой среде, так и отрицательно в щелочной среде. Для коллагена наиболее предпочтительно катодное осаждение, поскольку получаемые при этом матрицы более прочные и пригодные к манипуляциям [48, 49, 123, 124].

Полученные методом ЭФО коллагеновые матрицы в форме мембран и волокон применялись для восстановления сосудов [125], кожи [49], сухожилий [126] и роговицы [127]. Для целей урологии и реконструкции мочеполовой системы матрицы на основе ЭФО не применялись.

Среди решаемых задач в данных исследованиях авторы особо выделяли повышение механической прочности осаждаемых коллагеновых матриц [48, 125], поскольку при их дальнейшем хирургическом применении такие матрицы должны выдерживать прошивание хирургической нитью. Повышение механической прочности осаждаемых матриц и их большая плотность возможны при повышении вольтажа ЭФО коллагена [46, 128, 129], при котором большая сила электрического поля сильнее упаковывает коллагеновые молекулы или фибриллы друг к другу, создавая более прочную структуру материала [47]. Однако проблема высокого вольтажа при ЭФО водных растворов заключается в образовании пузырьков газа (кислорода и водорода) на поверхностях электродов по следующей реакции:

- анод: $2\text{H}_2\text{O} - 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{H}^+ + \text{O}_2$;
- катод: $4\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^- + 2\text{H}_2$.

Сформировавшись на электроде, пузырьки газа должны как можно быстрее покинуть поверхность электрода для избежания эффекта экранирования поверхности, что может уменьшить его эффективную рабочую площадь [130]. Этому процессу при ЭФО коллагена будет препятствовать собственно сама коллагеновая матрица, формирующаяся на поверхности электрода, и при этом сформировавшиеся пузырьки будут инкорпорироваться в ее структуру, создавая тем самым дефекты и «мертвые места» для осаждения последующих слоев [46].

Были предложены различные способы для избежания проблемы образования пузырьков газа на электродах и их инкорпорирования в структуру получаемых матриц во время ЭФО. Например, для катодного осаждения коллагена было предложено использовать импульсное ЭФО [47], добавление перекиси водорода в раствор [131], а также использование палладиевых электродов [132]. Тем не менее импульсное ЭФО не позволяет полностью избавиться от пузырьков в получаемой коллагеновой матрице при высоких напряжениях (≥ 5 В) без снижения ее плотности и прочности [47]. Добавление H_2O_2 в раствор (суспензию) коллагена может разрушить его нативную структуру и тем самым ограничить естественную свойственную ему биоактивность [133–

135]. Палладиевые электроды могут поглощать выделяющийся водород (на катоде) только в определенных пределах, и для их последующего функционирования необходимо проводить процедуры десорбции [136,137], что существенно усложняет процесс получения матриц. Кроме того, палладиевые электроды достаточно дороги (>50\$ за грамм в 2022 году [138]), что значительно увеличит экономические затраты на производство матриц.

Альтернативой вышеперечисленным методам может служить применение полупроницаемых барьеров во время ЭФО. Этот подход был изначально применен в сфере керамики и производства стекла [139, 140]. Вкратце – полупроницаемый барьер при этом разделял электрохимическую ячейку на две части, одна из которых содержала частички, которые далее осаждались. Во время ЭФО-ППБ ионы свободно проходили через ППБ, таким образом поддерживая протекание электрического тока и электрохимических процессов, в то время как заряженные частицы большего размера двигались под действием электрического поля, но не могли пройти через ППБ и аккумулировались на его поверхности.

Далее, в биомедицинской сфере, ЭФО-ППБ было применено для осаждения биологических полимеров [141, 142], однако эти исследования были посвящены созданию матриц на основе хитозана и фиброина, в то время как ЭФО-ППБ коллагена будет иметь свои особенности и аспекты вследствие другой природы этого биополимера [13, 44, 143]. Возможность применения ЭФО-ППБ для получения коллагеновых матриц упомянута в одном патенте [144], однако это упоминание носит декларативный характер: оно не подкреплено каким-либо описанием технологии ЭФО-ППБ коллагена, физико-химическими или биологическими характеристиками получаемых таким образом матриц.

1.5. Тканеинженерные конструкты в уретропластике

Формирование и регенерация эпителиальной выстилки критичны для предотвращения вторичного стриктурирования в месте имплантации, поскольку моча обладает раздражающим действием на клетки тканей и ее попадание в

периуретральные ткани через незрелый или несформированный эпителиальный барьер импланта будет вызывать в них фибротические процессы [3].

Тем не менее в литературе нет единого мнения о потенциальном положительном эффекте предзаселения клеточным (эпителиальным) компонентом матрицы для формирования тканеинженерного конструкта на исход уретропластики. Несмотря на громкие заявления некоторых авторов о том, что добавление клеток к матрицам повышало успех операций по уретропластике от 0% (при использовании бесклеточных матриц) до 100% [102, 106, 145], систематические обзоры с метаанализом литературы показывают, что добавление клеток к матрицам может лишь незначительно уменьшить риск побочных эффектов в экспериментах на животных. В то же время у людей бесклеточные и заселенные клетками матрицы имеют одинаковую эффективность, оставляя вопрос о необходимости заселения матриц клетками открытым [17, 18, 146].

Противоречивость полученных данных в отношении тканеинженерных конструктов может объясняться малым количеством исследований у людей, различными техниками операций, а также недостаточным периодом послеоперационного наблюдения. Ряд авторитетных авторов заявляет, что потенциал тканеинженерных конструктов в сравнении с бесклеточными матрицами может быть мало или несущественно заметен при проведении аугментационной уретропластики, когда миграция эпителиальных клеток происходит со всех сторон матрицы, и процесс ее эпителизации происходит довольно быстро [9]. В то же время эпителизация бесклеточной матрицы на модели заместительной уретропластики будет происходить гораздо дольше, поскольку миграция клеток будет происходить только с двух (передней и задней) ее сторон. В этом случае предзаселение матрицы клеточным компонентом фактически минимизирует сроки по организации непрерывного эпителиального барьера на всем протяжении уретры, а значит, и существенно увеличивает шансы на успешный исход этой операции в дальнейшем [18].

Не стоит забывать и о технологической, экономической и законодательной составляющих этого вопроса. Забор и выращивание эпителиальных клеток *in vitro*

в соответствии со стандартами GMP (Good Manufacturing Practice, рус. – Надлежащая производственная практика) для последующей имплантации человеку является довольно длительным, трудоемким и наукоемким процессом, требующим большого человеческого ресурса, высокотехнологичного оборудования, особых условий проведения клеточных испытаний, что неминуемо ведет кратно большим затратам на создание продукта по сравнению с бесклеточными матрицами [119]. Кроме того, использование человеческих клеток строго регламентируется законодательными органами, которые имеют свою специфику в разных странах. Например, в Европе любой медицинский продукт, используемый для рынка Евросоюза, требует регистрации, оценки и одобрения Комитетом по перспективным методам лечения Европейского агентства по лекарственным средствам, и одобрение клеточных продуктов в этом органе может занимать годы [147].

1.6. Биопечать уретры

Идея воссоздания естественной структуры живых тканей с помощью искусственных методов является ключевой в области регенеративной медицины. Более того, важно не только воссоздать структуру естественной ткани, но и сделать искусственную ткань физиологически функциональной [148]. Одним из способов достижения этой цели является применение технологий струйной, экструзионной и лазерной биопечати. Важно отметить, что эти технологии не следует рассматривать как конкурирующие, поскольку каждая из них имеет свои плюсы и минусы, и решение о ее применении зависит от множества факторов [149].

Технологии биопечати были ранее применены для целей урологии и создания искусственной уретры. Так, Pi и др. [150] напечатали многослойный тубулярный конструкт уретры при помощи коаксиальной экструзионной 3D-биопечати. Биочернила были многокомпонентными, их гидрогелевая часть состояла из метакрилизованного желатина, альгината и акрилата

полиэтиленгликоля, а клеточная часть состояла из уротелиальных или гладкомышечных клеток. При этом внутренняя часть созданного конструкта состояла из уротелиальных клеток, а внешняя – из гладкомышечных, и полученный тубулярный конструкт в дальнейшем активно перфузировался при помощи жидкости. По окончании эксперимента в результате иммуногистохимического анализа было показано, что уротелиальные клетки активно экспрессировали белки межклеточной адгезии, а гладкомышечные клетки – α -SMA, что доказало принципиальную возможность создания тканеинженерного ТИК уретры *in vitro*.

Биопечать на основе гидрогелей и клеток не может воссоздать нативной механики уретры [151], и поэтому Zhang и др. [152] печатали уротелиальные и гладкомышечные клетки в составе гидрогеля на основе фибрина на механически прочную и соответствующую механике нативной уретры матрицу из поликапролактона / полилактида-капролактона. Созданный конструкт также состоял из внутреннего уротелиального и внешнего гладкомышечного клеточных слоев. Выживаемость клеток на 7-й день после печати составила более 80%, а клетки демонстрировали активную пролиферацию и экспрессию специфических маркеров (цитокератины, α -SMA, миозин).

1.6.1. Применение сфероидов для биопечати тканеинженерных конструктов уретры

Вышеперечисленные статьи применяли подход по биопечати тканеинженерных конструктов уретры с помощью 2D-клеточных культур или суспензий. Однако глобально в индустрии биопечати нарастает тенденция к замене такого способа на печать клеточными 3D-сфероидами (микротканями) [59]. Применение сфероидов в тканевой инженерии имеет ряд преимуществ перед обычными 2D-клеточными культурами и суспензиями. 3D-сфероиды имеют более высокую плотность, аналогичную плотности нативных тканей [153], предварительно сформированные клеточные контакты и микроокружение, что в

ряде случаев обеспечивает создаваемым клеточным конструктам большую структурную схожесть с нативными тканями и функциональность [154, 155]. Это позволяет использовать сфероиды в качестве «продвинутых» строительных блоков [59] для создания сложных тканей и органов в более короткие временные сроки. Следовательно, биопечать сфероидами может значительно облегчить крупномасштабное биопроизводство тканеинженерных конструкций органов для пациентов, ускорив их трансляцию в клиническую практику [156–158]. С точки зрения функциональности при создании ТИК уретры особой важностью обладает эпителиальный клеточный компонент – именно он обеспечивает их барьерную функцию по предотвращению попадания мочи в окружающие ткани, что, согласно ряду исследований, снижает риск вторичного стриктурирования [159–161].

В работе Zurina и др. [24] методы биопечати использованы не были, однако был показан фундаментальный принцип выращивания эпителиальных клеток, полученных из щеки, в форме 3D-клеточных сфероидов, что позволяло сохранить их эпителиальный фенотип и предотвращать процессы эпителиально-мезенхимального перехода. Основным преимуществом такого метода является то, что при заселении эпителиальными сфероидами матриц для создания ТИК зрелый эпителиальный слой со сформированными межклеточными контактами будет сформирован в очень короткие сроки и клетки сохранят свой эпителиальный фенотип; в противоположность обычному методу засева клеточных суспензий в виде 2D на матрицы, где требуется достаточно длительное время для получения на них монослоя клеток, появления многослойности и, что является главной проблемой, поддержания их эпителиального фенотипа. Авторы планируют, что в дальнейшем их технология может быть применена для биопечати эпителиальными 3D-клеточными сфероидами для создания ТИК уретры с нативным строением и барьерной функцией.

Наиболее распространенные подходы к биопечати 3D-клеточных сфероидов (струйные и экструзионные) основаны на использовании сопел. В настоящее время эти технологии дешевы и доступны, но их разрешение печати довольно

низкое, что может создавать проблемы с точным позиционированием сфероидов, а также с плотностью их упаковки [162]. Кроме того, из-за использования сопла они ограничены в скорости печати и диапазоне вязкости биочернил, а создаваемое при печати напряжение сдвига может также снизить жизнеспособность сфероидов [162].

Относительно недавно в качестве альтернативы этим технологиям были предложены другие подходы, которые не используют сопло и обладают большей точностью, такие как: аспирационная [163], акустическая [164] и Kenzan-биопечать [165]. Они продемонстрировали большой потенциал для производства жизнеспособных конструкторов с заданной геометрией, однако также имеют определенные ограничения. Например, акустическая и аспирационная биопечать имеют довольно низкую скорость [158, 164], и процесс печати конструкции объемом 1 см^3 может занять около двух дней. Kenzan-биопечать ограничена определенным диапазоном размеров сфероида, а также не позволяет печатать конструкторы сложной формы и отдельные клетки [163, 165].

В частности, в области урологии первое упоминание использования биопечати сфероидами для создания искусственной уретры можно найти в тезисах научной конференции [166]. Авторы при помощи Kenzan-метода биопечати создали уретру на основе сфероидов из МСК и далее имплантировали ее крысам. Тем не менее качество и детальность представленных в тезисах данных не позволяют сделать достоверных выводов о применимости такого метода биопечати для создания уретры. Статьи по результатам проведенной работы нам найти не удалось.

Более достоверным и полноценным было упоминание биопечати прототипа уретры в работе Mironov и др. [167]. Авторы скомбинировали магнитные и акустические поля для создания нового метода левитационной биопечати. Использование левитационной биопечати позволило авторам собрать жизнеспособные трубчатые ТИК на основе сфероидов из гладкомышечных клеток мочевого пузыря без использования матриц для механической опоры, которые к

тому же были функциональными и сокращались от добавления в среду эндотелина-1.

Однако в данной работе собранная экспериментальная установка была довольно технически сложной в реализации, а в ходе биопечати использовались соли гадолиния (Gd^{3+}), которые обладают потенциально токсическим действием на клетки. Кроме того, получаемая структура стенки тубулярного конструкта получалась неомогенной (чередующиеся участки утолщения и истончения). Такая сборка сфероидов может негативно сказаться на воспроизведении нативной структуры эпителиального слоя, выживаемости сфероидов в наиболее утолщенных участках конструкта и, как следствие, сохранности его барьерных функций [168].

Таким образом, идея применения клеточных сфероидов для биопечати ТИК уретры – довольно новая и перспективная задача, поиск оптимальных решений к которой продолжается и по сей день. На данный момент в литературе данной задаче уделено крайне мало работ, и это, на наш взгляд, станет предметом исследований многими научными группами в будущем.

1.7. LIFT-биопечать для формирования тканеинженерных конструктов

Еще одним альтернативным решением для переноса клеточных сфероидов с целью создания ТИК является использование технологии лазерно-индуцированного прямого переноса (LIFT). LIFT-биопечать позволяет избежать всех негативных эффектов, связанных с соплом, а также имеет много преимуществ, таких как: разрешение в микронном масштабе, широкий диапазон вязкости используемых биочернил, высокая скорость биопечати, а также высокая выживаемость и плотность клеток в произведенном тканеинженерном конструкте, схожая с нативной тканью [169]. При этом высокое разрешение печати в сочетании с объемом переносимых объектов до пиколитров [170] позволяет доставлять, помимо клеток, различные биологические объекты, такие как

факторы роста [171] и нуклеиновые кислоты [172], в необходимые участки печатаемого конструкта с заданной концентрацией.

Как правило, установки для LIFT состоят из трех стандартных компонентов: донорной подложки, состоящей из энергопоглощающего слоя и биочернил, коллекторной подложки и лазерного источника. Эти компоненты могут быть организованы различным образом в пространстве и дополнены вспомогательными устройствами, такими как: моторизованные столики с компьютерным управлением, оптические сканеры на основе гальванометров, микроскопы и системы автоматического управления, облегчающие позиционирование и визуализацию лазерного луча [55].

Несмотря на то, что LIFT имеет большой потенциал для биопечати биологических объектов и создания тканей и органов, в области тканевой инженерии и регенеративной медицины LIFT начал набирать популярность всего десять-пятнадцать лет назад [55]. При помощи технологии LIFT в работах были уже созданы целые анатомические структуры, такие как кожа [173], роговица [174], кость [175]. Однако их биопечать производилась при помощи биочернил, содержащих клеточные суспензии, а не 3D-клеточные сфероиды, перспективность печати которых для создания ТИК, в том числе уретры, упоминалась ранее.

Тем не менее в ряде работ были предприняты попытки применить LIFT для печати 3D-сфероидоподобных структур (микробусин). Phamduy и др. [56] стали первыми исследователями, которые применили LIFT для формирования паттерна из микробусин на основе эмбриональных мышечных стволовых клеток. Микробусины формировались за счет помещения микрокапель альгината с клетками в среду, содержащую ионы кальция (Ca^{2+}). В дальнейшем в капле образовывалась плотная стенка за счет взаимодействия альгината с ионами кальция, а ее внутреннее содержимое с клетками оставалось жидким, формируя тем самым микробусину. В своем исследовании авторы выявили оптимальные параметры лазерной биопечати микробусин для их воспроизводимого и стабильного переноса на коллекторную подложку в соответствии с заранее определенной геометрией.

Далее LIFT был использован для одномоментного формирования и печати микробусин из раковых клеток Kingsley и др. [57]. Авторы при этом создавали из микробусин определенные геометрические паттерны и изучали поведение раковых клеток. Однако такой подход имел определенные недостатки: использование только жидких кальцийсодержащих коллекторных подложек при биопечати; загрязнение коллекторной подложки остатками Ca^{2+} даже после смены среды; ограничение времени печати до 10 мин, так как в противном случае стенки микробусин становятся слишком толстыми, что затрудняет диффузию питательных веществ и кислорода и снижает итоговую выживаемость клеток [176].

В исследовании Vinson и др. [58] авторы также изучали поведение раковых клеток в микробусинах, но процесс их создания и LIFT-биопечати был разделен на два этапа во избежание вышеупомянутых трудностей. Сначала авторы формировали микробусины при помощи выдавливания из шприца капель альгината, которые погружали в раствор с ионами Ca^{2+} , а затем собирали полученные микробусины, помещали их на донорную подложку установки для LIFT и переносили микробусины с заданной геометрией на коллекторную подложку.

Тем не менее во всех упомянутых исследованиях микробусины (сфероидоподобные структуры) не были эквивалентны сфероидам, используемым в современной концепции биофабрикации для конструирования тканей и органов [59]. «Настоящие» сфероиды можно приготовить, например, с помощью микропланшетов [177, 178], и их поведение и свойства отличаются от тех микробусин, которые образуются при погружении микрокапель альгината в раствор хлорида кальция. Таким образом, на данный момент в литературе не было описано случаев по переносу «настоящих» 3D-клеточных сфероидов при помощи технологии LIFT для создания тканеинженерных конструкторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общий дизайн исследования

Диссертационная работа представляет собой экспериментальное исследование, состоящее из трех последовательных этапов (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Общий дизайн диссертационного исследования

На первом этапе из сухожилий крупного рогатого скота получали фибриллярную суспензию коллагена, из которой при помощи разработанного авторами метода ЭФО-ППБ производили коллагеновые матрицы. Коллагеновые матрицы испытывали как в исходном виде (химически несшитые), так и в химически сшитом виде. Характеризовали структурные и физико-химические свойства произведенных ЭФО-ППБ коллагеновых матриц. Далее тестировали биосовместимость матриц *in vitro* на двух типах клеток (МСК и ЗТЗ) и *in vivo* на модели подкожной имплантации у крыс линии Wistar. Для дальнейших экспериментов были отобраны несшитые коллагеновые матрицы.

На втором этапе из несшитых ЭФО-ППБ матриц методом модификации получали Янус-матрицы и характеризовали их структурные и механические свойства. Янус-матрицы имплантировали на модели аугментационной уретропластики кроликам породы советская шиншилла.

На третьем этапе на основе Янус-матриц создавали модельный тканеинженерный конструкт уретры при помощи разработанного авторами метода LIFT-биопечати. Для LIFT-биопечати был подобран оптимальный состав биочернил и режим переноса жизнеспособных клеточных сфероидов на основе МСК.

2.2. Получение фибриллярной суспензии коллагена

Для получения суспензии коллагена использовали адаптированную методику [51]. Свежезамороженные сухожилия крупного рогатого скота были получены от местной скотобойни. Сухожилия размораживали, очищали от лишних тканей и разрезали на кусочки толщиной 1 см. Затем кусочки сухожилий подвергали четырем обработкам в 0,5 М NaCl в течение 12 часов, после чего их гомогенизировали в 0,5 М уксусной кислоте. В полученную суспензию добавляли пепсин (0,1%), и гидролиз осуществлялся в течение ночи. Затем pH повышали до 7,5 с помощью 1 М NaOH, чтобы остановить гидролиз, и суспензию коллагена переосаждали 2 М раствором NaCl. Образовавшийся коллагеновый осадок

повторно растворяли в 0,5 М уксусной кислоте и диализировали против 0,5 М уксусной кислоты в течение 3 дней с ежедневной сменой диализирующего раствора. Конечную концентрацию коллагена в суспензии определяли гравиметрическим методом.

2.3. Производство коллагеновых матриц

2.3.1. ЭФО-ППБ матрицы

Для ЭФО-ППБ использовали суспензию коллагена с концентрацией 5 мг/мл. Осаждение проводили в электрохимической ячейке, разделенной на две части полупроницаемым барьером из регенерированной целлюлозы (Sigma-Aldrich, США), каждая из которых содержала либо анод, либо катод (Рисунок 4). Суспензию коллагена заливали в анодную часть ячейки, а дистиллированную воду заливали в катодную часть ячейки. Катод и анод представляли собой пластинчатые электроды, к которым подключался источник постоянного тока с напряжением 60 В, и процесс ЭФО-ППБ проводили последовательно, в течение 1, 2 или 3 циклов по 20 мин каждый. После завершения каждого цикла ЭФО оставшуюся жидкость заменяли свежей суспензией коллагена. Один цикл ЭФО-ППБ позволял получать один слой коллагена, поэтому в результате ЭФО-ППБ получали 1, 2 или 3-слойные коллагеновые матрицы. Полученные матрицы осторожно отслаивали от поверхности полупроницаемого барьера и обрабатывали в течение 20 мин в изопропиловом спирте, а затем сушили внутри ламинарного шкафа. Если требовалось провести обычное ЭФО, тот же процесс проводили без помещения полупроницаемого барьера между электродами.

Контрольные матрицы получали методом воздушной сушки. Для этого суспензию коллагена с концентрацией 8 мг/мл наливали в форму с размерами 3.5 x 4.5 x 4 см и помещали ее в ламинарный шкаф на 5 дней до полного высушивания. После извлечения матриц из формы их выдерживали в изопропиловом спирте в течение 40 мин и снова помещали на сушку в

ламинарный шкаф. Толщину сухих матриц для обоих методов получения определяли при помощи электронного толщиномера Mitutoyo 293-186 (Япония).

Сшивку матриц производили 0.625% раствором генипина (FUJIFILM Wako Pure Chemicals, Япония) в 80% этаноле в течение 12 часов при 37 °С.

Если не указано иное, для последующих экспериментов по изучению свойств матриц ЭФО-ППБ использовались образцы, полученные после 3 циклов ЭФО-ППБ.

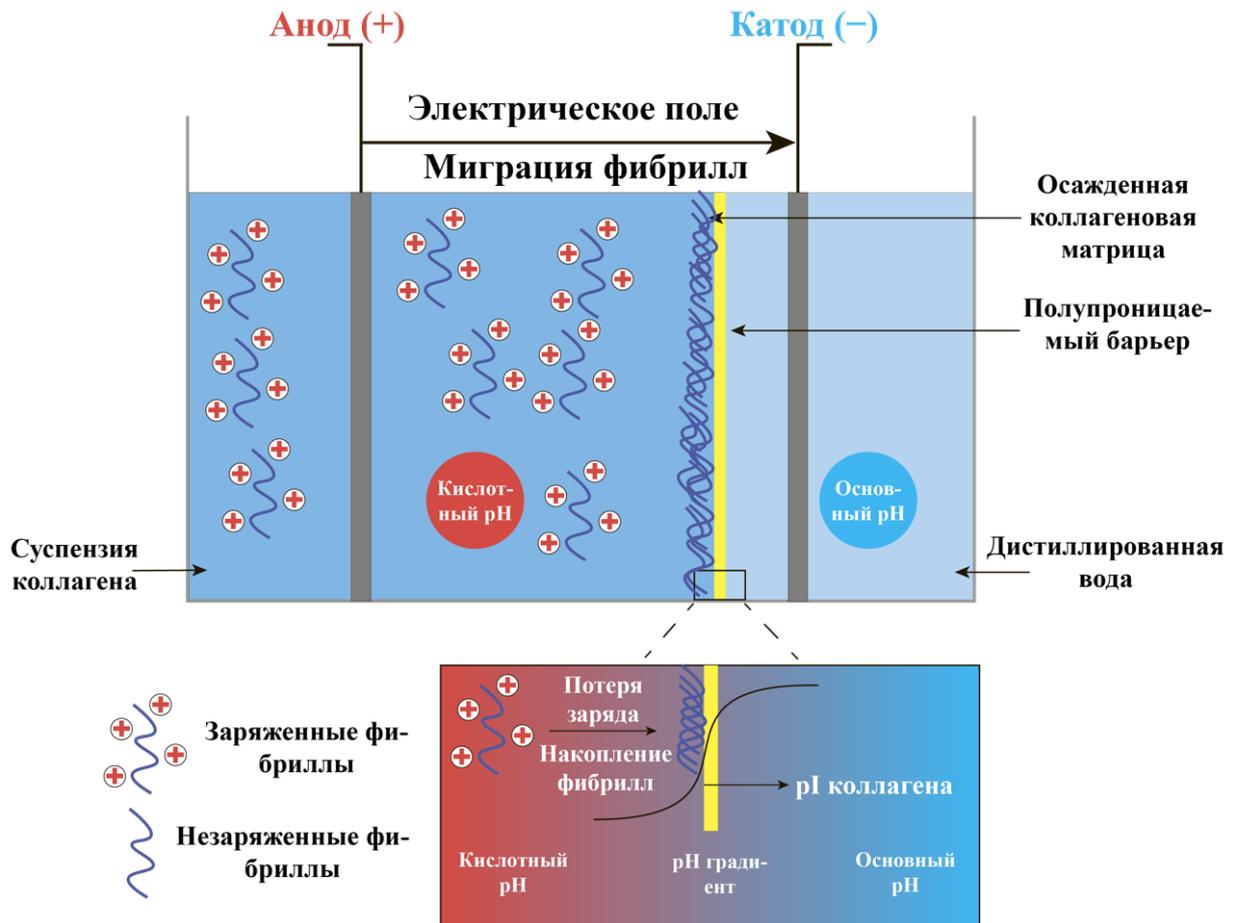


Рисунок 4 – Схема электрофоретического осаждения коллагена

При кислом pH положительно заряженные фибриллы коллагена мигрируют вдоль направления электрического поля к отрицательно заряженному катоду с основным pH. Поскольку полупроницаемый барьер непроницаем для фибрилл коллагена, движимые электрическим полем фибриллы плотно вдавливаются в его поверхность. Находясь на границе раздела между различными pH, полупроницаемый барьер включает градиент pH, в том числе pH

(изоэлектрическую точку) коллагена, и поэтому аккумулярованные фибриллы коллагена теряют свой заряд и силы отталкивания, коагулируют и оседают в коллагеновую матрицу

2.3.2. Янус-матрицы

Схема получения Янус-структуры показана на Рисунке 5. Для получения матрицы с Янус-структурой использовали несшитую коллагеновую матрицу, полученную в результате 3 циклов ЭФО-ППБ из суспензии коллагена с концентрацией 6 мг/мл по методологии, описанной в п. 2.3.1. Высушенную ЭФО-ППБ матрицу помещали в раствор фосфатно-солевого буфера (ФСБ) на 8 часов и далее вручную перфорировали с одной стороны при помощи косметического мезороллера с титановыми иглами длиной 1.5 мм. После перфорации коллагеновую матрицу помещали на лиофилизацию в течение 24 часов при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве контрольных матриц ЭФО-ППБ для сравнения с Янус-матрицами использовали также несшитые образцы.

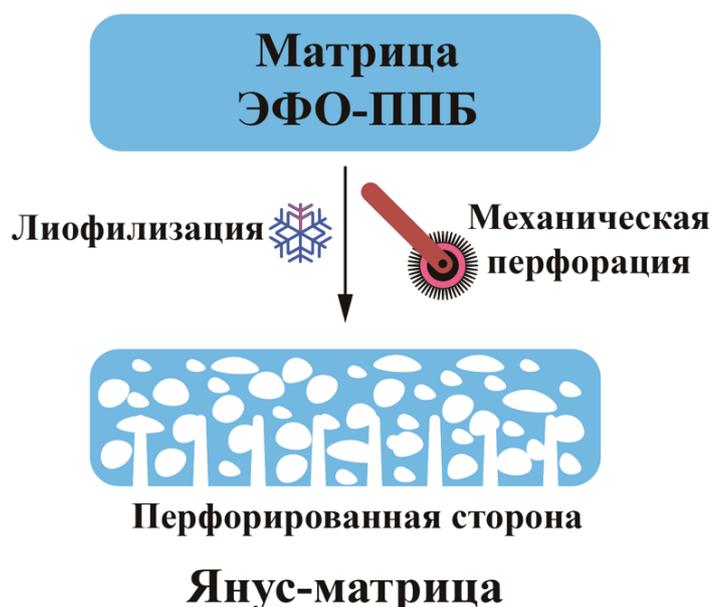


Рисунок 5 – Схема модификации ЭФО-ППБ матриц для придания Янус-структуры

2.4. Клетки для экспериментов *in vitro*

Использовали первичную культуру человеческих МСК и линию клеток фибробластов мыши 3Т3. МСК были получены из пуповины методом эксплантации, как описано в патенте [Свистунов и др., 2020]; биопсии были предоставлены биобанком Сеченовского университета и собраны у женщин после подписания ими формы информированного согласия. МСК культивировали в модифицированной среде Дульбекко (DMEM)/F12 (1:1, БиолоТ, Санкт-Петербург, Россия), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS; HyClone, Logan, UT, США), L-глутамином (5 мг/мл; Gibco, Gaithersburg, MD, США), инсулин-трансферрин-селенитом натрия (1:100; БиолоТ, Санкт-Петербург, Россия), основным фактором роста фибробластов (bFGF, 20 нг/мл; ProSpec, Rehovot, Израиль) и гентамицином (50 мг/мл; Панэко, Москва, Россия); фибробласты 3Т3 культивировали в среде DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Санкт-Петербург, Россия), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (HyClone, Logan, UT, США) и гентамицином (50 г/мл, Панэко, Москва, Россия).

2.5. Эксперименты на животных

Все эксперименты на животных были одобрены Локальным этическим комитетом Сеченовского Университета (протокол заседания № 07-23 от 27.04.2023).

2.5.1. Подкожная имплантация

Для имплантации *in vivo* коллагеновые матрицы ЭФО-ППБ предварительно стерилизовали гамма-радиацией. Имплантацию несшитых и сшитых коллагеновых матриц проводили самцам крыс Wistar массой 210 ± 20 г (n=20) по схеме на Рисунок 6. Животных содержали в стандартных условиях вивария, по 3–4 особи в клетке. Крыс наркотизировали препаратами Zoletil® (Virbac, Франция)

1,5 мг/кг и Xyla® (Interchemie, Нидерланды) 0,2 мг/кг внутримышечно, а затем лопаточную и поясничную области выстригали от шерсти. Четыре подкожных кармана глубиной 2 см каждый (по направлению к правой и левой передней и задней лапам) были сделаны путем тупого рассечения. Сформированные карманы промывали 0,05% водным раствором хлоргексидина. Затем в карманы помещали стерильные матрицы размером 1 x 1 см (левую сторону животного использовали для несшитых образцов, правую сторону животного – для сшитых образцов). Операционную рану плотно закрывали прерывистыми швами. Для профилактики гнойно-септических осложнений животные получали энрофлоксацин перорально в течение 7 дней.

Были определены следующие контрольные временные точки эксперимента: 3, 7, 14 и 21-й послеоперационный день (ПОД). В установленные сроки животных (n=5) подвергали эвтаназии в камере с углекислым газом. Далее имплантированные ранее образцы извлекали из животных и процессировали для последующих анализов.

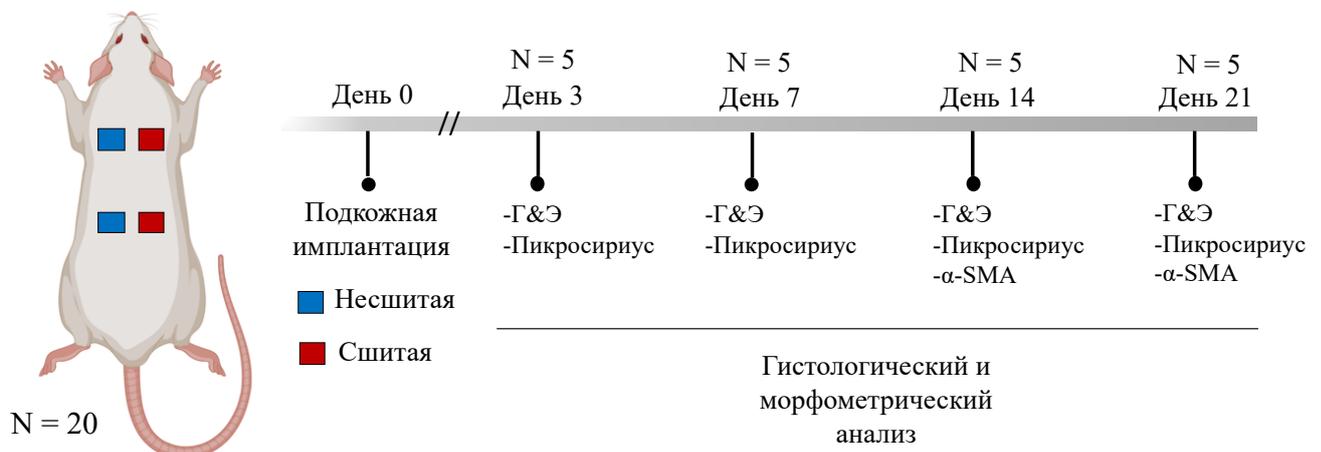


Рисунок 6 – Схема эксперимента по подкожной имплантации химически несшитых и сшитых коллагеновых матриц. Г&Э – окраска гематоксилин-эозином, пикросириус – окраска пикросириусом красным; α-SMA – альфа-актин гладких МЫШЦ

2.5.2. Аугментационная уретропластика

В качестве лабораторной модели для аугментационной уретропластики использовали кроликов породы советская шиншилла в возрасте от 8 до 12 месяцев с полностью сформировавшейся мочеполовой системой. В эксперименте использовали 18 здоровых особей мужского пола весом от 2,5 до 3,5 кг, распределенных в две экспериментальные группы по схеме (Рисунок 7).

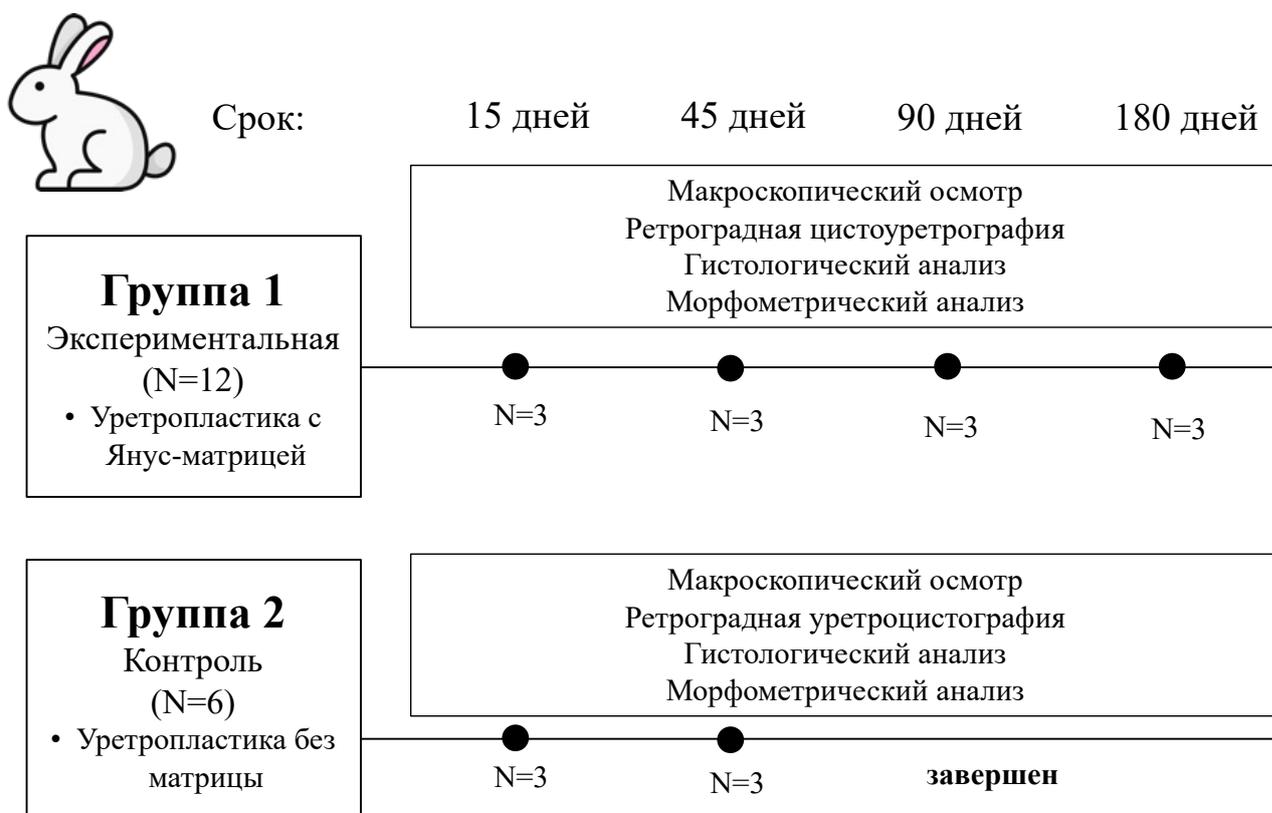


Рисунок 7 – Схема эксперимента по аугментационной уретропластике

Перед операцией каждому животному выполняли внутримышечную инъекцию медетомидина гидрохлорида 0,1% (Медитин, Апиценна, Россия) в объеме 0,01–0,15 мл/кг и инъекцию препарата Пропофол Каби (Fresenius, Германия) из расчета 4–6 мг/кг с разведением раствором NaCl 0.9% в соотношении 1:3 болюсно по 0,5 мл до достижения эффекта. Поддержание анестезии интраоперационно достигали болюсным внутривенным введением раствора Пропофол Каби в тех же дозировках. Интраоперационно проводили

внутривенную антибактериальную терапию (Байтрил, Bayer, Германия) из расчета 0,2 мг/кг, а также противовоспалительную терапию (Кетопрофен, Ветпром АД, Болгария) из расчета 3 мг/кг внутривенно болюсно.

С целью достижения анальгезирующего действия проводили местную анестезию зоны оперативного вмешательства 2% раствором лидокаина гидрохлорида, разведенным раствором NaCl 0.9% в соотношении 1:10.

После наркотизации животного сбривали шерсть в зоне оперативного вмешательства. В литотомическом положении животного на операционном столе, после трехкратной обработки операционного поля 1% раствором йодопирона и спиртовым раствором хлоргексидина в соотношении 1:1, выполняли промежностный доступ к проксимальной части пенильной и дистальной части луковичного отдела уретры (Рисунок 8А). Производили выделение последней на протяжении 2,0–2,5 см (Рисунок 8Б). Далее участок уретры (размерами 2,0 x 0,5 см) полностью иссекали (Рисунок 9А) по ее дорсальной поверхности. Коллагеновую Янус-матрицу фиксировали к вентральной поверхности белочной оболочки пещеристых тел одиночными узловыми швами нитями Vicryl 6-0 (Ethicon, США) в центре, края матрицы фиксировали одиночными узловыми швами нитями пролена 6-0 (Ethicon, США) (Рисунок 9Б). Сформированный дефект уретры замещали образцом Янус-матрицы, размеры которой после адаптации под уретральное ложе составляли 2,0 x 0,5 см. Неперфорированная сторона Янус-матрицы располагалась внутрь просвета уретры, перфорированная сторона располагалась со стороны губчатого тела. Края матрицы сшивали с краями уретры в зоне дефекта непрерывным швом, используя Vicryl 6-0 (Рисунок 10А, Б). В случае контрольной группы иссеченный дефект уретры напрямую пришивали к вентральной поверхности белочной оболочки также непрерывным швом, используя Vicryl 6-0.

Мочевой пузырь дренировали уретральным катетером Фолея (6 Ch). Послеоперационные раны орошали стерильным раствором NaCl 0.9%. Выполняли гемостаз с помощью биполярного коагулятора. Ушивание раны производили одиночными узловыми швами нитями Vicryl 5-0. Послеоперационную рану

обрабатывали 1% раствором йодопирона. Накладывали асептическую повязку. Производили фиксацию уретры и уретрального катетера к передней брюшной стенке с помощью самофиксирующегося бинта Reha-haft (Hartmann, Германия).

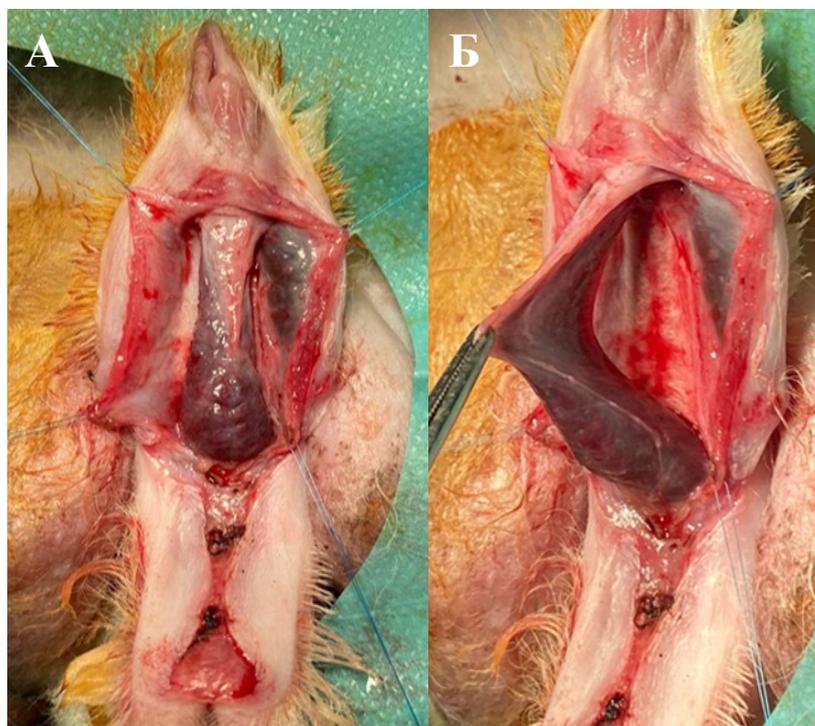


Рисунок 8 – Доступ к проксимальной части пенильной и дистальной части луковичной уретры (А) и выделение дистальной части луковичной уретры (Б)

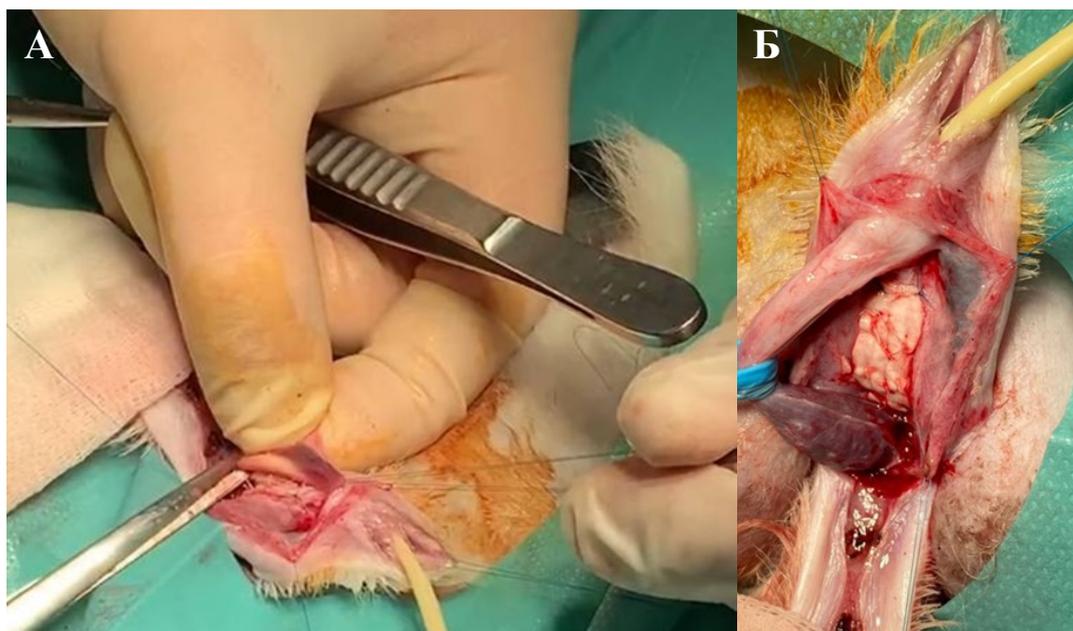


Рисунок 9 – Фиксация Янус-матрицы к вентральной поверхности белочной оболочки пещеристых тел (А) и иссечение фрагмента уретры (Б)

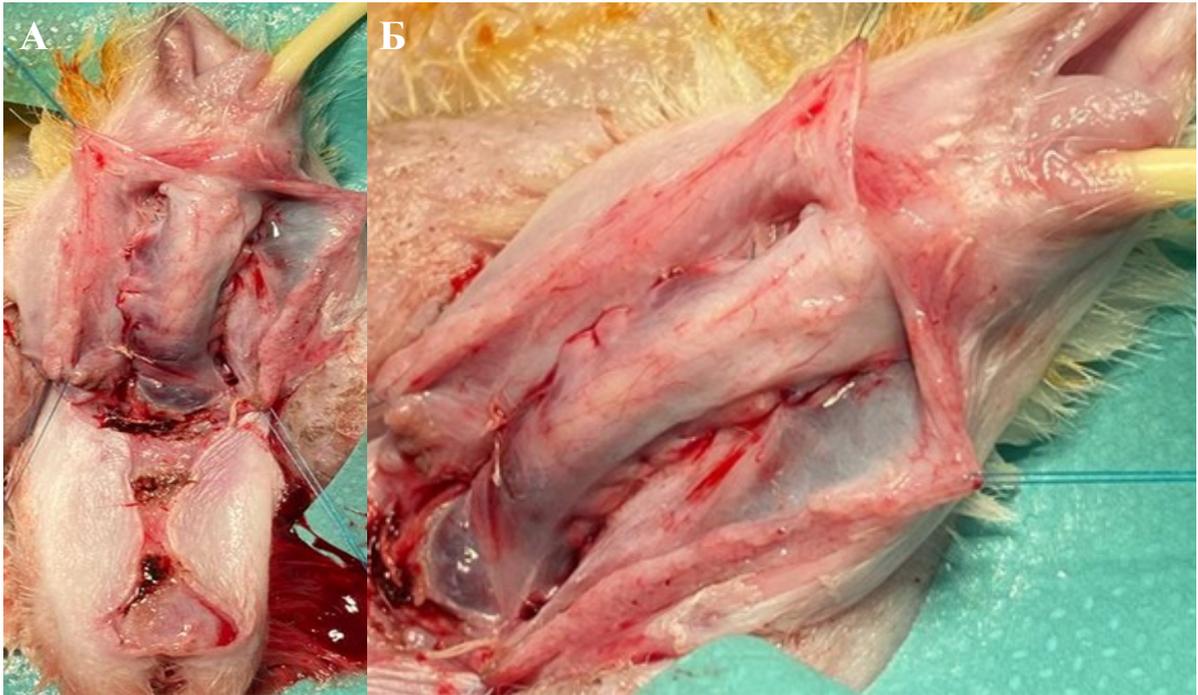


Рисунок 10 – Сшивание краев Янус-матрицы с краями уретры в зоне дефекта

Мониторинг и динамику заживления выполняли при туалетах раны в первые 10 дней ежедневно. Обработку раны проводили с применением 1% раствора йодопирона. С целью антибиотикотерапии использовали раствор Байтрила из расчета 0,2 мг/кг внутримышечно в течение первых 7 суток, противовоспалительную терапию проводили препаратом Кетопрофен из расчета 3 мг/кг подкожно. С целью адекватного оттока мочи в раннем послеоперационном периоде из нижних мочевыводящих путей, а также предупреждения возникновения острой задержки мочи выполняли ежедневные промывания уретрального катетера раствором 0,9% NaCl. У всех животных уретральный катетер удаляли из мочевых путей на 7-е послеоперационные сутки.

В эксперименте принимали участие 18 кроликов. В экспериментальной группе (Группа 1) было 12 кроликов, в контрольной группе (Группа 2) было 6 кроликов. Контрольными точками эксперимента являлись 15, 45, 90 и 180-й день после операции, причем в контрольной группе эксперимент завершили на 45-й день после операции. Всем животным перед выведением из эксперимента

выполняли ретроградную цистоуретрографию (под медикаментозной седацией). На каждую из контрольных точек выводили по 3 кролика из каждой группы. Животные были подвергнуты эвтаназии летальной дозой лидокаина гидрохлорида моногидрата (10%, 6 мл) внутривенно болюсно. После выведения животного уретру с прилежащими тканями резецировали в области операции для проведения ее последующего гистологического и морфометрического анализа.

2.6. LIFT-биопечать

2.6.1. Конструкция установки для LIFT

LIFT клеточных сфероидов проводили в двух вариантах распределения энергии лазерного пятна. В первом варианте лазерное пятно было с гауссовым распределением энергии (режим «Гаусс», Рисунок 11А), и оно формировалось экспериментальной установкой стандартной конструкции [180–182]: лазерный источник YLPM-1-4x200-20-20 (НТО «ИРЭ-Полус», Россия) с $\lambda=1064$ нм, с близким к гауссову профилем интенсивности ($M2<1,3$) и длительностью импульса $\tau=8$ нс. Размер лазерного пятна задавали в 150 мкм, энергию импульса – 100 мкДж, что соответствовало плотности лазерного излучения $\sim 0,68$ Дж/см².

Во втором варианте лазерное пятно с негауссовым распределением энергии (режим «Двойное кольцо», Рисунок 11А) формировалось за счет оптического элемента «Пи-шейпер» (piShaper, тип Focal-piShaper_9_1064_HP, AdlOptica Optical Systems GmbH, Германия), установленного в аналогичную экспериментальную установку с аналогичным лазерным источником DPSS Q-switched pulse laser TESH-1053 (ООО «Лазер-компакт Плюс», Россия) с $\lambda=1053$ нм, гауссовым профилем интенсивности ($M2<1.2$) и длительностью импульса $\tau=7$ нс. Размер лазерного пятна задавали в 350 мкм, энергию импульса – 200 мкДж, что соответствовало плотности лазерного излучения $\sim 0,17$ Дж/см².

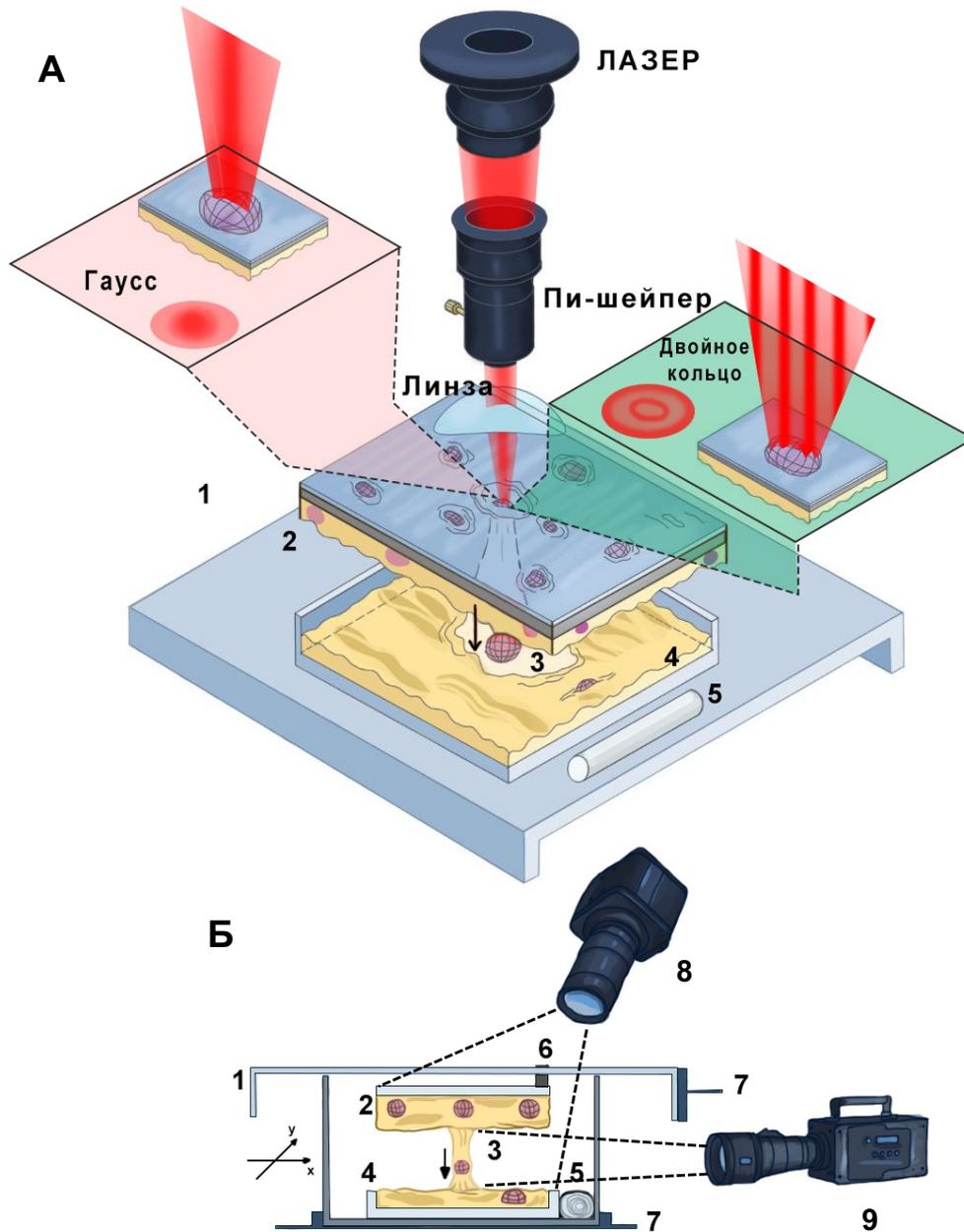


Рисунок 11 – Установка LIFT для переноса клеточных сфероидов.

А) Общая схема установки. Когда Пи-шейпер выключен, в лазерном пятне наблюдается простое гауссово распределение энергии, в то время как активация Пи-шейпера преобразует распределение энергии в пятне в геометрию двойного кольца. Б) Визуализация процессов переноса, происходящих внутри чашки Петри. 1 – пространство чашки Петри, 2 – донорная подложка, 3 – формирующаяся струя со сфероидом, 4 – коллекторная подложка, 5 – влажный тампон, 6 – магнитное крепление донорной подложки, 7 – прикрепленные моторизированные подвижки, 8 – цифровая камера с макрообъективом, 9 – высокоскоростная камера

В обоих случаях лазер фокусировали объективом с фокусным расстоянием 100 мм. Область биопечати на донорной подложке и коллекторной подложке визуализировали с помощью цифровой камеры TouCam XFCAM1080PHD (TouPtec, Сингапур) с длиннофокусным макрообъективом (Рисунок 11Б). Процесс образования струи между донором и коллектором визуализировали высокоскоростной камерой Fastcam SA-3 (Photron, Токио, Япония). Для измерения приложенной плотности лазерного излучения использовали измеритель мощности/энергии лазера FieldMax (Coherent, Санта-Клара, США).

Биопечать проводили в стерильной чашке Петри с диаметром крышки 90 мм и дна 60 мм, к которой изнутри крепили донорную подложку и коллекторную подложку соответственно и располагали их на расстоянии 0,5–0,8 мм. Позиционирование донора и коллектора обеспечивали перемещением крышки и дна чашки с помощью прикрепленных к ним моторизованных подвижек в режиме ручного управления. Для предотвращения высыхания гидрогеля внутрь чашки Петри помещали увлажненный тампон.

Донорная подложка состояла из стеклянного предметного стекла 15 x 15 мм с титановым покрытием, на которое помещали стеклянную рамку толщиной 150 мкм, а ее внутренний объем заполняли 25 мкл биочернил. Коллекторная подложка состояла из предметного стекла размером 15 x 15 мм, на которое помещали стеклянную рамку толщиной 150 мкм, а внутренний ее объем заполняли 100 мкл гидрогеля. В случае биопечати модельного ТИК коллекторной подложкой служила коллагеновая Янус-матрица размерами 2 x 1 см.

Для выбора оптимальной концентрации гиалуроновой кислоты для переноса сфероидов в экспериментах использовали режим распределения энергии в пучке «Гаусс». Далее, чтобы сравнить влияние распределения энергии в пучке на выживание и распластывание сфероидов, их переносили на подложку коллектора в хаотичном порядке в режимах Гаусса и двойного кольца. Контрольная группа состояла из сфероидов, оставшихся на донорной подложке после биопечати, которые пипеткой переносили в культуральные планшеты. Для прецизионной биопечати сфероидов в различных геометрических паттернах

использовали режим двойного кольца. Для создания модельного ТИК уретры сфероиды переносили в хаотичном порядке в режиме двойного кольца.

2.6.2. Приготовление биочернил

Для приготовления биочернил клеточный компонент в виде сфероидов на основе МСК смешивали с гидрогелевым компонентом на основе гиалуроновой кислоты. Для приготовления гидрогелевого компонента биочернил высокомолекулярный порошок ГК $M_w = 1,6-1,8$ МДа (Contipro, Чехия) стерилизовали при 121°C в течение 15 мин, разводили в клеточной среде DMEM/F12 (БиолоТ, Россия) и смешивали с клеточными сфероидами для достижения конечной концентрации ГК 2 или 4 мг/мл и концентрации сфероидов 1600 ед./мл.

Для формирования гидрогелевого слоя, покрывающего коллекторную подложку, фибриноген (Sigma-Aldrich, Германия) смешивали с О,О'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил]поли(этиленгликоль) [PEG-NHS; Sigma-Aldrich, Германия] в молярном соотношении 5:1 в ФСБ, смесь инкубировали в течение 2 часов при 37°C и далее к ней добавляли ГК так, чтобы конечная концентрация компонентов была следующей: фибриноген, конъюгированный с PEG-NHS – 25 мг/мл, ГК – 5,6 мг/мл. После LIFT-биопечати коллекторную подложку желефицировали путем распыления 33 МЕ/мл раствора тромбина (Sigma-Aldrich, Германия).

2.6.3. Формирование сфероидов

Для формирования сфероидов использовали МСК, получение и условия культивирования которых описаны в п. 2.4. Клеточные сфероиды (2000 клеток на сфероид) формировали, как подробно описано в статье [183]. Вкратце – суспензию МСК сначала центрифугировали (200 x g, 6 мин), а затем сформированные клеточные пеллеты ресуспензировали в ростовой среде до

конечной концентрации 4×10^6 клеток/мл и помещали в агарозные неадгезивные планшеты, созданные с помощью трехмерных форм Petri Dish (Microtissues, США). Перед биопечатью сфероиды культивировали в течение 7 дней при 37°C, 5% CO₂.

2.7. Анализ коллагеновой суспензии

2.7.1. Фазово-контрастная микроскопия

Образцы коллагена подготавливали следующим образом: путем серийных разведений исходной суспензии коллагена при помощи 0.05 М уксусной кислоты достигали финальной концентрации суспензии 0,005 мг/мл. 200 мкл полученной суспензии наносили на предметное стекло в виде капли, которую далее равномерно растягивали на площади предметного стекла, равной 6,25 см². Нанесенный слой коллагена сушили под ламинарным током воздуха, затем трехкратно промывали дистиллированной водой для удаления лишних солей и снова сушили. Полученный образец исследовали при помощи светодиодного микроскопа Leica DM4000 B, оснащенного цифровой камерой Leica DFC7000 T, работающей под управлением программного обеспечения LAS V4.8 (Leica Microsystems, Хеербругг, Швейцария). Образцы исследовали в режиме фазово-контрастной микроскопии и делали минимум 50 фотографий из разных участков.

2.7.2. Атомно-силовая микроскопия

Для изучения структуры фибрилл в суспензии образцы подготавливали способом, аналогичным таковому для фазово-контрастной микроскопии и изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Исследования морфологии проводили с помощью атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker, США), совмещенного с инвертированным оптическим микроскопом Axio Observer (Zeiss, Германия). Сканирование проводили на воздухе в режиме

PFQNM, использовали кантилеверы ScanAsyst Air с номинальной жесткостью $k=0.4$ Н/м, радиусом острия $r=2$ нм. Изображения были получены с размерами 50×50 мкм и 20×20 мкм для общей оценки морфологии фибрилл и 5×5 мкм для выявления D-периодичности фибрилл с разрешением изображения 256×256 пикселей ($n = 5$ каждого типа изображений). Обработку изображений проводили с использованием программного обеспечения для обработки изображений NanoScope Analysis v1.9 (Bruker, США) и бесплатной программы Gwyddion [184].

2.7.3. Характеризация фибрилл

Длину и ширину коллагеновых фибрилл рассчитывали вручную по фотографиям, полученным с помощью фазово-контрастного и атомно-силового микроскопов, соответственно, с использованием программного обеспечения FIJ ImageJ (НИН, Bethesda, США). Для расчета этих параметров в каждом случае проводили не менее 180 измерений.

2.7.4. Определение электрофоретической подвижности

Электрофоретическую подвижность определяли путем измерения дзета-потенциала приготовленной суспензии коллагена при различных рН. Измерения осуществляли с помощью системы Zetasizer (Zetatracs, Microtrac Inc., США). Для доведения рН до значений от 3 до 9 добавляли 0,5 М NaOH и 0,5 М CH_3COOH под контролем рН/иономера Mettler Toledo S220 (Mettler Toledo, Columbus, США).

2.7.5. Электрофорез

Чистоту выделенного коллагена оценивали методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с использованием 8% акриламидного геля при постоянном напряжении 120 В, обеспечиваемом универсальным источником

питания PowerPac™ (Bio-Rad, Калифорния, США). Для подготовки образца 5 мл суспензии коллагена 2 мг/мл обрабатывали 1 М NaOH для получения суспензии с рН ~ 6, после чего агрегированные фибриллы собирали вручную пинцетом и растворяли в 0,8 мл буфера Лэммли с 2 М мочевиной при 50°C в течение 1 часа. После центрифугирования в течение 1 мин при 13 400 об/мин отбирали 10 мкл супернатанта и подвергали его электрофоретическому анализу в присутствии белковых стандартов с молекулярной массой от 10 до 250 кДа. В конце прогона гель окрашивали раствором Кумасси. Последующее обесцвечивание проводили в течение двух часов раствором, содержащим 30% метанола и 10% уксусной кислоты. Изображения геля получали с помощью системы визуализации Invitrogen iBright CL1500 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.8. Анализ коллагеновых матриц

2.8.1. Выход электрофоретического осаждения

Для вычисления выхода ЭФО-ППБ коллагеновые матрицы после сушки взвешивали на весах и полученную массу делили на теоретическое содержание коллагена в суспензии, залитой в установку в течение всех циклов по формуле:

$$\eta = \frac{m_d}{V \times C} \times 100\% \quad (1)$$

где η – выход ЭФО-ППБ, m_d – масса сухой коллагеновой матрицы, V – объем залитой суспензии, C – концентрация коллагена в суспензии.

2.8.2. Индекс сшивки

Индекс сшивки определяли по реакции между нингидрином и остаточными аминогруппами в матрицах ($n = 5$ в каждой группе). Для его определения высушенные одинаковые навески сшитых и несшитых коллагеновых матриц замачивали в ФСБ в течение ночи при 4°C. Затем гидратированные образцы

помещали в водный раствор цитрата (рН 5,0), содержащий 1,0% (мас./Об.) нингидрина, и нагревали до 95°C в течение 20 мин. Далее растворы охлаждали до 25°C, и их оптическая плотность (OD) была измерена при 567 нм с использованием спектрофотометра Victor Nivo 3S Microplate Reader (PerkinElmer, США). Индекс сшивки определяли как относительное изменение (в процентах) оптической плотности растворов со сшитыми матрицами по сравнению с несшитыми образцами по формуле:

$$CI = \frac{OD_n - OD_c}{OD_n} \times 100 \quad (2)$$

где CI – индекс сшивки, OD_n – оптическая плотность раствора с несшитым образцом, OD_c – оптическая плотность раствора со сшитым образцом.

2.8.3. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИК-Фурье спектроскопию коллагеновых матриц проводили с помощью ИК-Фурье спектрометра Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, США), данные собирали в спектральном диапазоне 4000–500 cm^{-1} с разрешением 0,5 cm^{-1} . Все спектры первоначально получали в режиме аттенюированного полного отражения и преобразовывали в режим ИК-пропускания. Спектры коллагена нормализовали с использованием интенсивности полосы Амида I в качестве внутреннего стандарта.

2.8.4. Набухаемость

Предварительно высушенные образцы коллагеновых матриц ($n = 5$ в каждой группе) сначала взвешивали, после чего их помещали в ФСБ на ночь в холодильник при 4°C. Далее матрицы зажимали между двумя листами фильтровальной бумаги, чтобы удалить излишки влаги, и опять взвешивали. Набухание измеряли как изменение (в процентах) массы коллагеновой матрицы по формуле:

$$S = \frac{m_w - m_d}{m_d} * 100\% \quad (3)$$

где S – набухаемость, m_w – масса влажной матрицы, m_d – масса сухой матрицы.

2.8.5. Температура сваривания

Измерения температуры сваривания, которые оценивают степень сшивки коллагеновых матриц, выполняли гидротермальным методом с использованием специально созданной лабораторной установки. Полоски коллагеновых матриц ($n = 5$ в каждой группе) размером 20×3 мм помещали в стеклянную трубку, которую погружали в водяную баню, заполненную дистиллированной водой. Температуру водяной бани увеличивали примерно на 5°C / мин. Температуру, при которой наблюдалось сокращение матрицы (сваривание), регистрировали двумя термометрами разных моделей для лучшей точности.

2.8.6. Механические свойства

Механические свойства сшитых и несшитых коллагеновых матриц ($n = 5$ в каждой группе) испытывали во влажных условиях с использованием микромеханической испытательной системы Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Испытания образцов во влажных условиях проводили после их ночной инкубации с ФСБ при 4°C . Предел прочности, деформацию при разрыве и модуль упругости (модуль Юнга, рассчитанный в линейной области кривой напряжение-деформация) измеряли в режиме одноосного растяжения не менее, чем для пяти прямоугольных образцов размером 30×5 мм. Одноосное растяжение проводили со скоростью $0,1$ мм/с до достижения разрушения. Параметры рассчитывали по кривым деформации в соответствии с протоколом производителя.

2.8.7. Сканирующая электронная микроскопия

Визуализацию микроструктуры матриц проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) EVO LS10 [Zeiss, Германия] в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), наблюдения проводили при ускоряющем напряжении 21 кВ и токе на образце 40–70 пА, с использованием детектора обратно рассеянных (отраженных) электронов. При подготовке образцов к исследованию их промывали физиологическим солевым раствором и дистиллированной водой, разрезали поперек лезвием микротомы, высушивали на воздухе и помещали в камеру сканирующего электронного микроскопа.

2.8.8. Измерение остаточной ДНК

Для определения остаточного содержания ДНК сухие образцы матриц ($n = 5$ в каждой группе) в количестве 1 мг добавляли к 0,25 мг коллагеназы А из *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich, США) в Трис-буфере (50 mM, pH 7,4, с 10 mM CaCl₂) и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании. Для количественного определения ДНК использовали наборы для выделения ДНК (Evrogen, Россия), и измерения (QuantiFluor TM, Promega, США) проводили в соответствии с инструкциями производителей.

2.8.9. Плотность матриц

Для определения плотности коллагеновых матриц их сухой вес делили на умноженные линейные размеры (длина, ширина, толщина), измеренные с помощью цифрового штангенциркуля (Mitutoyo, Япония).

2.9. Анализ биосовместимости матриц *in vitro*

2.9.1. Экстракционный тест

Для оценки непрямой цитотоксичности использовали экстракционный тест, адаптированный из ISO 10993 [185]. Экстракты готовили путем инкубации образцов коллагеновых матриц площадью 3 см² в 1 мл культуральной среды в течение 24 часов при 37°C (n = 5 в каждой группе). Далее экстракты добавляли к клеткам, прекультивированным в течение 24 часов, и культивировали их далее в течение 24 часов. В качестве положительного контроля использовали серийные разведения додецилсульфата натрия. Метаболическую активность клеток анализировали с помощью теста с резазурином (AlamarBlue™; Invitrogen, Waltham, США) в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Victor Nivo (PerkinElmer, Waltham, США) при длине волны возбуждения 530 нм и длине волны испускания 590 нм. Количество ДНК анализировали с помощью набора Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, Waltham, США) в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность флуоресценции определяли при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны испускания 520 нм.

2.9.2. Контактная цитотоксичность

Для определения жизнеспособности клеток, культивированных на коллагеновых матрицах, использовали линию клеток 3T3 и МСК из пуповины. Поверхности матриц (n = 5 в каждой группе) заселяли данными типами клеток в концентрации 3×10^4 /см² и инкубировали в течение 7 дней. Для визуализации жизнеспособности клеток на коллагеновых матрицах проводили окраску живых и мертвых клеток (тест Живой/Мертвый). Живые клетки окрашивали 0.5 мг/мл кальцеином (Calcein-AM, Sigma-Aldrich, Германия), мертвые – 1.5 мкмоль йодидом пропидия (ThermoFisher Scientific, США), также были окрашены ядра

(0.004 мг/мл Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окраску клеток на матрицах проводили в течение 30 мин при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем образцы отмывали средой DMEM/F12 (1:1, БиолоТ, Россия) 3 раза и анализировали лазерным сканирующим конфокальным микроскопом LSM 880 (Zeiss, Германия). Кроме того, измеряли метаболическую активность клеток и количество ДНК по методологии, описанной выше (п. 2.9.1), а затем проводили нормализацию первого показателя.

2.9.3. Морфологическое исследование клеток

Для морфологической оценки клетки, культивированные на поверхности коллагеновых матриц, изучали методом СЭМ на приборе EVO LS10 (Carl Zeiss, Германия), оснащенный катодом LaB₆. Перед исследованием их контрастировали с помощью наборов BioREE и BioREE-B в соответствии с инструкцией производителя (Глаукон, Россия).

Также образцы матриц окрашивали для выявления экспрессии в клетках виментина. Матрицы фиксировали в 4% растворе параформальдегида (pH 6.9, Sigma-Aldrich, Германия) в течение ночи при температуре 4°C, затем трижды отмывали от фиксатора в ФСБ (pH 7.4). После этапов пермеабиллизации (10 мин, 0.2% раствор Triton X-100, PanReac AppliChem, США) и блокирования (10 мин, 5% фетальной телячьей сыворотки, HyClone, США) матрицы с клетками инкубировали в течение 48 часов при 4°C с первичными антителами против виментина (1:1000, Abcam, Великобритания). Растворы первичных антител содержали 0,1% Triton X-100 для улучшения проницаемости мембраны. Затем образцы трижды промывали ФСБ (pH 7.4) и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:1000, Thermo Scientific, США) при комнатной температуре в темноте в течение 4 часов. Ядра клеток контрастировали бисбензимином (Hoechst 33258, Thermo Scientific, США). Окрашенные образцы анализировали с применением лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Zeiss, Германия).

2.10. Анализ имплантационного материала

2.10.1 Гистологическое исследование

Иссеченные ткани у крыс в области подкожной имплантации или у кроликов в области уретры фиксировали в нейтральном 10% забуференном формалине с последующей стандартной гистологической обработкой и заливкой в парафиновые блоки. Срезы образцов ткани толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э), пикросириусом красным (ПСК) и по Маллори. Для исследования и визуализации образцов использовали светодиодный микроскоп LEICA DM4000 B, оснащенный цифровой камерой LEICA DFC7000 T с программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Образцы исследовали с помощью стандартной оптической микроскопии (для образцов, окрашенных Г&Э и ПСК), фазово-контрастной микроскопии (для образцов, окрашенных Г&Э) и микроскопии в поляризованном свете (образцы, окрашенные ПСК).

2.10.2. Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического анализа срезы образцов тканей толщиной 4 мкм, зафиксированные в формалине и парафине, депарафинировали и инкубировали с 3% H_2O_2 в течение 10 мин. Термоиндуцированную демаскировку антигенов проводили с помощью цитратного буфера натрия при pH 6,0 на водяной бане с температурой 80°C в течение 30 мин. Неспецифическое окрашивание предотвращали блокирующим раствором (Cell Marque, США), и образцы инкубировали с мышинными моноклональными первичными антителами против α -SMA [A2547, Merck, США, разведение 1:400]. Визуализацию проводили с помощью вторичных козьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (G-21040, Invitrogen, США, разведенные 1:1000), и диаминобензидином с контрастным окрашиванием гематоксилином.

2.10.3. Морфометрия

Морфометрический анализ был проведен в программном обеспечении LAS V4.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия).

При подкожной имплантации для коллагеновых матриц в каждом гистологическом образце рассчитывали среднюю толщину не менее чем в 5 измерениях, расположенных на расстоянии ~400 мкм друг от друга в центре места имплантации. Расстояние резорбции рассчитывали как вычитание средней толщины матрицы на требуемом ПОД из средней толщины матрицы на ПОД 3. В каждом образце, окрашенном антителами α -SMA, подсчитывали миофибробласты в 10 или более полях зрения периимплантных тканей (увеличение $\times 400$, горизонтальный край микрофотографии располагали на границе с материалом импланта).

В каждом образце, окрашенном Г&Э, клетки инородных тел подсчитывали в 10 или более полях зрения периимплантных тканей (увеличение $\times 400$, с горизонтальным полем микрофотографии на границе с материалом импланта). Из подсчитанного количества рассчитывали средние значения миофибробластов и клеток инородных тел на исследованных участках периимплантных тканей и выражали в клетках/ мм^2 . Доля соединительнотканых прослоек оценивалась как отношение их общей толщины к общей толщине импланта по крайней мере для 5 измерений, расположенных на расстоянии ~400 мкм друг от друга в центре места имплантации.

При аугментационной уретропластике в каждом препарате оценивали 5 признаков морфологических изменений: (1) регенерация уротелия, (2) восстановление сосочков, (3) фибротические изменения, (4) воспалительная инфильтрация (макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами и эозинофилами), (5) резорбция матрицы по 5-балльной шкале (где 0 – признак отсутствует, 1 – минимальная интенсивность признака, 2 – средняя интенсивность признака, 3 – выраженное проявление признака, 4 – максимальная интенсивность).

2.11. Анализы в рамках LIFT-биопечати

2.11.1. Реологические испытания

Реологические свойства гидрогелевого слоя коллекторной подложки характеризовали с помощью реометра Physica MCR 302 (Anton Paar, Австрия) с геометрией пластина-пластина (диаметр 25 мм) при 25°C. Испытание с разверткой по амплитуде деформации проводили при фиксированной частоте 1 Гц для определения диапазона линейной вязкоупругости, а испытание с разверткой по частоте проводили для вязкоупругой характеристики. Испытания повторяли не менее пяти раз, измеряли модуль сохранения, G' (Па), и модуль потерь, G'' (Па). Вязкость биочернил измеряли с помощью вискозиметра EMS-1000 (Kyoto Electronics, Япония) при температуре 25°C и 200 об/мин.

2.11.2. Выживаемость сфероидов

После биопечати сфероидов и обработки тромбином гидрогеля на коллекторной подложке затвердевший гидрогелевый слой покрывали ростовой средой. Сфероиды внутри гидрогелевого слоя инкубировали в течение 3 дней после хаотичной LIFT-биопечати (для количественного теста Живой/Мертвый и подсчета их расплывания) и печати модельного ТИК и в течение 1 дня после прецизионной LIFT-биопечати (для окрашивания Живой/Мертвый) при 37°C, 5% CO₂.

Методология окраски для анализа Живой/Мертвый была ранее описана в п. 2.9.2. Визуализацию образцов проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 800 (Carl Zeiss, Германия). Для количественной оценки показателя «Живой/Мертвый» изображения анализировали с помощью программы ImageJ (NIH, США). Долю живых/мертвых клеток в сфероидах (n=15) измеряли с помощью разделения цветовых каналов, а затем значения флуоресценции пересчитывали в проценты.

2.11.3. Распластывание сфероидов

Величину распластывания рассчитывали на основе общей площади сфероида, ограниченной его отростками ($n = 15$ для каждой группы). Фотографии для подсчета значения распластывания получали при помощи фазово-контрастной микроскопии Axio Observer (Zeiss, Германия).

2.11.4. Гистологический анализ

Образцы созданных биопечатью ТИК заключали в среду для заморозки (O.C.T. Compound, ServiceBio, Китай), после чего на криостате Eprexia HM525 NX (Thermo Scientific, США) из них изготавливали криосрезы толщиной 16 мкм. Гистологическую оценку выполняли посредством окрашивания срезов Г&Э. На финальном этапе образцы заключали в Витрогель (БиоВитрум, Россия). Изображения получали с помощью микроскопа Leica DM1000 LED (Leica Microsystems, Хеербругг, Швейцария).

2.12. Статистическая обработка

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США). Для проверки нормальности распределения данных использовали тест Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения для сравнения групп использовали критерий Стьюдента или двусторонний дисперсионный анализ (двусторонний ANOVA) с использованием теста Тьюки; результаты были представлены как среднее \pm стандартное отклонение. В случае дискретных данных сравнение проводили с помощью критериев Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса с использованием теста Данна; результаты были представлены в виде медианных значений и интерквартильного размаха. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Коллагеновые матрицы ЭФО-ППБ

3.1.1. Анализ экстрагированного коллагена

При исследовании экстрагированного коллагена с помощью фазово-контрастной микроскопии и АСМ (Рисунок 12), как правило, коллаген представлял собой суспензию фибрилл (Рисунок 12А), плотно переплетенных друг с другом. При большем увеличении (Рисунок 12Б) можно увидеть фибриллы разной длины, диаметра и формы. Для более детального анализа морфологии фибрилл была проведена их атомно-силовая микроскопия, которая показала, что суспензия коллагена состоит из двух типов фибрилл: прямых и зигзагообразных. Первые представляли собой правильные толстые и крупные интактные фибриллы с четко сохранившейся D-периодичностью (Рисунок 12В). Последние (Рисунок 12Г) представляли собой частично поврежденные фибриллы в виде зигзагообразных «пружин», также с D-периодичностью, но содержащие мантию из раскрученных субфибриллярных структур.

Для более точной характеристики экстрагированного коллагена на основе фотографий фазового контраста и атомно-силовой микроскопии была определена средняя длина и диаметр коллагеновых фибрилл (Рисунок 13). Медиана длины фибрилл составила 158 [26; 470] мкм, а медиана диаметра – 292 [117; 667] нм.

Выделенные образцы коллагена были подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле для подтверждения их чистоты и принадлежности типу I (Рисунок 14А). Электрофоретический анализ выявил наличие двух полос на полиакриламидном геле, соответствовавших цепям $\alpha 1$ (I) (~137 кДа) и $\alpha 2$ (I) (~125 кДа), типичных для коллагена типа I. Кроме того, изоэлектрическая точка коллагена, исходя из анализа его дзета-потенциала при различных значениях pH, была равна ~5.6 (Рисунок 14Б).

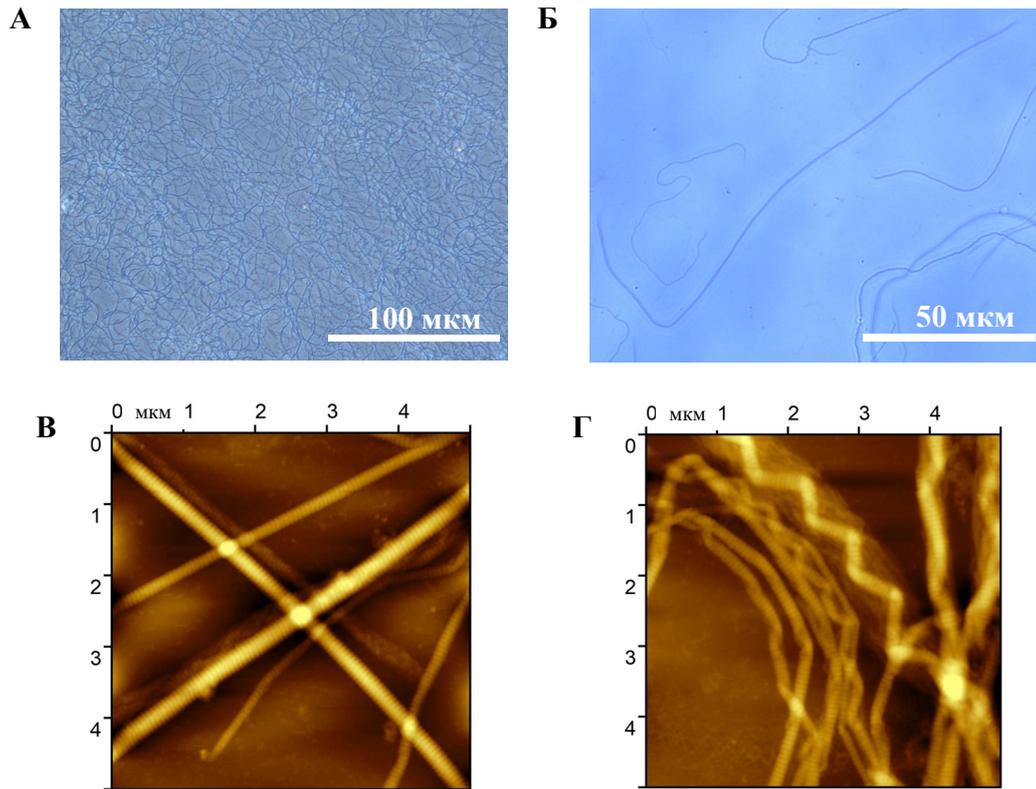


Рисунок 12 – Фибриллярная структура коллагена. А) Общий вид структуры коллагеновых фибрилл, фазово-контрастная микроскопия. Б) Детальное изображение коллагеновых волокон разной длины, диаметра и формы, фазово-контрастная микроскопия. Анализ АСМ показал наличие как нормальных фибрилл с сохранной D-периодичностью (В), так и поврежденных с зигзагообразной формой и субфибриллярной мантией (Г)

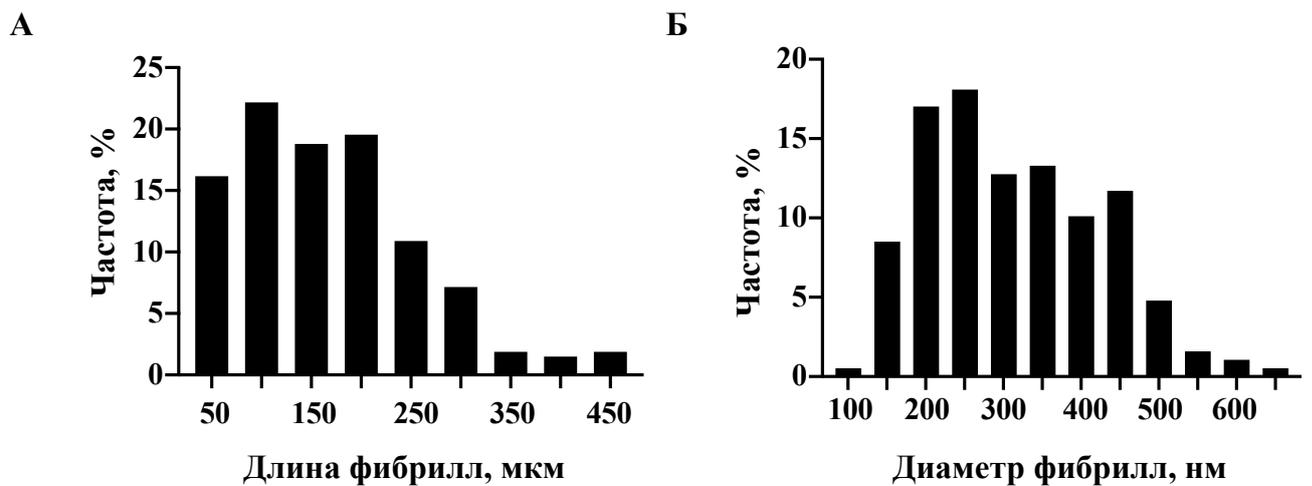


Рисунок 13 – Распределение фибрилл по длине (А) и диаметру (Б)

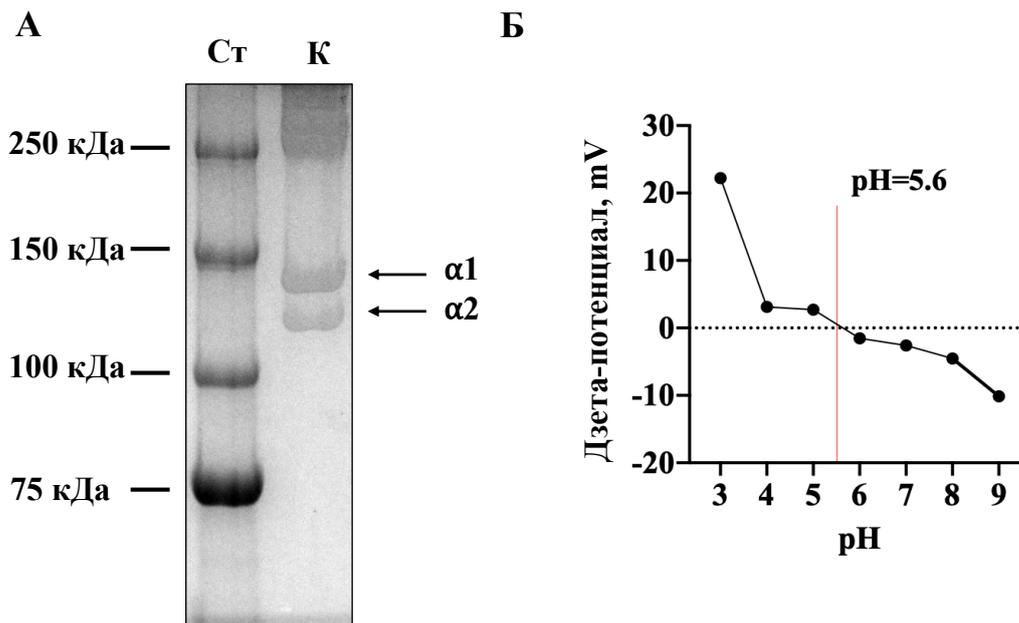


Рисунок 14 – Характеризация экстрагированного коллагена при помощи гель-электрофореза (А) и анализа его дзета-потенциала (Б). Ст – образцы стандарта с различной молекулярной массой, К – коллагеновый образец

3.1.2. Производство коллагеновых матриц

Разработанный авторами метод электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером был применен для производства коллагеновых матриц. На Рисунке 15 показан внешний вид матриц после ЭФО коллагена с полупроницаемым барьером (Рисунок 15А) в сравнении с ЭФО без полупроницаемого барьера (Рисунок 15Б) и сушкой коллагеновой суспензии на воздухе (Рисунок 15В). Образовавшаяся на полупроницаемом барьере коллагеновая матрица представляет собой плотную и полностью бездефектную структуру.

При ЭФО без барьера формировавшиеся на катоде пузырьки водорода не позволили сформироваться на нем бездефектной коллагеновой матрице, и вся ее поверхность была изрешечена ими. Такая структура матрицы сделала ее непригодной даже для снятия с катода, поскольку при этом она моментально разрывалась и скатывалась в коллагеновые сгустки.

Матрицы, полученные сушкой на воздухе в прямоугольной сушильной форме, были лучшего, чем предыдущие, качества. Тем не менее в их структуре также содержались дефекты (пузыри), поскольку процесс заливки коллагена в форму и его равномерное распределение были неизбежно связаны с введением в суспензию пузырьков.

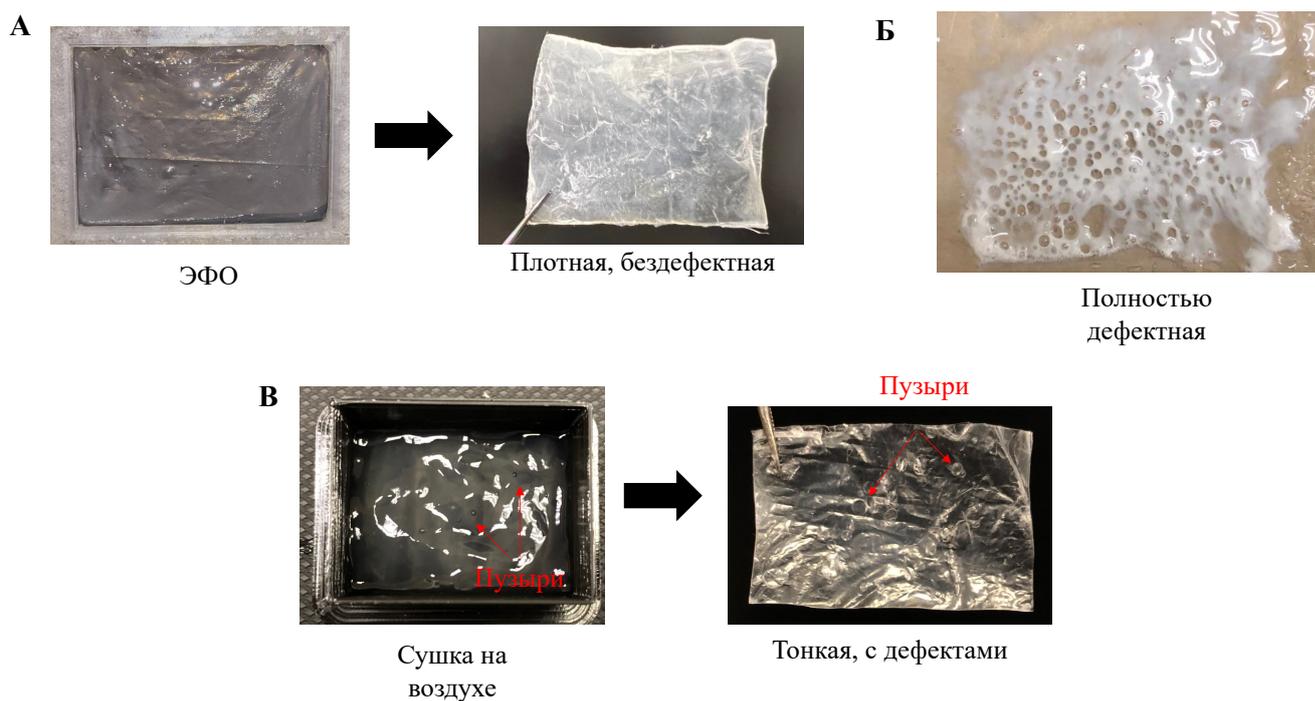


Рисунок 15 – Матрицы коллагена, полученные разными способами.
 А) Коллагеновые матрицы, полученные ЭФО с полупроницаемым барьером.
 Б) Коллагеновые матрицы, полученные ЭФО без полупроницаемого барьера.
 В) Коллагеновые матрицы, полученные сушкой коллагеновой суспензии на воздухе

Как видно из Рисунка 16А, выход первых двух циклов осаждения был близок к 90%, в то время как при третьем цикле осаждения его значения падали до 60%. Однако несмотря на это, финальная плотность матриц с различным количеством циклов осаждения оставалась постоянной и равнялась 0.0012 г/мм^3 , в то время как у матриц, высушенных на воздухе, плотность достигала всего 0.0008 г/мм^3 (Рисунок 16Б), и различие между ними было статистически значимым. Внешне по мере увеличения количества циклов осаждения (Рисунок

16В), коллагеновые матрицы приобретали все большую толщину и становились более непрозрачными.

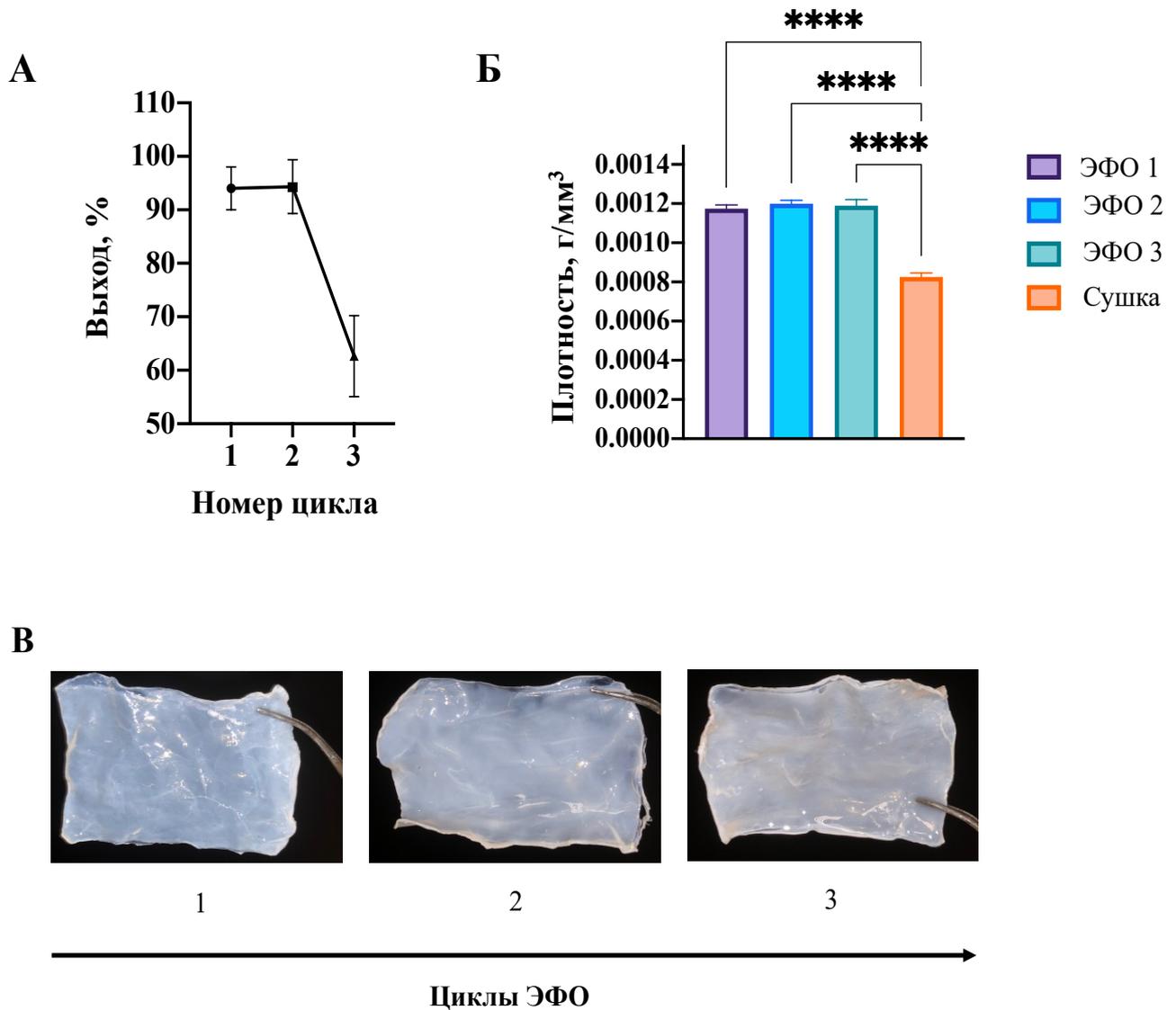


Рисунок 16 – Характеристики ЭФО коллагена. А) Выход осаждения коллагена после ЭФО-ППБ в зависимости от цикла. Б) Плотность матриц ЭФО-ППБ и матриц, высушенных на воздухе. В) Внешний вид матриц, полученных ЭФО-ППБ с различным количеством циклов. ЭФО1/2/3 – матрицы, полученные в результате 1/2/3 цикла ЭФО-ППБ; Сушка – полученные сушкой на воздухе матрицы. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. **** $P < 0,0001$

ИК-спектры ЭФО-ППБ и высушенных на воздухе матриц не имели различий (Рисунок 17А), и, следовательно, процесс электрофоретического осаждения не повлиял на химическую природу полученных матриц. Спектры показали типичные пики для коллагена типа I со значениями поглощения

амидной связи I при 1634 см^{-1} , амидной связи II при 1547 см^{-1} , амидной связи III при 1238 см^{-1} , амидной связи A при 2970 см^{-1} и амидной связи B при 3203 см^{-1} . Однако матрицы ЭФО-ППБ и матрицы, полученные сушкой, отличались в количестве остаточной ДНК (Рисунок 17Б): для матриц, полученных сушкой, этот параметр был выше в 1,5 раза.

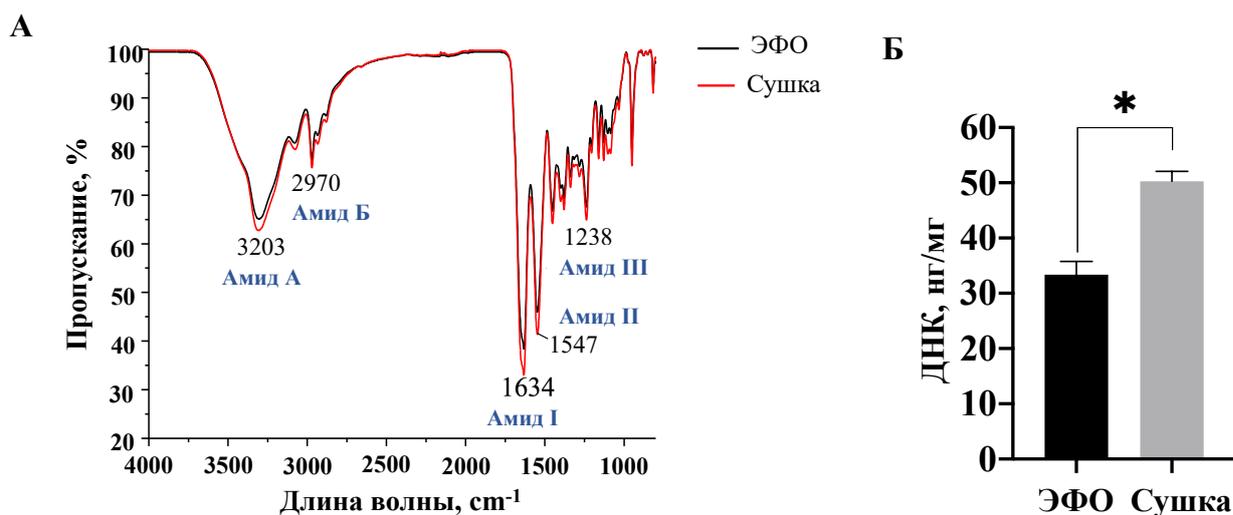


Рисунок 17 – Сравнение ИК-спектра (А) и остаточной ДНК (Б) матриц ЭФО-ППБ и высушенных на воздухе. ЭФО – матрицы, полученные в результате ЭФО-ППБ; Сушка – полученные сушкой на воздухе матрицы. Б – данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$

Индекс химической сшивки образцов генипином был одинаковым для всех типов матриц, и его значение составило $\sim 13\%$ (Таблица 1). Также с ростом увеличения степени сшивки уменьшилась и набухаемость матриц. В случае несшитых образцов степень набухания составила около 400% . Для сшитых образцов степень набухания уменьшилась почти вчетверо до 100% . В целом между группами не наблюдалось статистической разницы. Из-за сшивки возрастала и температура сваривания образцов: в случае несшитой группы средняя температура сваривания для каждого образца была равна $\sim 50^\circ\text{C}$, в то время как в группах со сшивкой эта температура равнялась $68\text{--}69^\circ\text{C}$.

Таблица 1 – Параметры коллагеновых матриц, связанные со сшивкой генипином

Матрица	Индекс сшивки, %	Температура сваривания, °С	Набухаемость, %	Толщина, мкм
Несшитая ЭФО1/2/3	0	49.9 ± 0.6	409 ± 26	53 ± 8/ 110 ± 12/ 140 ± 5
Несшитая Сушка	0	49.3 ± 0.8	418 ± 61	65 ± 12
Сшитая ЭФО1/2/3	13.7 ± 0.4	68.5 ± 0.7	102 ± 11	35 ± 5/ 75 ± 8/ 94 ± 8
Сшитая Сушка	13.6 ± 0.9	68.4 ± 0.6	102 ± 13	42 ± 5

Примечание. ЭФО1/2/3 – матрицы, полученные в результате 1/2/3 цикла ЭФО-ППБ; Сушка – матрицы, полученные сушкой на воздухе.

3.1.3. Микроструктурные и механические свойства

На микроструктурном уровне матрицы ЭФО-ППБ и полученные сушкой имели как сходства, так и различия (Рисунок 18). Заметно, что поверхности всех образцов имели плотноупакованную фибриллярную структуру. Поверхности несшитых образцов в обоих случаях были гладкими, однако на них присутствовали тени, свидетельствующие о наличии подповерхностных областей разрежения матрицы. Поверхности сшитых образцов были гладкими в обоих случаях и характеризовались меньшим количеством подповерхностных теней по сравнению с несшитыми образцами.

Напротив, поперечные срезы несшитых матриц значительно различались: срез образца ЭФО-ППБ имел однородную структуру, тогда как срез образца сушки имел гетерогенную структуру с различной плотностью упаковки коллагеновых слоев для его верхней (более темной – разреженной) и нижней (более светлой – плотной) частей.

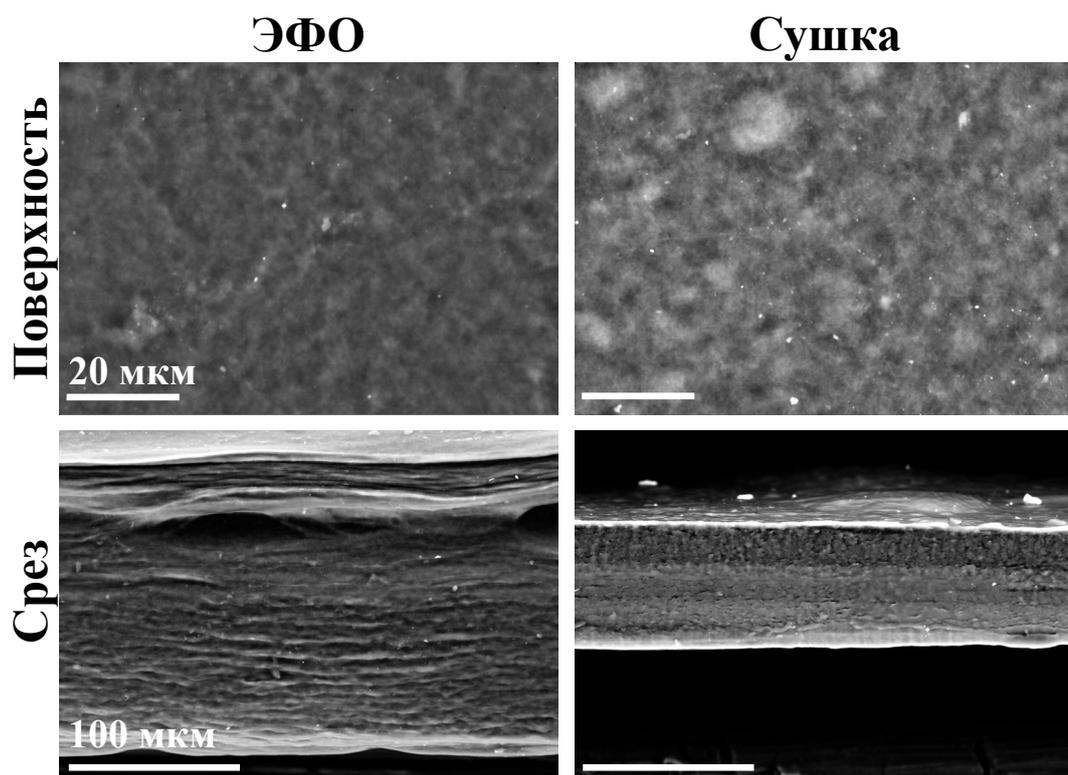
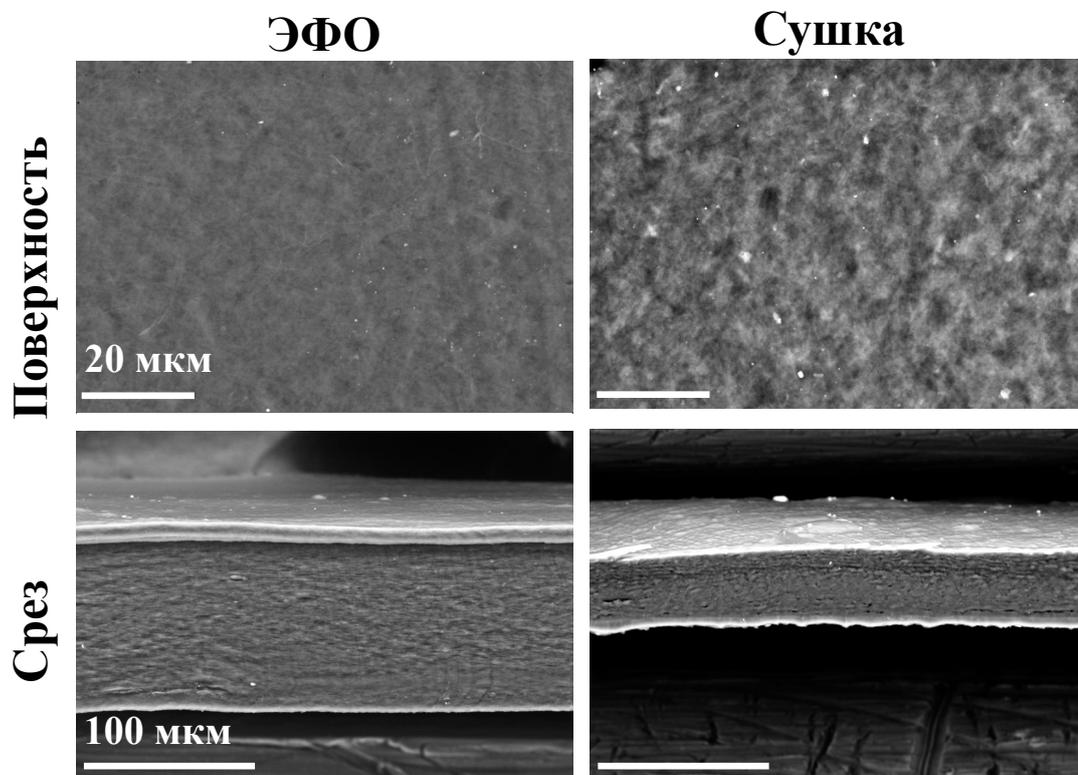
Несшитые**Сшитые**

Рисунок 18 – Снимки микроструктуры несшитых и сшитых матриц, полученных ЭФО-ППБ и сушкой на воздухе, сканирующая электронная микроскопия

Кроме того, сшитые образцы ЭФО-ППБ имели значительно более компактную и прочную структуру без участков разрежения по сравнению с образцами сушки, в структуре которых все же имелись участки разрежения матрицы.

При сравнении модулей Юнга в группе несшитых матриц ЭФО-ППБ мы наблюдали различия в зависимости от числа циклов ЭФО-ППБ (Рисунок 19). У матриц после 1, 2 и 3-го циклов ЭФО-ППБ статистически значимо увеличивался модуль Юнга, в то время как контрольные матрицы, полученные воздушной сушкой, имели модуль Юнга, который был сравним с таковым для матриц 1-го цикла (Таблица 2).

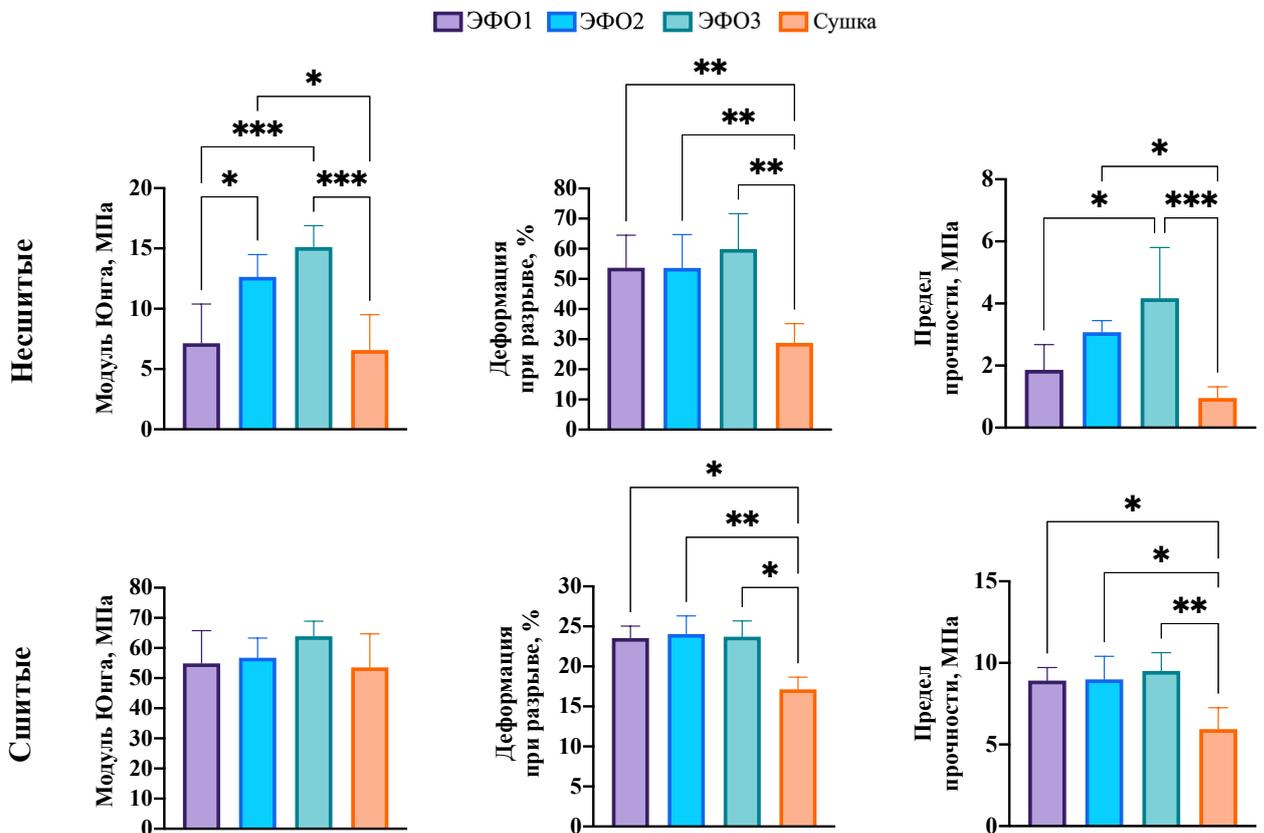


Рисунок 19 – Механические свойства несшитых и сшитых коллагеновых матриц. ЭФО1/2/3 – матрицы, полученные в результате 1/2/3 цикла ЭФО-ППБ; Сушка – матрицы, полученные сушкой на воздухе. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Для матриц 1-го цикла и высушенных на воздухе также стоит отметить высокую вариабельность модуля Юнга, которая для матриц ЭФО-ППБ

становилась меньше с увеличением числа циклов осаждения. При сравнении деформаций при разрыве несшитых образцов все типы матриц ЭФО-ППБ показали статистически значимые более высокие значения по сравнению с матрицами, полученными сушкой.

Таблица 2 – Механические свойства матриц ЭФО-ППБ в сравнении с высушенными на воздухе

Матрица	Модуль Юнга, МПа	Деформация при разрыве, %	Предел прочности, МПа
Несшитые ЭФО1/2/3	7.1 ± 3.3/ 12.6 ± 1.8/ 15.1 ± 1.8	54 ± 11/ 54 ± 11/ 60 ± 12	1.9 ± 0.8/ 3 ± 0.4/ 4.2 ± 1.6
Несшитые Сушка	6.6 ± 3	28 ± 6	1 ± 0.4
Сшитые ЭФО1/2/3	58 ± 12/ 57 ± 7/ 64 ± 5	23.5 ± 1.5/ 24.0 ± 2.3/ 23.7 ± 2.0	8.9 ± 0.8/ 9 ± 1.4/ 9.5 ± 1.1
Сшитая Сушка	58 ± 11	17.1 ± 1.5	5.9 ± 1.3

Примечание. ЭФО1/2/3 – матрицы, полученные в результате 1/2/3 цикла ЭФО-ППБ; Сушка – матрицы, полученные сушкой на воздухе.

Предел прочности несшитых матриц ЭФО-ППБ изменялся с аналогичной для модулей Юнга тенденцией и увеличивался с возрастанием числа циклов осаждения. Для матриц, полученных сушкой, значение предела прочности было ближе к таковому для матриц 1-го цикла ЭФО-ППБ, и оно было статистически значимо ниже, чем у матриц 2-го и 3-го циклов.

Сшивка матриц генипином приводила к значительному увеличению модуля Юнга и одновременному уменьшению его различий как внутри группы ЭФО-ППБ, так и в сравнении с высушенными на воздухе. Однако для сшитых матриц ЭФО-ППБ значения деформации при разрыве и предела прочности были значительно выше, чем для полученных сушкой матриц. Типичные кривые напряжения-деформации для испытанных матриц показаны на Рисунке 20.

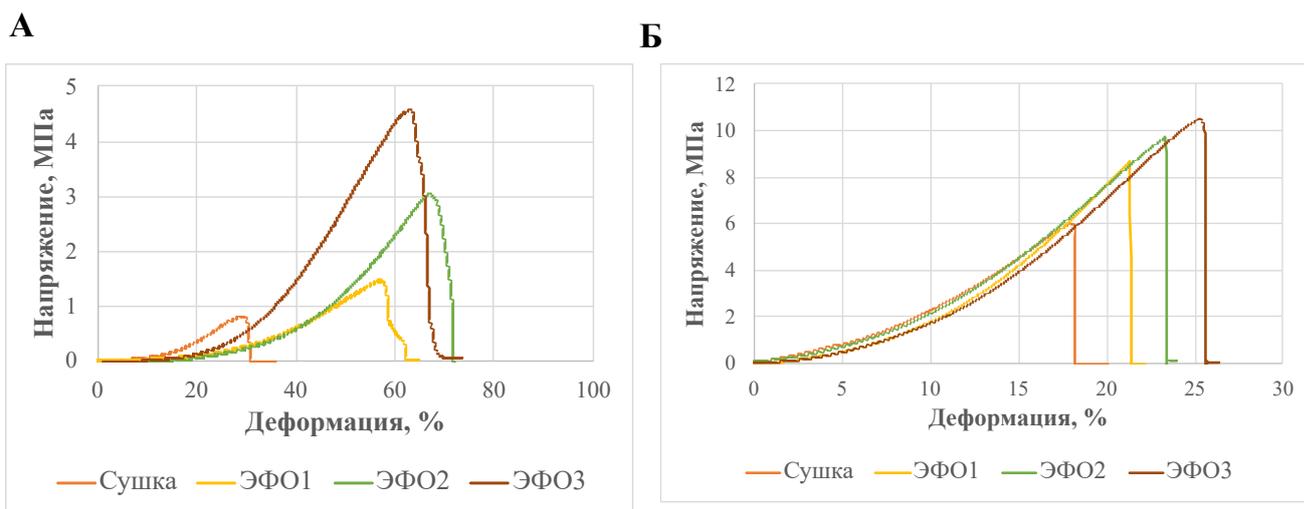


Рисунок 20 – Типичные кривые напряжения-деформации для несшитых (А) и сшитых (Б) коллагеновых матриц. ЭФО1/2/3 – матрицы, полученные в результате 1/2/3 цикла ЭФО-ППБ; Сушка – матрицы, полученные сушкой на воздухе

3.1.4. Биосовместимость *in vitro*

Окраска Живой/Мертвый позволяет визуализировать жизнеспособные клетки, которые окрашиваются в зеленый цвет, и мертвые клетки, окрашивающиеся в красный цвет. Окрашивание Живой/Мертвый показало, что после 7 дней культивирования большинство клеток оставались жизнеспособными, и только отдельные клетки были мертвы; клетки образовывали плотный монослой на поверхности матриц обоих типов (Рисунок 21). Матрицы ЭФО-ППБ, таким образом, позволяют клеткам прикрепляться и пролиферировать вне зависимости от их сшивки генипином.

Количественный анализ показал, что нормализованная метаболическая активность незначительно отличалась в зависимости от типа клеток и матриц: МСК были более метаболически активны при культивировании на несшитых матрицах, в то время как клетки 3Т3 были более активны на сшитых (Рисунок 22).

Согласно тесту с Аламаровым синим и PicoGreen® сшивка генипином также не повлияла на токсические свойства матриц в отношении двух типов клеток (Рисунок 23).

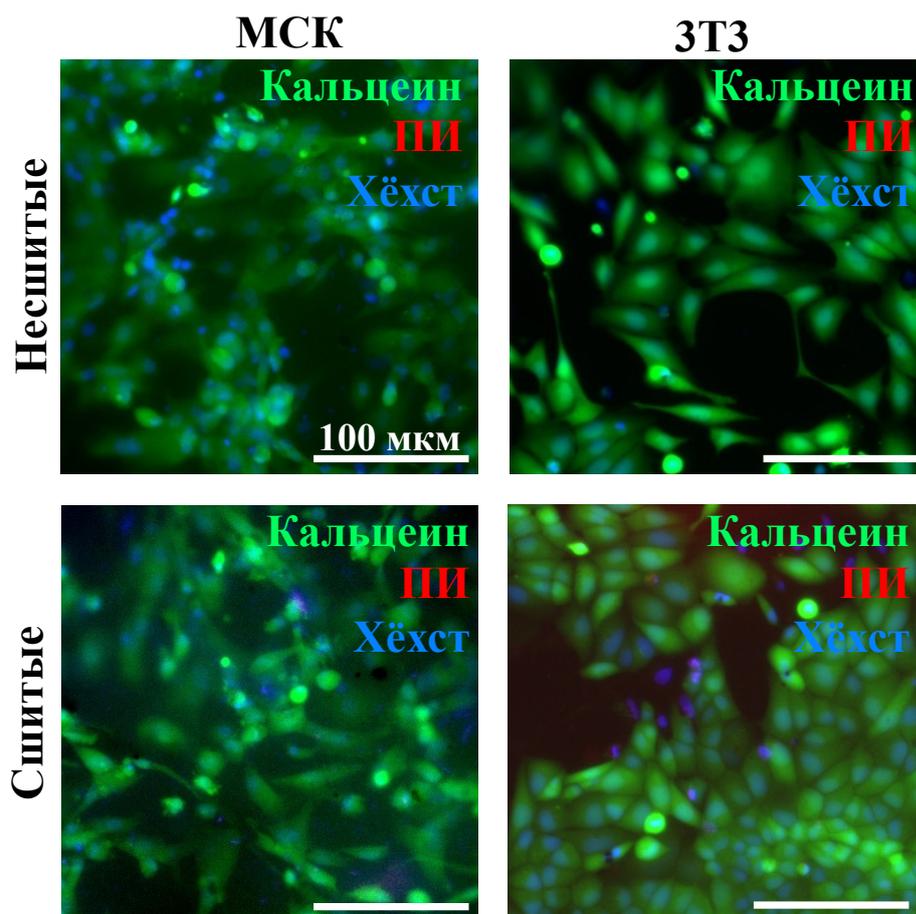


Рисунок 21 – Прямая цитотоксичность, определяемая тестом Живой/Мертвый для клеток МСК и 3Т3, конфокальная микроскопия. Флуоресцентное окрашивание живых клеток (кальцеином, свечение зеленым), мертвых клеток (пропидий йодидом, свечение красным), ядер (хехст, свечение синим)

Метаболическая активность клеток для нулевой концентрации и трехкратной концентрации была одинаковой для сшитой и несшитой матрицы; аналогично количество клеток, исходя из теста с PicoGreen® на ДНК, было одинаково для нулевой и трехкратной концентрации экстракта из сшитых и несшитых образцов. Во всех случаях эти значения были выше 70% от контроля.

Как МСК, так и 3Т3, культивированные на поверхности матриц, имели типичную морфологию и хорошо распластывались (Рисунки 24, 25). Однако сшитые матрицы способствовали меньшему распластыванию и прикреплению к ним клеток (на рисунках клетки выглядят более округлыми), чем в случае несшитых матриц. При конфокальной микроскопии сшитые образцы при визуализации имели аутофлуоресценцию в красном и синем каналах (Рисунок 25).

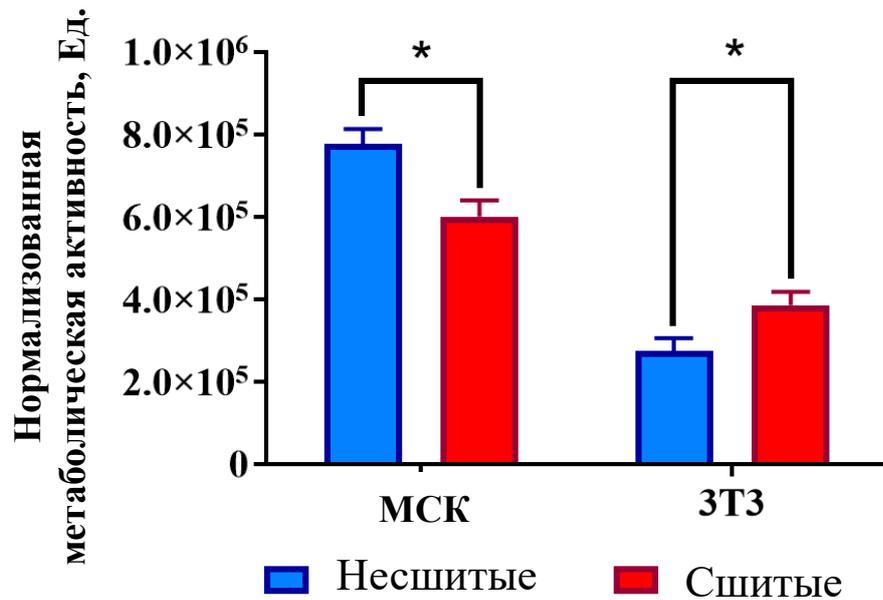


Рисунок 22 – Прямая цитотоксичность для клеток МСК и 3Т3, определяемая нормализованной метаболической активностью. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$

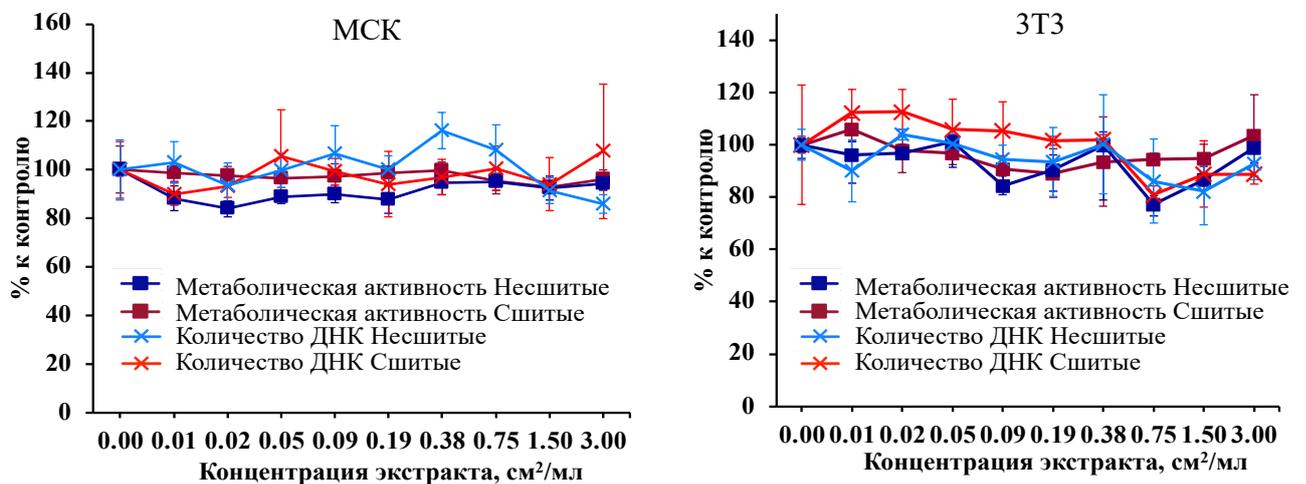


Рисунок 23 – Непрямая цитотоксичность несшитых и сшитых коллагеновых матриц в отношении двух типов клеток – МСК и 3Т3. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение

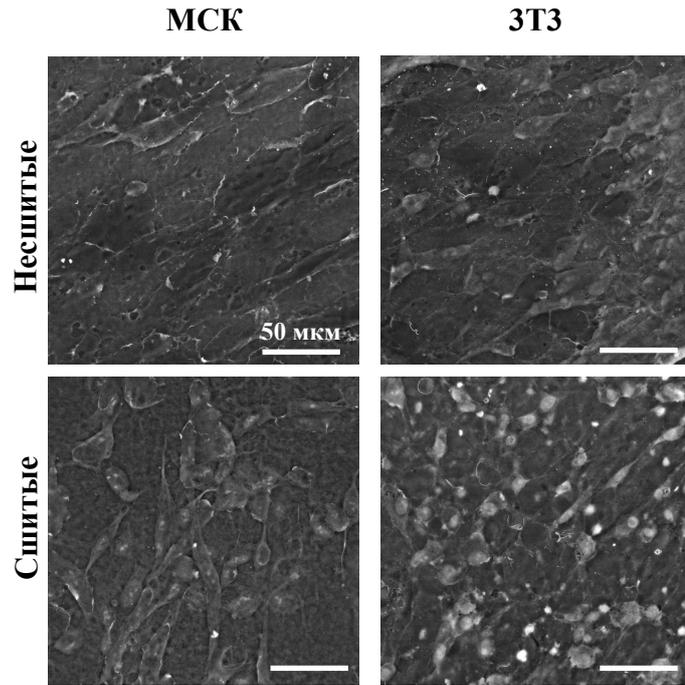


Рисунок 24 – Визуализация морфологии клеток на несшитых и сшитых матрицах, сканирующая электронная микроскопия

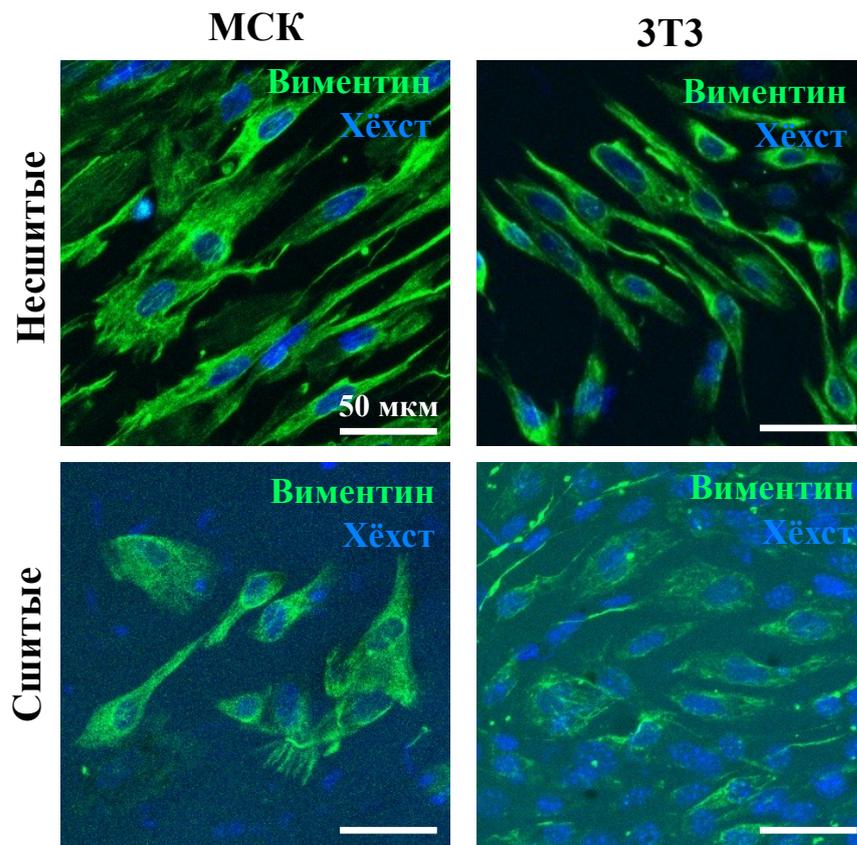


Рисунок 25 – Визуализация морфологии клеток на несшитых и сшитых матрицах, конфокальная микроскопия. Иммунофлуоресцентное окрашивание на цитоскелет (виментин, свечение зеленым), ядра (хехст, свечение синим)

3.1.5. Подкожная имплантация матриц

Начиная с 3-го дня после операции (ПОД3), проводилось гистологическое исследование эксплантированных образцов, и морфометрические параметры несшитых и сшитых матриц были количественно измерены (Рисунок 26).

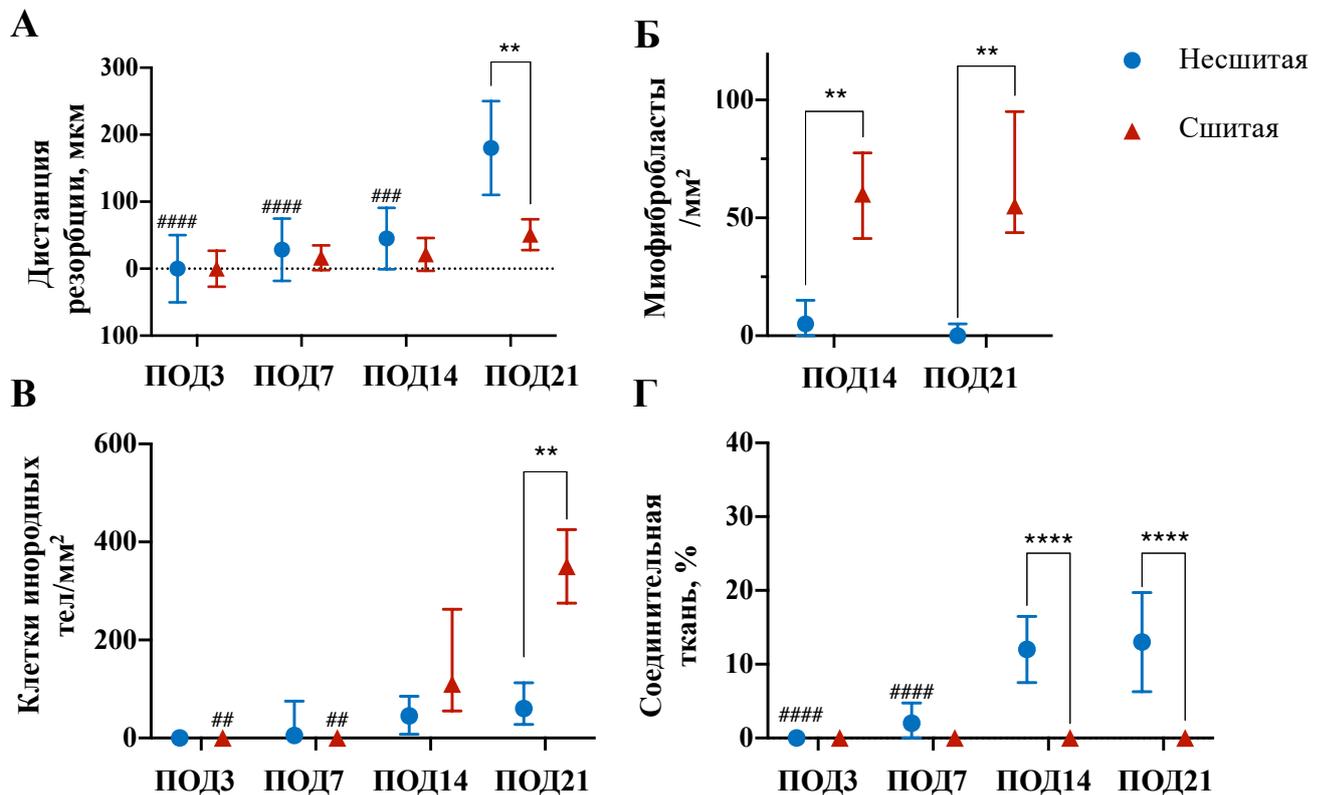


Рисунок 26 – Оценка реакции *in vivo* на несшитые и сшитые матрицы ЭФО-ППБ. А) Дистанция резорбции матриц в абсолютных значениях от толщины на ПОД 3. Б) Количество миофибробластов в 1 мм² вокруг матриц. В) Количество клеток инородных тел в 1 мм² вокруг матриц. Г) Процент врастания соединительной ткани в матрицу. Данные в А, Г представлены как среднее \pm стандартное отклонение, в Б, В – как медиана и интерквартильный размах. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ для сравнения между группами, те же значения P для # при сравнении внутри групп к ПОД 21

На ПОД 3 между подкожной жировой тканью и мышцами спины была идентифицирована несшитая матрица (Рисунок 27А). Коллагеновая матрица была слегка эозинофильной, с толщиной 460 ± 50 мкм и имела ламеллярную структуру (Рисунок 28А). Поверхность импланта была неровной и покрыта слоем фибрина толщиной 200 мкм, инфильтрованным лимфоцитами и макрофагами с

незначительной долей нейтрофилов. Явная резорбция наблюдалась на боковых краях матрицы, где коллагеновый материал был рыхлым и инфильтрированным прослойками иммунных клеток. Окружающие ткани были неповрежденными и содержали единичные полнокровные сосуды. При окрашивании пикросириусом красным и исследовании в поляризованном свете конструкция была анизотропной и имела желтое свечение (Рисунок 29А). Однако свечение нижнего слоя матрицы было красным и тусклым, и эта часть соответствовала третьему циклу ЭФО-ППБ.

На том же сроке наблюдения (ПОДЗ) между жировой тканью и мышцами была идентифицирована сшитая коллагеновая матрица (Рисунок 27Б). Однако визуально матрица отличалась от несшитой. Она имела более эозинофильный цвет, а ее толщина была значительно меньше – всего 160 ± 30 мкм (Рисунок 28Б). Кроме того, она была плотной и твердой и была более гомогенной. Матрица имела неповрежденную поверхность, включая боковые края, и не имела прослоек иммунных клеток. Имплант был окружен слоем фибрина толщиной 200-300 мкм, который был густо инфильтрирован иммунными клетками, преимущественно нейтрофилами. При окрашивании пикросириусом красным и исследовании в поляризованном свете вся матрица имела желтое свечение, что указывало на ее высокую анизотропию, характерную для коллагена (Рисунок 29Б). Следует отметить, что высокая анизотропия указывает на то, что при формировании матрицы и после ее имплантации коллаген имеет такие же свойства, как коллагеновые волокна в тканях.

На седьмой день после операции (ПОД 7) поверхности несшитых матриц были окружены тонким 100 мкм слоем иммунных клеток, преимущественно макрофагов, осуществляющих резорбцию биоматериала (Рисунок 28В). В частности, боковые края матриц стали более рыхлыми, что привело к незначительному распространению прослойки макрофагов и лимфоцитов в основной объем материала.

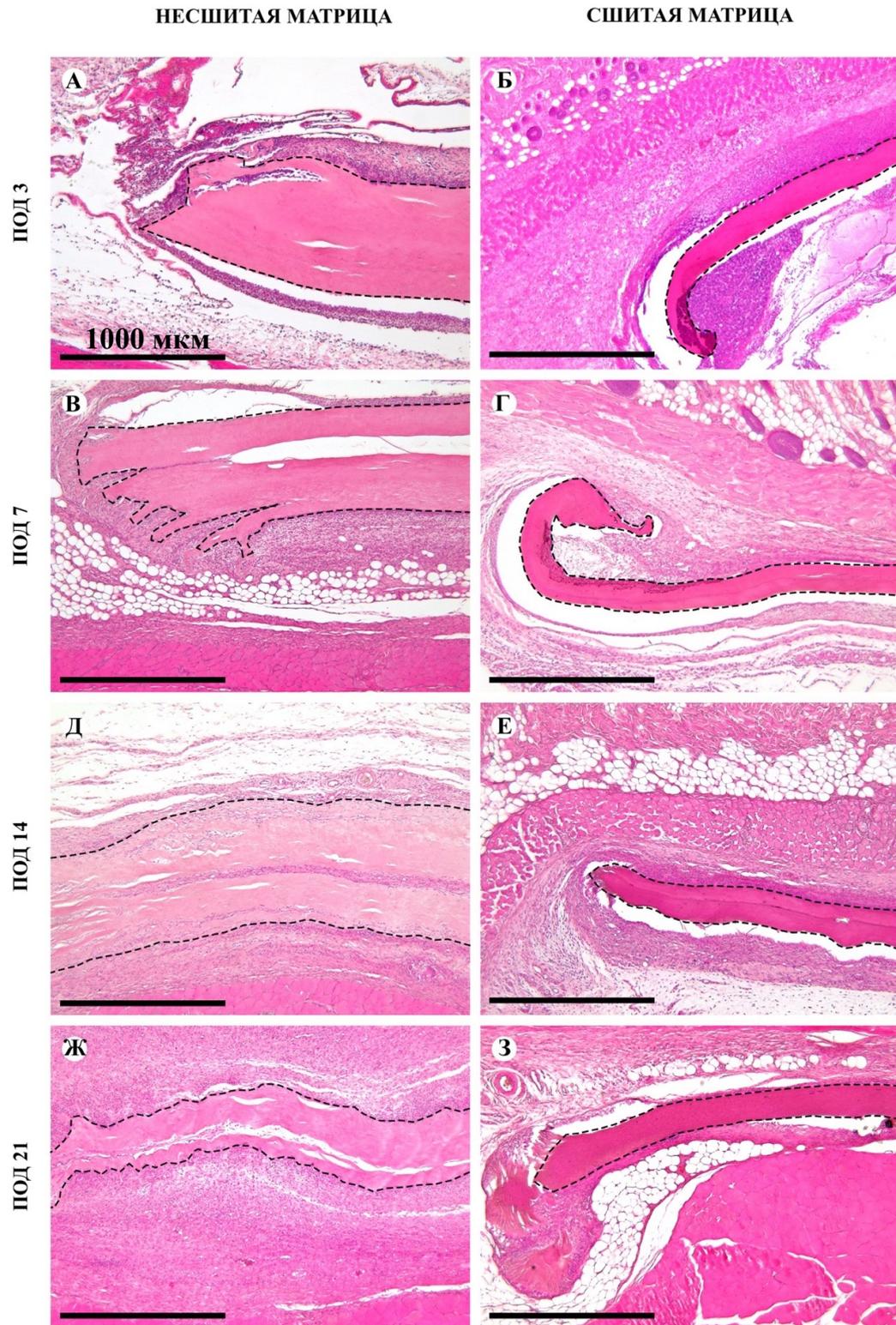


Рисунок 27 – Гистологическое исследование несшитых (А–Ж, вертикально) и сшитых (Б–З, вертикально) коллагеновых матриц ЭФО-ППБ в области имплантации. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение $\times 50$

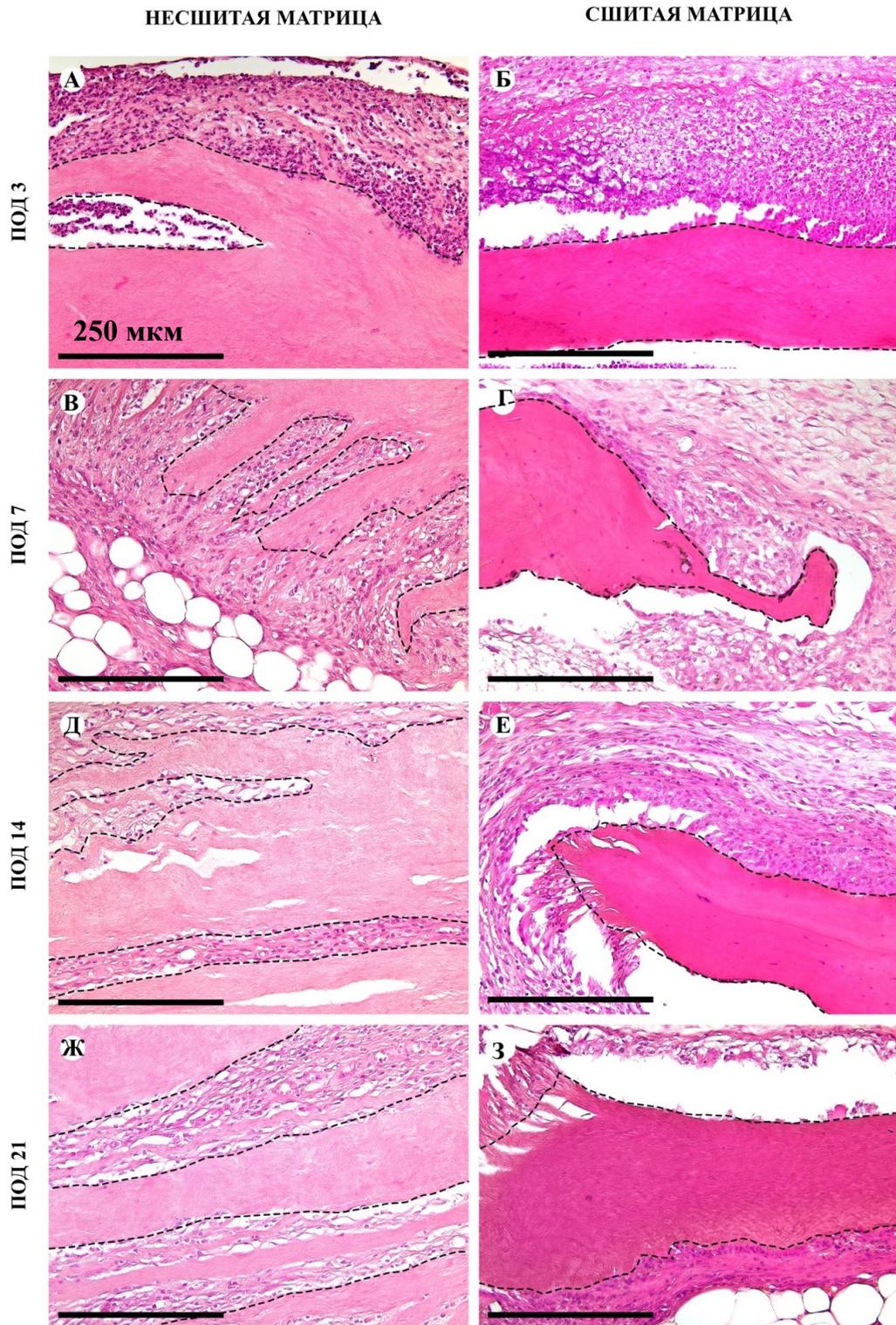


Рисунок 28 – Гистологическое исследование несшитых (А–Ж, вертикально) и сшитых (Б–З, вертикально) коллагеновых матриц ЭФО-ППБ в области имплантации. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$

В периимплантной ткани наблюдались немногочисленные гигантские многоядерные клетки инородных тел. Средняя толщина матриц составляла 432 ± 47 мкм. Импланты были окружены врастающей в них незрелой

грануляционной тканью с многочисленными капиллярами и фибробластами, ориентированными параллельно поверхности импланта (Рисунки 27В, 28В). При окрашивании пикросириусом красным и изучении в поляризованном свете боковой край конструкции показал слабую анизотропию в смеси желтого и красного света, а нижний макрослой матрицы, соответствовавший третьему циклу осаждения, был более темным (Рисунок 29В).

На том же сроке наблюдения (ПОД 7) сшитые коллагеновые матрицы оставались неповрежденными, их средняя толщина составляла 138 ± 18 мкм (Рисунок 27Г). Поверхность матрицы была покрыта несколькими слоями клеток, преимущественно макрофагов, которые в основном не проникали в толщу импланта (Рисунок 28Г). Соединительнотканная капсула не формировалась. Однако имелись единичные очаги плотной локализации фибробластов. При окрашивании пикросириусом красным и изучении под поляризованным светом матрица оставалась красно-желтой с преобладанием желтого свечения (Рисунок 29Г).

На 14-й день после имплантации (ПОД 14) несшитых коллагеновых матриц их толщина составила 415 ± 46 мкм, а их толща начала расслаиваться (Рисунок 27Д). Поверхностные отслоившиеся части толщи матриц стали каркасом для макрофагов, фибробластов и кровеносных сосудов (Рисунок 28Д), таким образом, в щели между элементами матрицы происходило врастание соединительной ткани. Активная, преимущественно макрофагальная, резорбция с участием единичных клеток инородных тел наблюдалась на боковых краях матрицы. Сравнительно слабое участие гигантских клеток инородных тел свидетельствует о том, что коллагеновая матрица по своим свойствам не является чужеродной. Ее структура была значительно разрушена инфильтрацией иммунных клеток и напоминала щетку из пучков волокон. Врастание соединительной ткани в основную массу коллагенового материала, вызывающее его расслоение, было значительно выше, чем на ПОД 7, и составляло $12\pm 4\%$ (Рисунок 26Г) для несшитых матриц, и это значение также было также значительно выше, чем у сшитых матриц на ПОД 14 (0%).

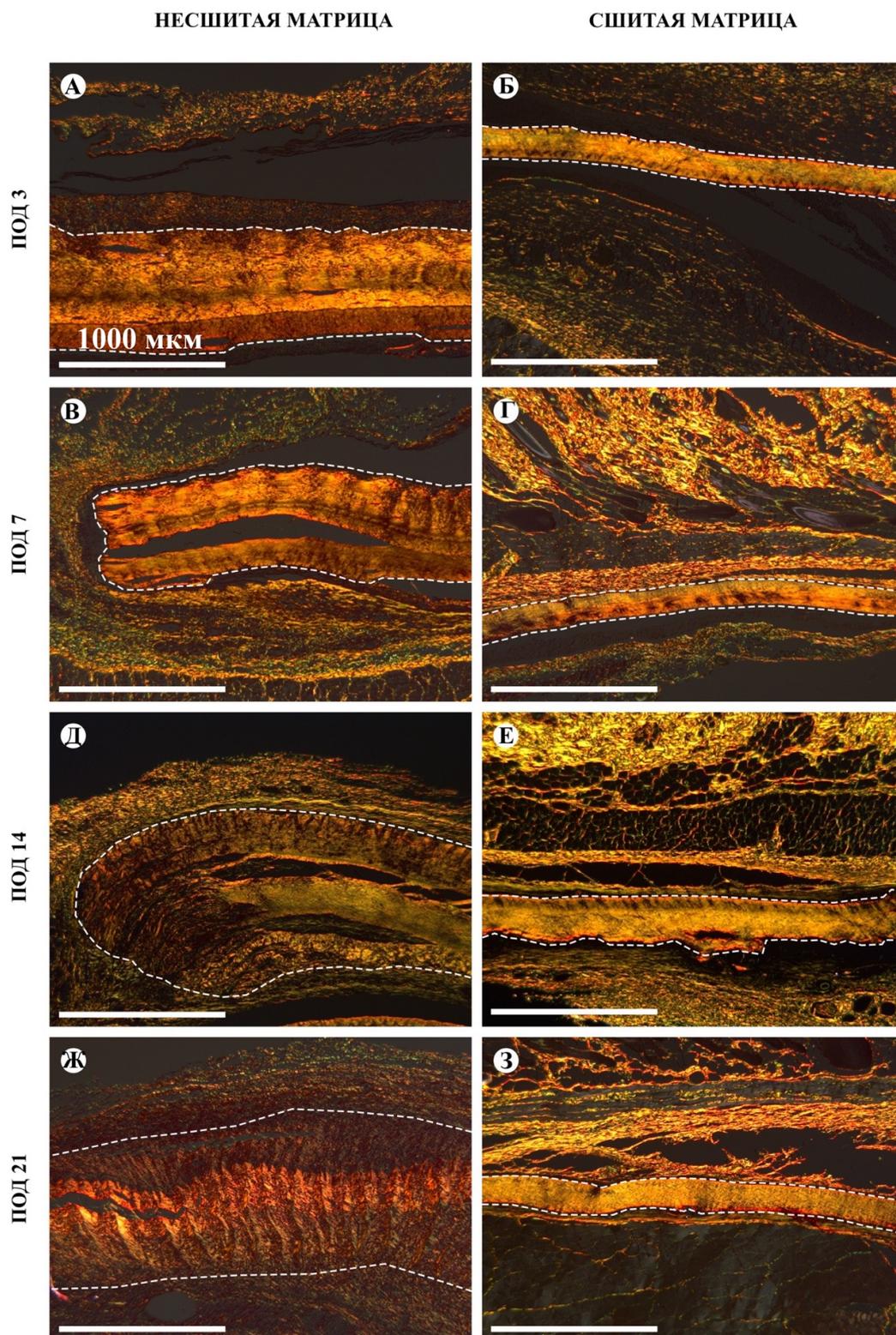


Рисунок 29 – Гистологическое исследование анизотропии коллагеновых волокон в областях имплантации несшитых и сшитых коллагеновых матриц ЭФО-ППБ. Окраска пикросириусом красным, поляризационная световая микроскопия, увеличение $\times 50$

Кровеносные сосуды, окружавшие матрицу, были полнокровными. При окрашивании пикросириусом красным и изучении в поляризованном свете

боковой край конструкции демонстрировал слабую анизотропию в зеленом и желтом спектрах, а ее структура была четко разделена вращением соединительной ткани в три макрослоя, соответствующих циклам осаждения (Рисунок 29Д). Кроме того, иммуногистохимическая реакция на α -SMA-позитивные клетки выявила многочисленные кровеносные сосуды мелкого калибра вокруг имплантата (Рисунок 30А).

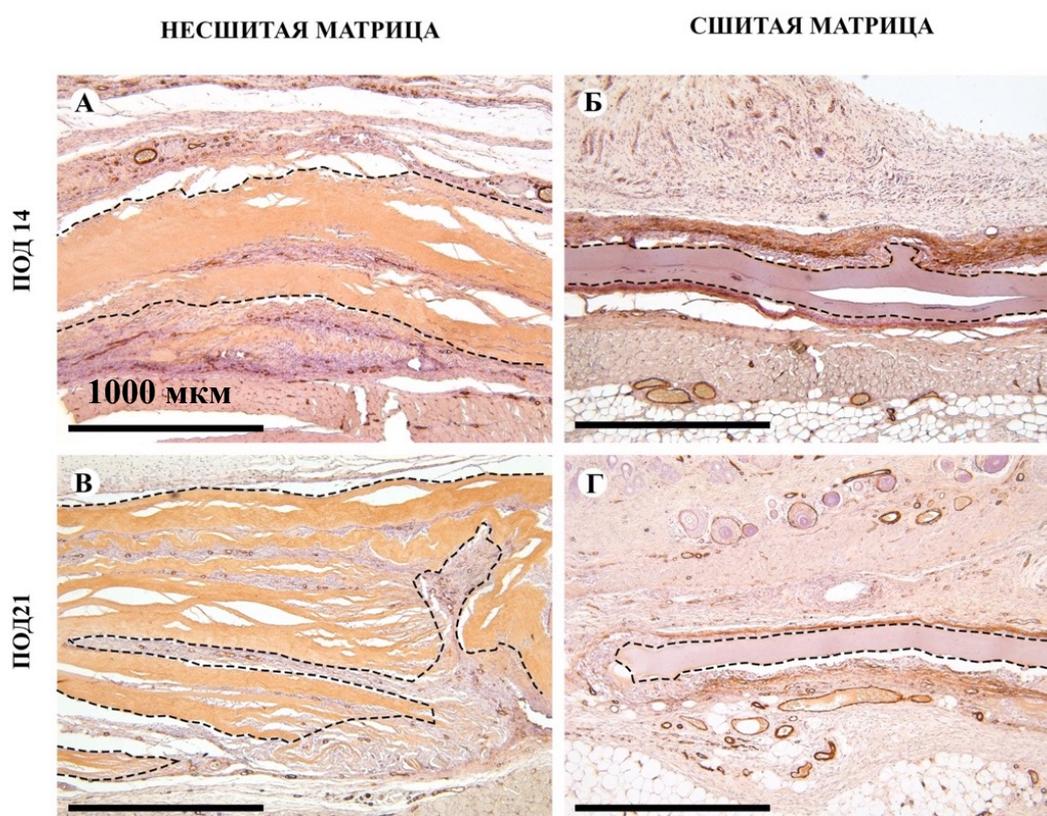


Рисунок 30 – Иммуногистохимическое окрашивание на альфа-актин гладких мышц (α -SMA) в областях имплантации несшитых (А, Б) и сшитых (В, Г) коллагеновых матриц ЭФО-ППБ. Светлопольная микроскопия, увеличение $\times 50$

На том же сроке наблюдения (ПОД 14) структура сшитых коллагеновых матриц в целом оставалась интактной, а их толщина составляла 133 ± 24 мкм. Однако в результате непрерывной краевой резорбции поверхность имплантов стала шероховатой (Рисунок 27Е). В некоторых случаях боковые края матрицы расслоились, что привело к инфильтрации макрофагами между коллагеновыми слоями матрицы (Рисунок 28Е). Поверхность имплантата была покрыта макрофагами и немногочисленными клетками инородных тел (без значимой

разницы по сравнению с несшитой матрицей, Рисунок 28Д). Вокруг матриц формировалась незрелая грануляционная ткань. Анизотропия матрицы под поляризованным светом сохранялась в красном и желтом спектрах (Рисунок 29Е).

Иммуногистохимическое исследование показало, что при окрашивании на α -SMA наблюдался толстый слой параллельно ориентированных миофибробластов (Рисунок 30Б). Плотность миофибробластов в сшитых образцах была значительно выше, чем в несшитых матрицах, а медианные значения составили $60 (41;78)/\text{мм}^2$ и $5 (0;15)/\text{мм}^2$ соответственно (Рисунок 26Б). Более того, количество α -SMA-позитивных кровеносных сосудов мелкого калибра также было выше, чем в несшитых образцах (Рисунки 30А, Б).

Через три недели (ПОД 21) в месте имплантации наблюдались несшитые коллагеновые матрицы толщиной всего 280 ± 70 мкм (Рисунок 27Ж). Такое уменьшение толщины было статистически значимым по сравнению с ПОД 14 для той же группы несшитых матриц. Кроме того, по сравнению со сшитыми матрицами на ПОД 21, резорбция несшитых матриц также была значительно выше (Рисунок 26А). Абсолютное расстояние резорбции несшитых и сшитых матриц значительно отличалось и составляло 180 ± 70 мкм и 51 ± 23 мкм соответственно. Рыхлая структура матриц способствовала формированию толстой незрелой перимплантной соединительнотканной капсулы (Рисунок 28Ж). Капсула была чрезвычайно богата капиллярами, мелкими кровеносными сосудами, фибробластами и клетками инородных тел. Некоторые матрицы были окружены очагами иммунных клеток, которые, возможно, были связаны с остатками шовного материала. Однако не было обнаружено образцов, в которых эти клетки значительно бы инфильтрировали ткань, связанную с имплантом. При окрашивании пикросириусом красным и изучении под поляризованным светом центральная часть матриц, в отличие от боковых краев, все еще демонстрировала некоторую анизотропию в своей сердцевине и была преимущественно красной. Следует отметить, что пучки волокон коллагенового импланта постепенно теряли свою анизотропию на расстоянии от ядра матрицы, по направлению к ее верхней и нижней поверхностям (Рисунок 29Ж). Процент врастания соединительной ткани

также практически не изменился по сравнению с ПОД 14, хотя и был значительно выше, чем для сшитых матриц ($13\pm 7\%$ и 0% , соответственно) (Рисунок 26Г).

На 21-й день после операции толщина сшитой коллагеновой матрицы составляла 104 ± 23 мкм (Рисунок 27З), и это значение было значительно меньше, чем на 3-й день, но эта разница (расстояние резорбции) все еще не была статистически значимой (Рисунок 26А). Кроме единичных надломов боковых краев импланта, других изменений в нем обнаружено не было (Рисунок 28З). Поверхность импланта была покрыта слоями макрофагов и клеток инородных тел, их количество было значительно выше, чем вокруг несшитых матриц, с медианными значениями $350 (275; 425)/\text{мм}^2$ против $60 (28; 113)/\text{мм}^2$ соответственно (Рисунок 26В). При иммуногистохимическом окрашивании, по сравнению с ПОД 14, периимплантная ткань содержала меньше кровеносных сосудов, но все еще была окружена слоем миофибробластов, количество которых было значительно выше, чем в несшитых образцах, с медианными значениями $55 (44; 95)/\text{мм}^2$ против $0 (0; 5)/\text{мм}^2$ соответственно (Рисунок 26Б; Рисунок 30В, Г). Периимплантная ткань содержала полнокровные сосуды и кровоизлияния. При поляризованном свете матрица была анизотропной и имела желтое свечение в центре и красное свечение на периферии из-за резорбции клетками инородного тела (Рисунок 29З).

3.2. Янус-матрицы

3.2.1. Характеристика Янус-матриц

Поверхность исходной (несшитой) ЭФО-ППБ матрицы была гладкой с обеих сторон, а ее срез был плотным и непористым (Рисунок 31А, Б). После проведенных модификаций из этих матриц получали Янус-матрицы. Структурной особенностью Янус-матрицы стоит отметить ее двуликость в отношении поверхностей. Одна поверхность у таких матриц была гладкая и неперфорированная, другая же сторона таких матриц изрешечена перфорациями,

полученными в результате прокатывания валика с иглами (Рисунок 31В). Кроме того, за счет лиофилизации срез Янус-матриц приобретал пористость (Рисунок 31Г).

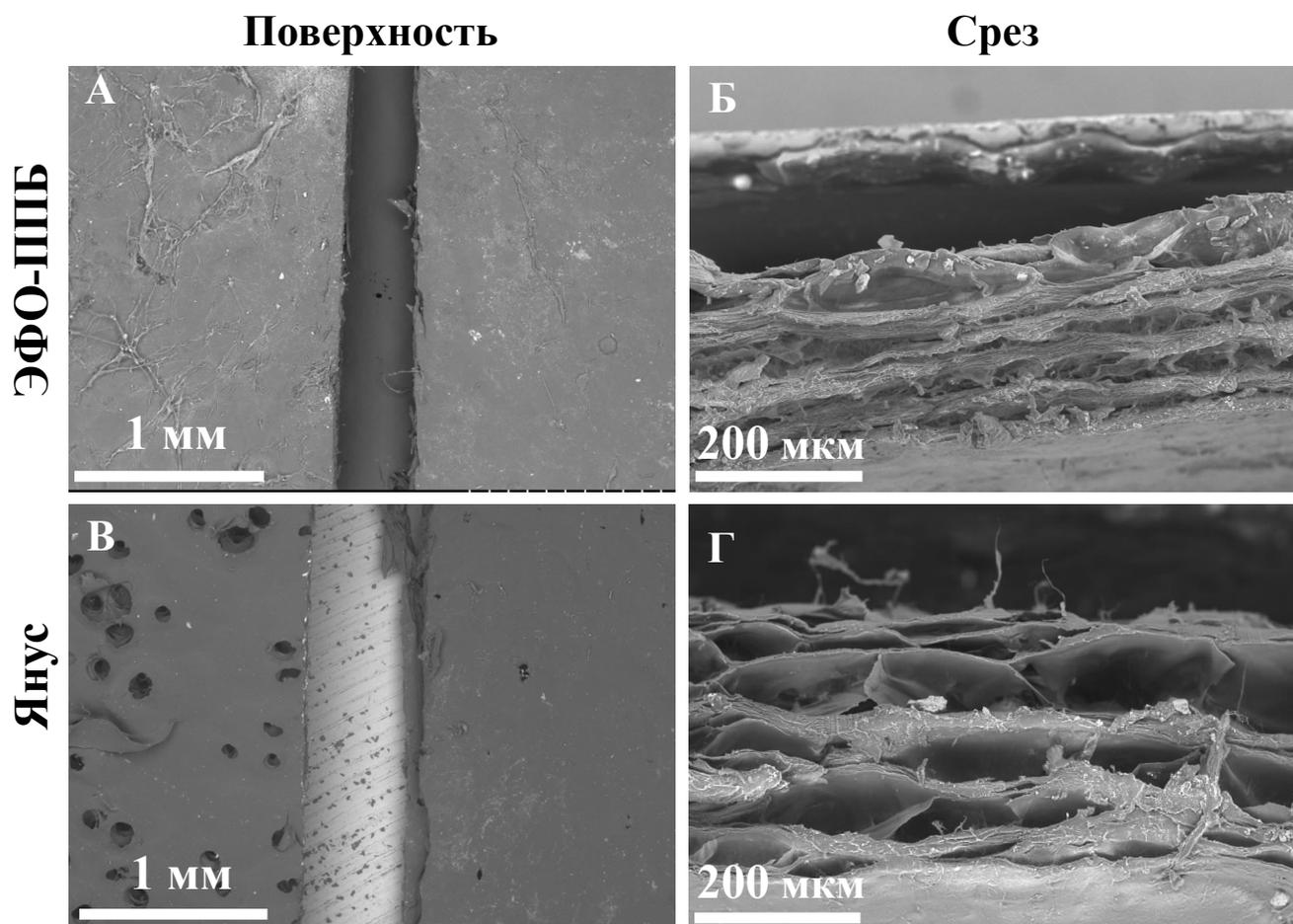


Рисунок 31 – Изображения структуры коллагеновых матриц, полученные СЭМ. Исходные ЭФО-ППБ матрицы (А, Б) в сравнении с Янус-матрицами (В, Г). На изображениях А, В слева и справа показаны разные поверхности матриц

Результаты измерения толщины, набухаемости и температуры сваривания Янус-матриц в сравнении с исходными матрицами ЭФО-ППБ приведены в Таблице 3. Исходные матрицы были тоньше, чем полученные Янус-матрицы с пористой структурой. Соответственно, набухаемость исходной ЭФО-ППБ матрицы была также ниже. Температура сваривания для обоих типов матриц была одинаковой.

Таблица 3 – Параметры исходных матриц ЭФО-ППБ и с Янус-структурой

Матрица	Толщина в сухом виде, мкм	Набухаемость, %	Температура сваривания, °С
Исходная ЭФО-ППБ	201 ± 15	409 ± 26	50.2 ± 0.5
Янус-матрица	255 ± 21	650 ± 77	50.4 ± 0.6

Были проанализированы механические свойства исходных ЭФО-ППБ матриц в сравнении с их Янус-модификацией (Таблица 4). Ожидается, что исходная матрица ЭФО-ППБ за счет плотной непористой структуры обладала самой высокой степенью упругости (15.1 ± 1.8 МПа), в то время как пористая структура Янус-матриц снизила этот параметр до 2.2 ± 0.5 МПа. Деформация при разрыве у двух типов матриц также отличалась с аналогичной тенденцией, и для исходных матриц она была на 20% выше. Примечательно, что по данным литературы, механические свойства уретры по части модуля упругости были схожими с таковыми для Янус-матриц, однако деформация при разрыве у нативной уретры оказалась гораздо выше.

Таблица 4 – Механические свойства Янус-матриц в сравнении с нативной уретрой

Группа	Модуль Юнга, МПа	Деформация при разрыве, %
Исходная ЭФО-ППБ	15.1 ± 1.8	60 ± 12
Янус-матрица ЭФО-ППБ	2.2 ± 0.5	38 ± 8
Нативная уретра [96]	2 ± 0.7	173 ± 51

3.2.2. Аугментационная уретропластика с применением Янус-матриц

В ходе проведения операций по уретропластике все Янус-матрицы были удобными для манипуляций хирургом и не повреждались при наложении швов. В

послеоперационном периоде при проведении ретроградной цистоуретрографии и последующего морфологического анализа после аугментационной уретропластики была показана существенная разница в экспериментальной и контрольной группах в развитии фиброзирования (стриктурирования) уретры (Таблица 5).

В экспериментальной группе Янус-матрицы ни на один из сроков у животных не было отмечено признаков формирования стриктур по данным ретроградной цистоуретрографии (Рисунок 32). В то же время в контрольной группе уже на 45-й день после операции у 2 из 3 кроликов было затруднено мочеиспускание, а по данным ретроградной цистоуретрографии наблюдались признаки стриктуры. К 45 суткам эксперимент в контрольной группе был завершён по этическим соображениям.

Таблица 5 – Развитие стриктур уретры в зависимости от послеоперационного дня

Группа	15 дней	45 дней	90 дней	180 дней
Янус-матрица	0 (n=3)	0 (n=3)	0 (n=3)	0 (n=3)
Контроль	0 (n=3)	2 (n=3)	Завершен	Завершен

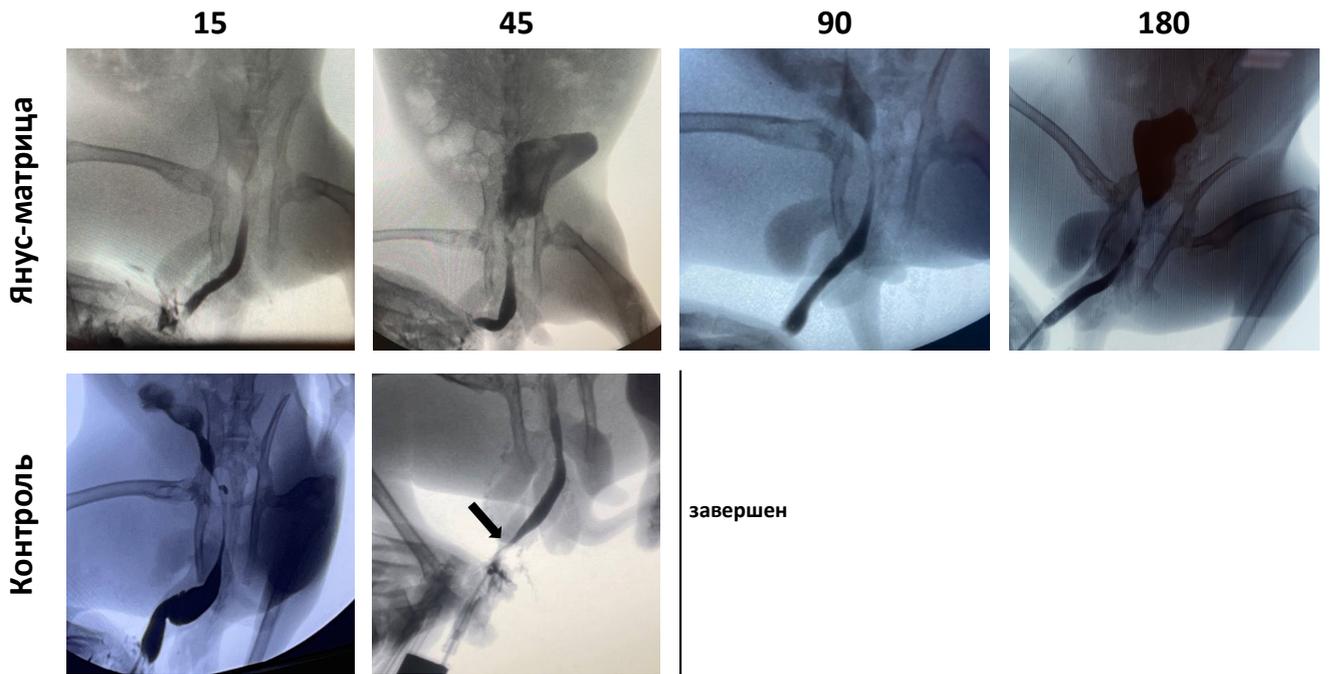


Рисунок 32 – Репрезентативные уретрограммы кроликов из экспериментальной (верхний ряд) и контрольной (нижний ряд) групп на различные послеоперационные дни. Стрелкой отмечено место образования стриктуры

По данным гистологического исследования, на 15-е сутки после операции в группе Янус-матрицы в области имплантации наблюдалась активная регенерация уротелия (Рисунок 33А, Б). В исследованных образцах регенерирующий уротелий покрывал около 50% поверхности импланта, однако в одном образце отмечалась почти полная эпителизация импланта. Тем не менее регенерирующий уротелий был еще мало дифференцирован и утолщен в 3 раза по сравнению с нормальным уротелием (Рисунок 33Б, Рисунок 1Б).

Следует отметить, что эпителизация шла активнее по краям импланта, тогда как в середине чаще встречались зоны без уротелия. Под регенерирующим уротелием оставался слой имплантированной коллагеновой матрицы. Пористая структура Янус-матрицы на этом сроке уже не обнаруживалась в связи с набуханием и разрыхлением коллагена. Отмечалась неоднородность в резорбции коллагена в зависимости от участка импланта. По краям импланта, там, где хорошо выражена регенерация уротелия, активно идет и резорбция коллагена макрофагами разного размера и гигантскими многоядерными клетками (Рисунок 33Б).

Оставшиеся коллагеновые волокна разрыхлены и представляют собой тонкие волоконца, сохраняющие продольное расположение и параллельную ориентацию. Показательно, что на этом сроке в имплант вросли фибробласты, а также сосуды в основном калибра капилляров, артериол и венул с расширенным просветом и сладжем эритроцитов. Под слоем коллагеновой матрицы отмечалась неширокая полоса клеточной инфильтрации с преобладанием макрофагов, лимфоцитов и эозинофилов.

На 45-е сутки после операции в группе Янус-матрицы поверхность импланта почти полностью была выстлана новообразованным уротелием, состоявшим из клеток, местами образывавших четкие вертикальные колонки (Рисунок 33В, Г). Однако дифференцировка уротелия полностью еще не была закончена, оставались утолщенные участки с менее упорядоченным расположением клеток.

Стенка уретры под эпителием была сформирована слоистой тканью, состоящей из значительно резорбированной ткани импланта и собственной новообразованной соединительной ткани и мышечных волокон стенки уретры (Рисунок 33В, Г). В одних более рыхлых и утолщенных слоях отмечались тонкие и часто извитые коллагеновые волокна импланта, резорбируемые многочисленными макрофагами с небольшой примесью лимфоцитов и фибробластов. Другие слои были образованы параллельно расположенными пучками вытянутых гладкомышечных клеток с веретеновидными ядрами. Между этими слоями наблюдались продольно вытянутые сосуды с расширенным просветом, заполненные эритроцитами и плазмой. Следует отметить, что на данном сроке инфильтрация импланта и окружающих тканей лимфоцитами и эозинофилами резко уменьшена по сравнению со сроком 15 суток.

На 90-е сутки после операции в группе Янус-матрицы поверхность импланта была полностью эпителизирована (Рисунок 33Д, Е), дифференцировка уротелия была в основном завершена.

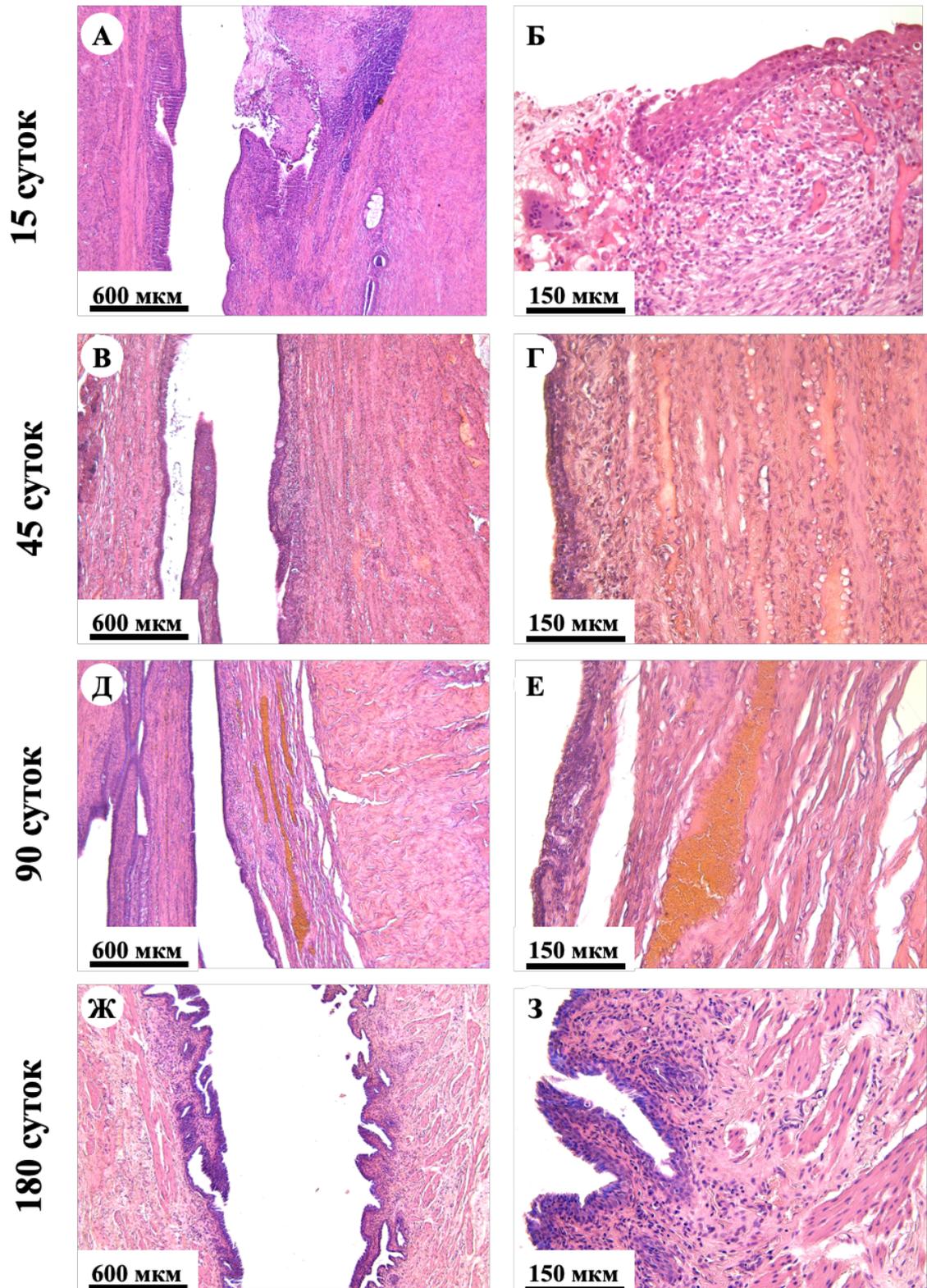


Рисунок 33 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в группе Янус-матрицы. А–Ж (вертикально) – участок имплантации располагается справа от просвета уретры, слева – здоровая ткань. А–Ж (вертикально) – увеличение $\times 50$, Б–З (вертикально) – $\times 200$. Окраска гематоксилин-эозином, световая микроскопия

На большей части поверхности восстанавливались сосочки слизистой оболочки. Практически полностью регенерировала соединительнотканная основа слизистой оболочки, в которой, наряду с продольно расположенными пучками коллагеновых волокон и фибробластов между ними, выявлялись пучки гладкомышечных клеток. В новообразованной соединительнотканной основе отмечалась выраженная васкуляризация и умеренная очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация. Остатков Янус-матрицы не обнаружено.

На 180-е сутки после уретропластики в группе Янус-матрицы произошла полная регенерация слизистой оболочки уретры, поэтому существенной разницы в морфологической структуре между интактными участками уретры и участками в области имплантации обнаружено не было (Рисунок 33Ж, 3). В условно интактных участках вне имплантации стенка уретра была выстлана уротелием обычной структуры, формировавшим вместе с соединительнотканной основой хорошо выраженные сосочки слизистой оболочки. В соединительнотканной основе отмечалась умеренная очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация и множественные кровеносные сосуды разного типа. Глубже определялись вытянутые параллельно поверхности мышечные пучки, состоявшие из длинных веретеновидных гладкомышечных клеток. Между пучками располагался слой рыхлой соединительной ткани с фибробластами и коллагеновыми волокнами.

В регенерировавших участках уретры остатков Янус-матрицы обнаружено не было. На поверхности новообразованной слизистой оболочки были хорошо выражены сосочки, и только в отдельных небольших участках сосочки отсутствовали, хотя эпителий был дифференцирован. Соединительнотканная основа слизистой оболочки была полностью аналогична интактным участкам, в ней также отмечалась лимфомакрофагальная инфильтрация, при этом интенсивность инфильтрации незначительно сильнее, чем в интактных участках. Также содержались многочисленные гладкомышечные пучки с соединительнотканными прослойками, в некоторых участках количество мышечных пучков больше, и они располагались более тесно.

В контрольной группе на 15-е сутки в области дефекта наблюдалась практически полная эпителизация слизистой оболочки (Рисунок 34А, Б). Уротелий в основном состоял из нескольких слоев клеток, сосочки слизистой оболочки отсутствовали. Под уротелием в соединительнотканной основе отмечались слабая лимфомакрофагальная инфильтрация, многочисленные сосуды и формирующиеся мышечные пучки.

Важной особенностью на этом сроке наблюдения являлось фиброзирование большей части слизистой оболочки уретры в области дефекта. При этом степень фиброза варьировала от умеренной до выраженной в части образцов. Локально встречались участки с фибриновым сгустком, отсутствующим эпителием, отеком и разрыхлением соединительнотканной основы.

На 45-е сутки в области дефекта наблюдалась полная эпителизация слизистой оболочки. Уротелий был малодифференцированным и неравномерной толщины: в середине дефекта отмечался более тонкий (3–4 слоя клеток) уротелий по сравнению с периферией (9–10 слоев клеток) (Рисунок 34В, Г).

При этом в относительно большом количестве в эпителиальных клетках поверхностного слоя выявлялись вакуоли, то есть выявлялась вакуольная дистрофия уротелия. Сосочки слизистой оболочки в области дефекта отсутствовали. Под уротелием значительное пространство соединительнотканной основы было занято фиброзно-рубцовой тканью, состоящей из переплетающихся между собой пучков коллагеновых волокон и многочисленных фибробластов между ними. В рубцовой ткани отмечалось сравнительно небольшое содержание лимфоцитов и макрофагов, стенки сосудов были фиброзированы, выявлялись резко расширенные лимфатические сосуды. Глубже фиброзной ткани располагалась мышечная оболочка.

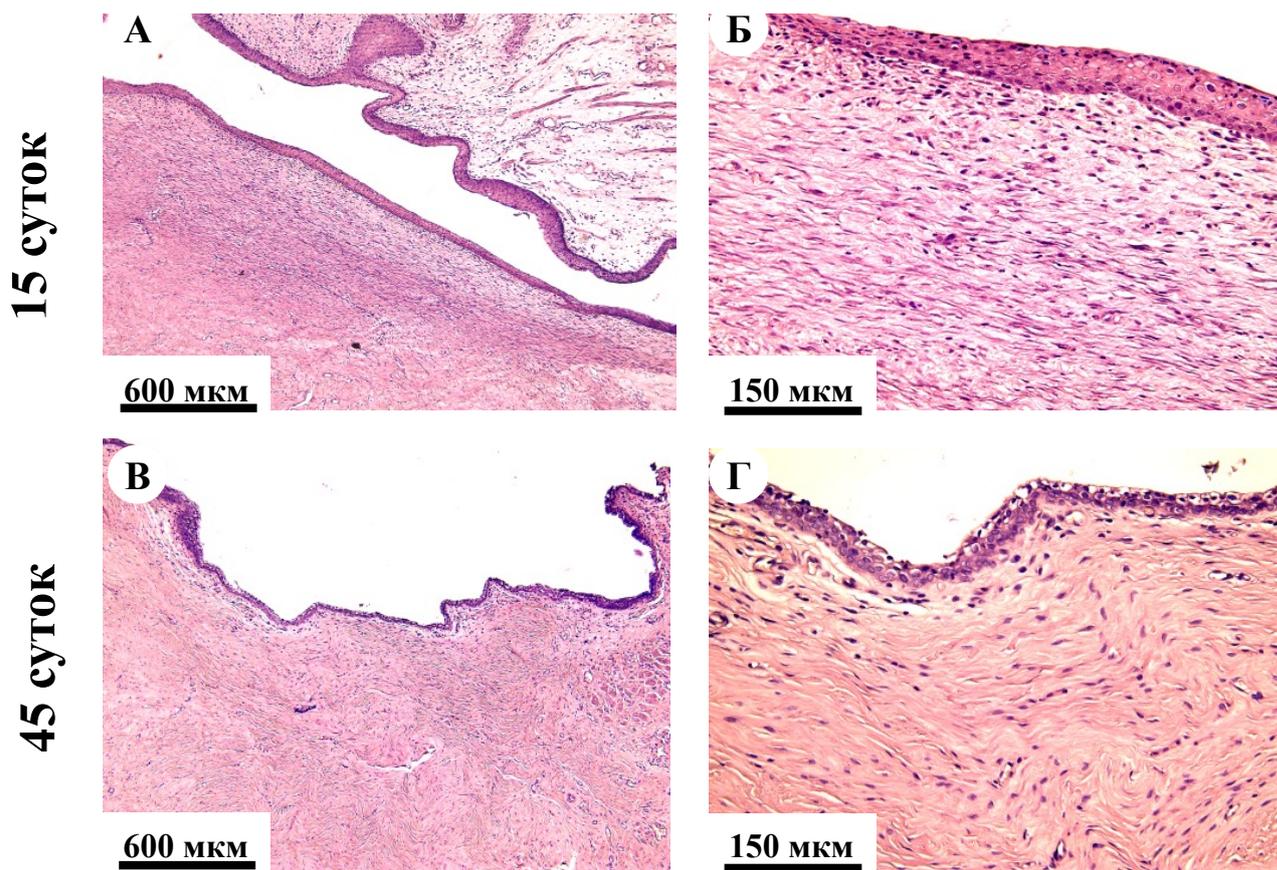


Рисунок 34 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в контрольной группе. Регенерирующий участок слизистой располагается снизу от просвета уретры (А). А, В – увеличение $\times 50$, Б, Г – $\times 200$. Окраска гематоксилин-эозином, световая микроскопия

При исследовании образцов, окрашенных по Маллори, в экспериментальной группе с течением времени были особо четко видны процессы разволокнения структуры импланта, его резорбция макрофагами и замещение собственной соединительной тканью (Рисунок 35). При этом вновь образованная соединительная ткань не обладала признаками фиброзно-рубцовых изменений и с течением времени приобретала нативную структуру, свойственную интактным участкам уретры.

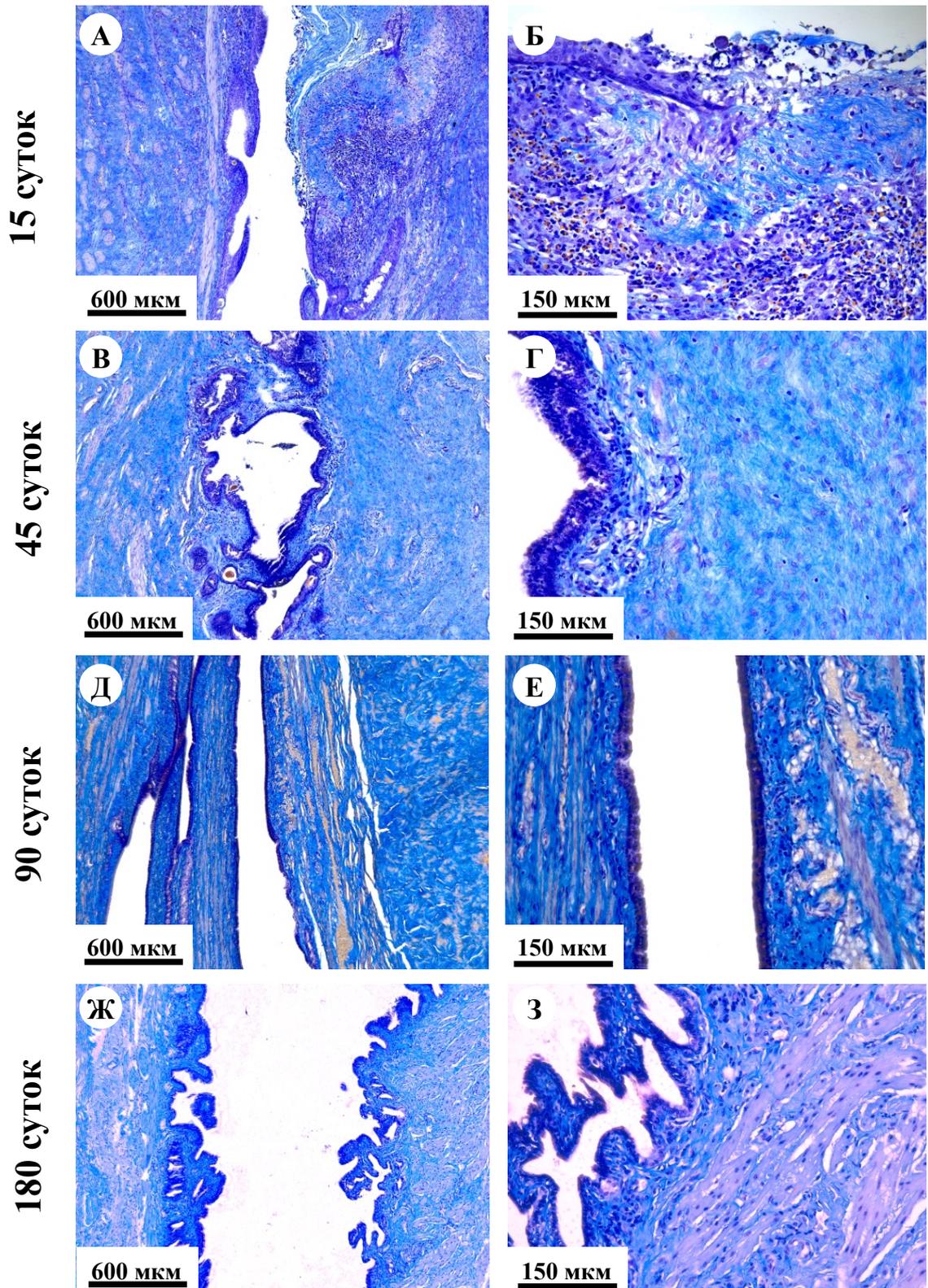


Рисунок 35 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в группе Янус-матрицы. А–Ж (вертикально), Е – участок имплантации располагается справа от просвета уретры, слева – здоровая ткань. Коллагеновые волокна голубого цвета, мышечные волокна желто-розового цвета. А–Ж (вертикально) – увеличение $\times 50$, Б–З (вертикально) – $\times 200$. Окраска по Маллори, световая микроскопия

В контрольной группе при исследовании образцов, окрашенных по Маллори, отмечалось постепенное фиброзирование соединительнотканной основы слизистой оболочки уретры: на 15-е сутки после операции область дефекта замещается фиброзно-рубцовой тканью, состоящей из продольно ориентированных и плотно расположенных пучков коллагеновых волокон, окрашенных в голубой цвет (Рисунок 36А, Б). На 45-е сутки степень фиброзирования этого участка существенно усиливалась, и формировалась рубцовая ткань (Рисунок 36В, Г).

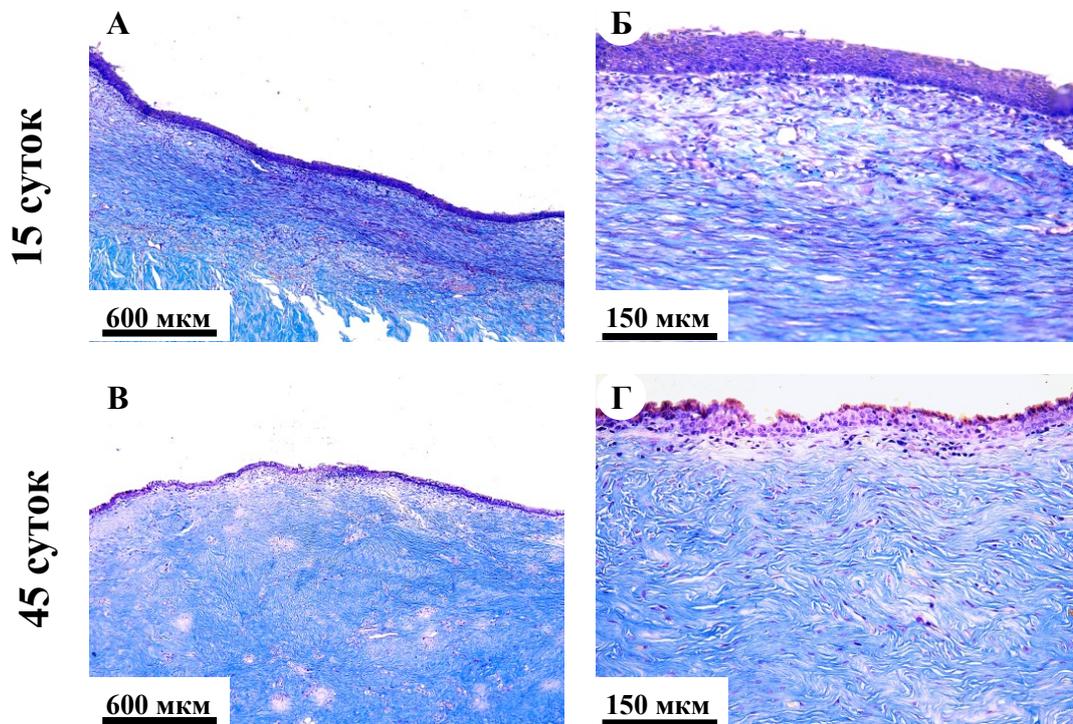


Рисунок 36 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в контрольной группе. Коллагеновые волокна голубого цвета, мышечные волокна желто-розового цвета. А, В – увеличение $\times 50$, Б, Г – $\times 200$. Окраска по Маллори, световая микроскопия

При исследовании образцов, окрашенных пикросириусом красным в поляризованном свете (Рисунок 37), анализ анизотропии коллагеновых волокон в случае экспериментальной группы позволил утверждать о полной интеграции компонентов Янус-матрицы в резидентную ткань уретры. В то же время в случае контрольной группы (Рисунок 38) анализ анизотропии коллагеновых волокон

продемонстрировал выраженное усиление процесса рубцевания стенки уретры к 45-м суткам после операции.

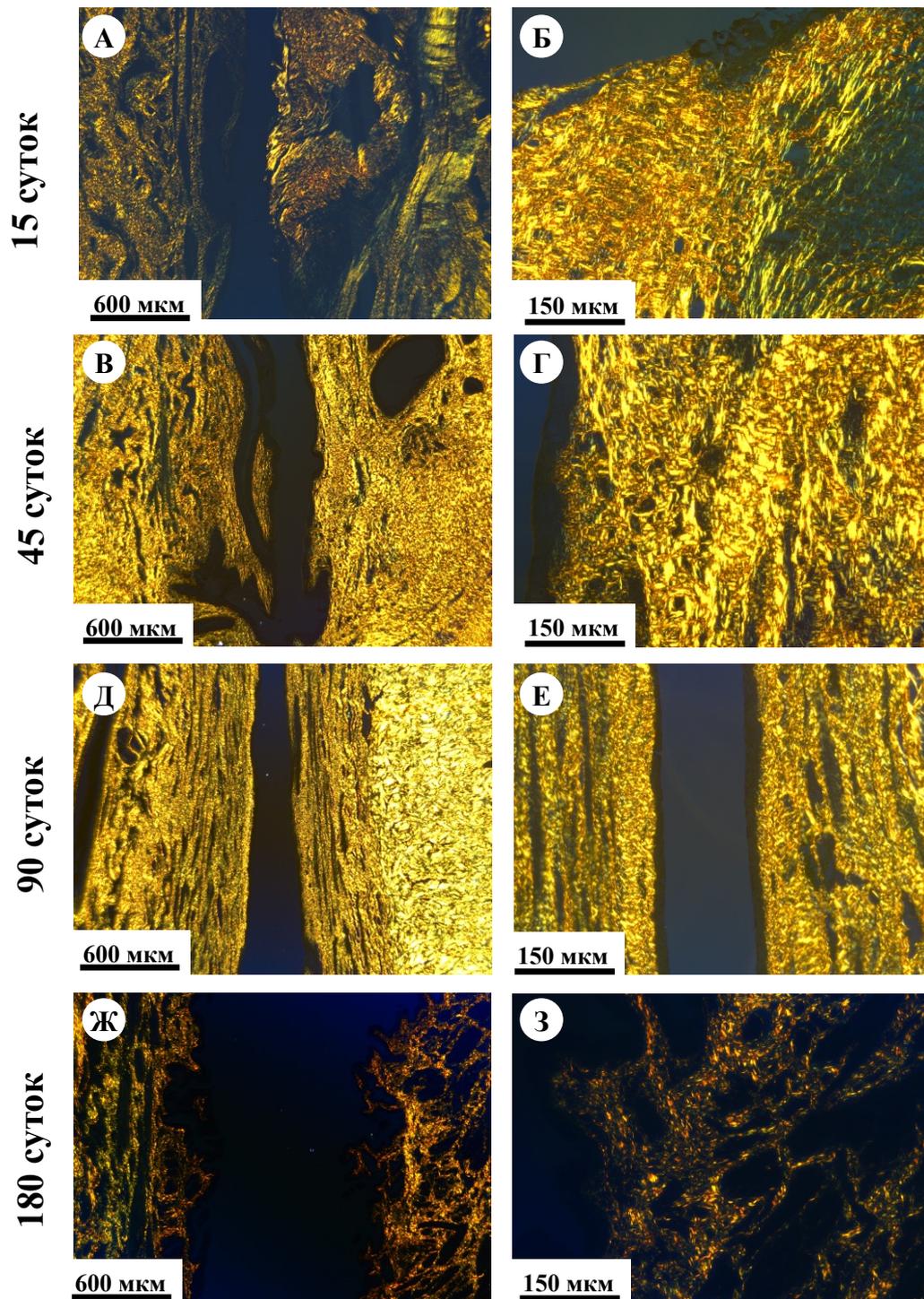


Рисунок 37 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в группе Янус-матрицы. А–Ж (вертикально), Е – участок имплантации располагается справа от просвета уретры, слева – здоровая ткань. Коллагеновые волокна дают анизотропию в желтом спектре. А–Ж (вертикально) – увеличение $\times 50$, Б–З (вертикально) – $\times 200$. Окраска пикросириусом красным, поляризационная микроскопия

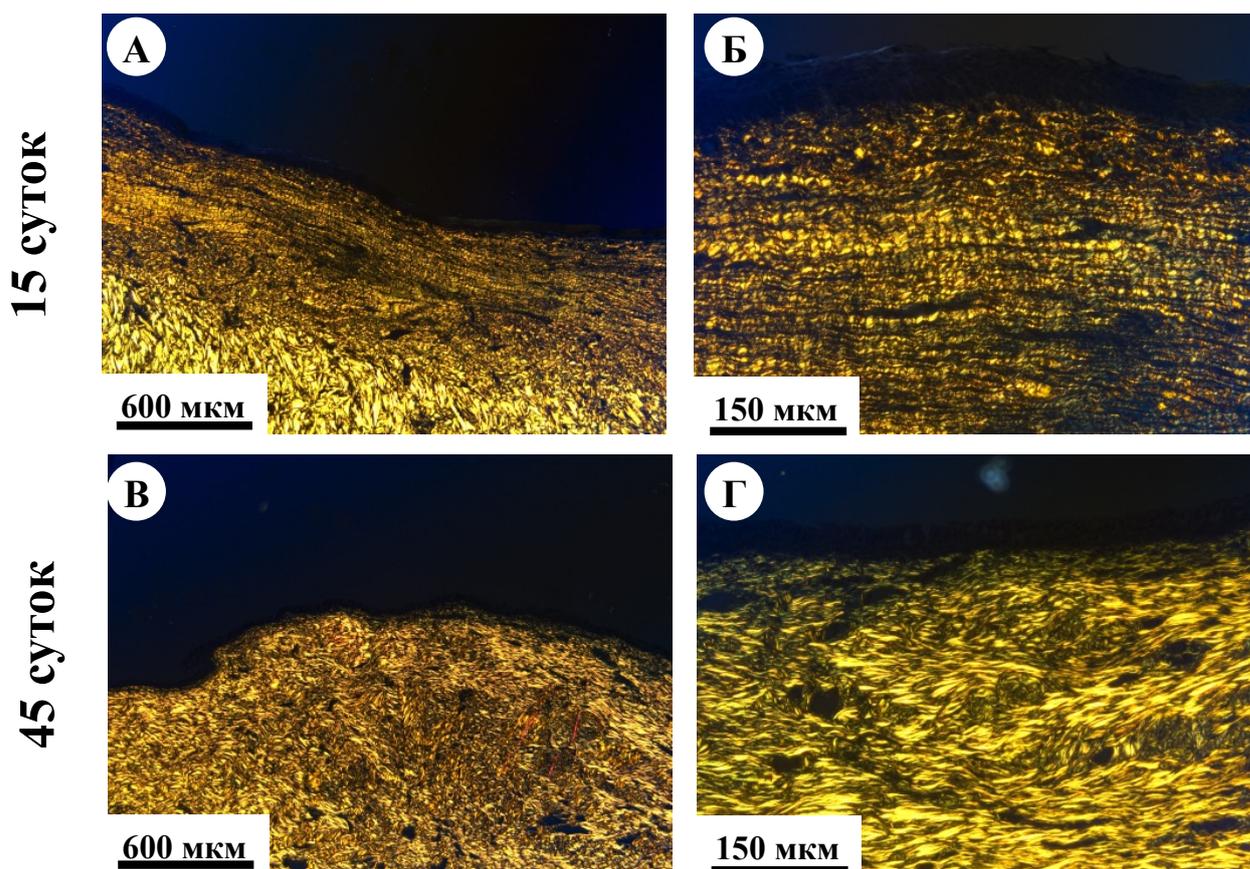


Рисунок 38 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в контрольной группе. Коллагеновые волокна дают анизотропию в желтом спектре. А, В – увеличение $\times 50$, Б, Г – $\times 200$. Окраска пикросириусом красным, поляризационная микроскопия

В экспериментальной группе иммуногистохимический анализ экспрессии α -SMA указал на наличие гладких мышц и фибротически активированных миофиibroбластов на сроке 45 суток в экспериментальной группе (Рисунок 39). На сроках 90 и 180 суток четко выявляются гладкие мышцы, но миофиibroбласты почти отсутствуют, что позволяет утверждать об отсутствии развития фибротической трансформации участка имплантации. Иммуногистохимический анализ экспрессии α -SMA в контрольных образцах (Рисунок 40) продемонстрировал присутствие немногочисленных активированных миофиibroбластов на всех сроках после операции.

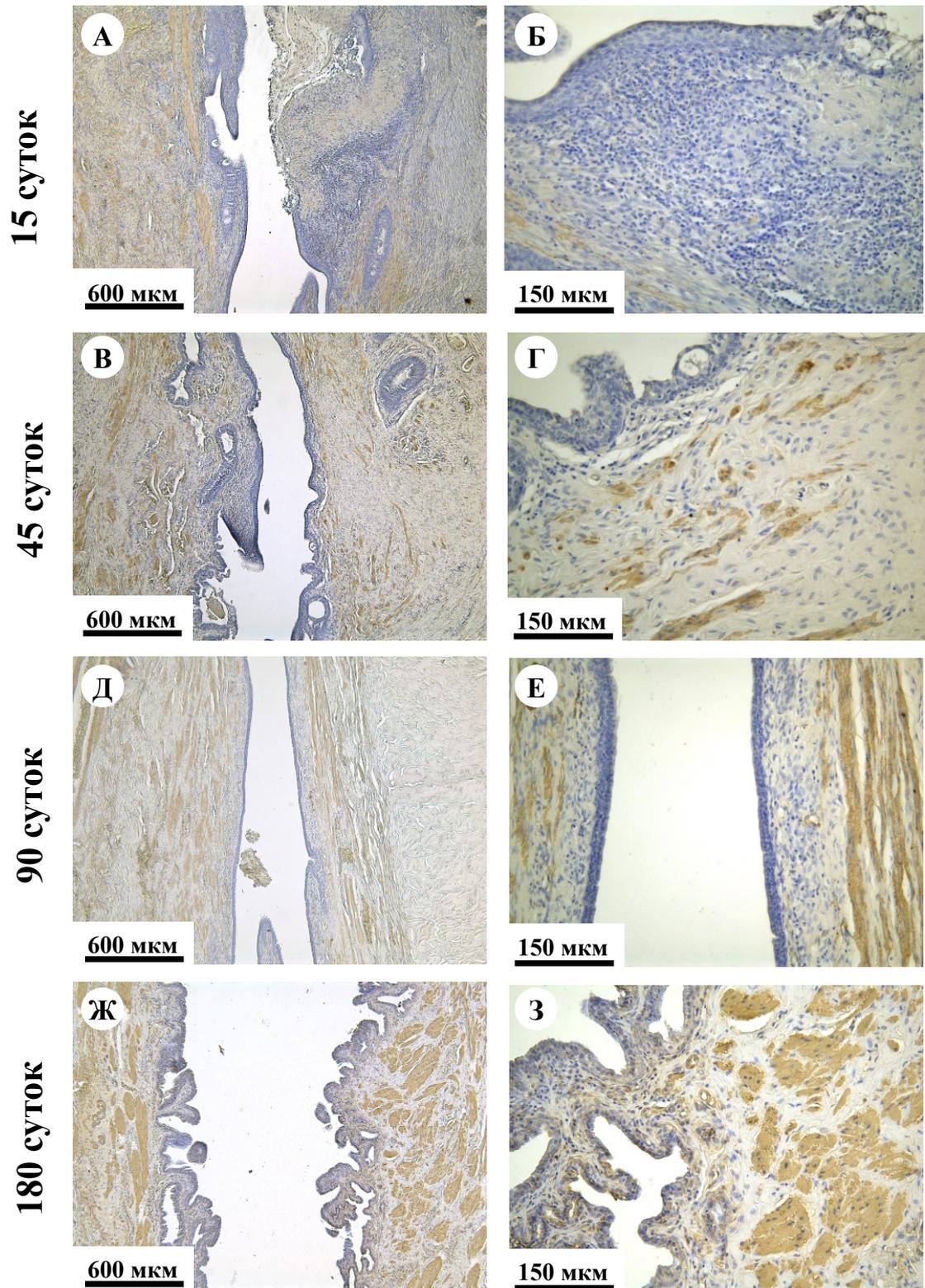


Рисунок 39 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в группе Янус-матрицы. А–Ж (вертикально), Е – участок имплантации располагается справа от просвета уретры, слева – здоровая ткань.

Гладкомышечные клетки, стенки сосудов и миофибробласты окрашены в коричневой цвет. А–Ж (вертикально) – увеличение $\times 50$, Б–З (вертикально) – $\times 200$. Окраска на альфа-актин гладких мышц (α -SMA), световая микроскопия

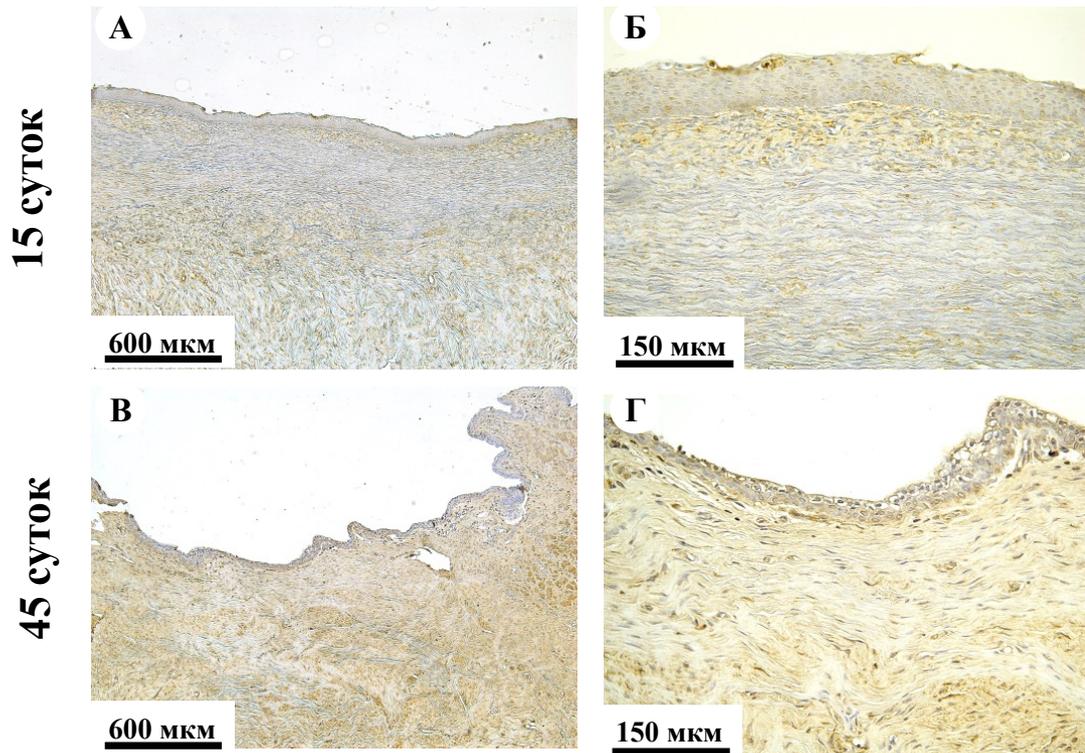


Рисунок 40 – Стенка уретры в области дефекта на различные сроки наблюдения в контрольной группе. Гладкомышечные клетки, стенки сосудов и миофибробласты окрашены в коричневой цвет. А, В – увеличение $\times 50$, Б, Г – $\times 200$. Окраска на альфа-актин гладких мышц (α -SMA), световая микроскопия

Результаты полуколичественной балльной оценки процессов регенерации в экспериментальной (Янус-матрица) и контрольной группах приведена на Рисунке 41. Регенерация уротелия (Рисунок 41А) в течение первых двух недель после операции в экспериментальной группе шла медленнее по сравнению с контрольной группой, однако к 45-м суткам после операции эти показатели для обеих групп сравнялись. Восстановление сосочков в слизистой (Рисунок 41Б) в области дефекта для обеих групп происходило начиная с 45-го дня, причем для экспериментальной группы на 45-й день этот показатель был незначительно выше.

Наиболее существенно экспериментальная и контрольная группы отличались по показателю фибротических изменений (Рисунок 41В). В контрольной группе уже на 15-е сутки после операции фиброз слизистой достигал субмаксимальных значений, а к 45-м суткам перешел в фазу ярко выраженной фиброзно-рубцовой трансформации (максимальные значения), что клинически

выражалось как стриктурирование просвета уретры (Рисунок 32). В то же время в группе Янус-матрицы признаков формирования фибротических процессов не наблюдалось.

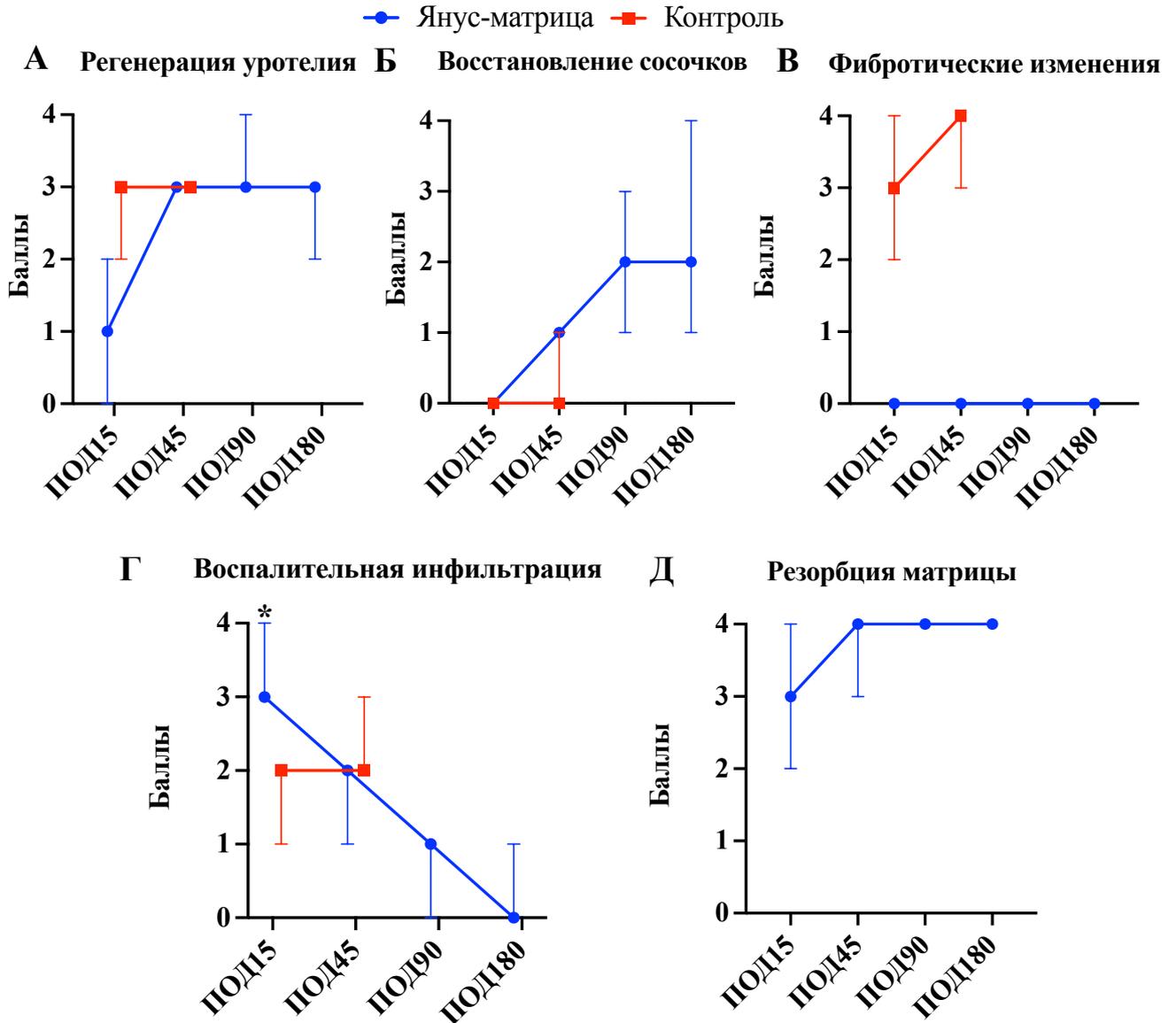


Рисунок 41 – Динамические изменения признаков регенерации и воспаления в участках оперативного вмешательства в экспериментальной (Янус-матрица) и контрольной группах. Результаты представлены в виде медианных значений и интерквартильных размахов. * $P < 0,05$

Воспалительная инфильтрация (Рисунок 41Г) в первые 2 недели была существенно выше в экспериментальной группе по сравнению с контрольной, однако с течением времени к 180-му дню она уменьшилась до минимальных значений. Резорбция матрицы в экспериментальной группе (Рисунок 41Д)

происходила наиболее активно в первые 2 недели после операции, на 45-е сутки лишь в некоторых образцах были видны незначительные остатки имплантов, в то время как к 90-м суткам матрица полностью была резорбирована во всех образцах из экспериментальной группы.

3.3. Создание модельного ТИК уретры

3.3.1. Подбор параметров биопечати

Для создания модельного ТИК уретры авторы разработали оригинальный метод биопечати сфероидов при помощи лазерно-индуцированного прямого переноса (LIFT) с использованием оптического устройства – Пи-шейпера. Для этого в первую очередь была подобрана оптимальная концентрация гиалуроновой кислоты в биочернилах, содержащих сфериды. Было протестировано три варианта биочернил: с 2 мг/мл гиалуроновой кислоты, с 4 мг/мл гиалуроновой кислоты, без гиалуроновой кислоты (чистая клеточная среда – DMEM) (Рисунок 42А). В случае LIFT-биопечати с биочернилами, содержащими 4 мг/мл ГК, перенос сфероида не происходил, и после лазерного импульса он «отпружинивал» и возвращался в исходное положение.

При уменьшении концентрации гиалуроновой кислоты в два раза (2 мг/мл) происходил точный перенос сфероида на коллекторную подложку (Таблица 6). При печати биочернилами без гиалуроновой кислоты (только DMEM) сфериды переносились хаотично, находясь при съемке вне поля зрения камеры, и даже при уменьшении энергии лазерного импульса не удавалось добиться точного режима их переноса. Поэтому концентрация 2 мг/мл ГК в биочернилах была выбрана как оптимальная для дальнейшей работы.

После печати сфероидов и обработки коллекторной подложки раствором тромбина слой гидрогеля начинал полимеризоваться в течение нескольких секунд после нанесения тромбина и демонстрировал линейное вязкоупругое поведение при деформации до 2% (Рисунок 42Б).

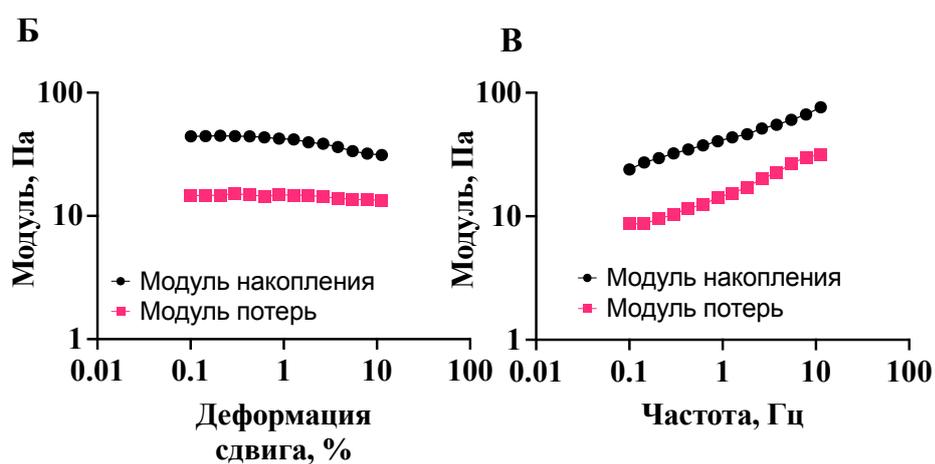
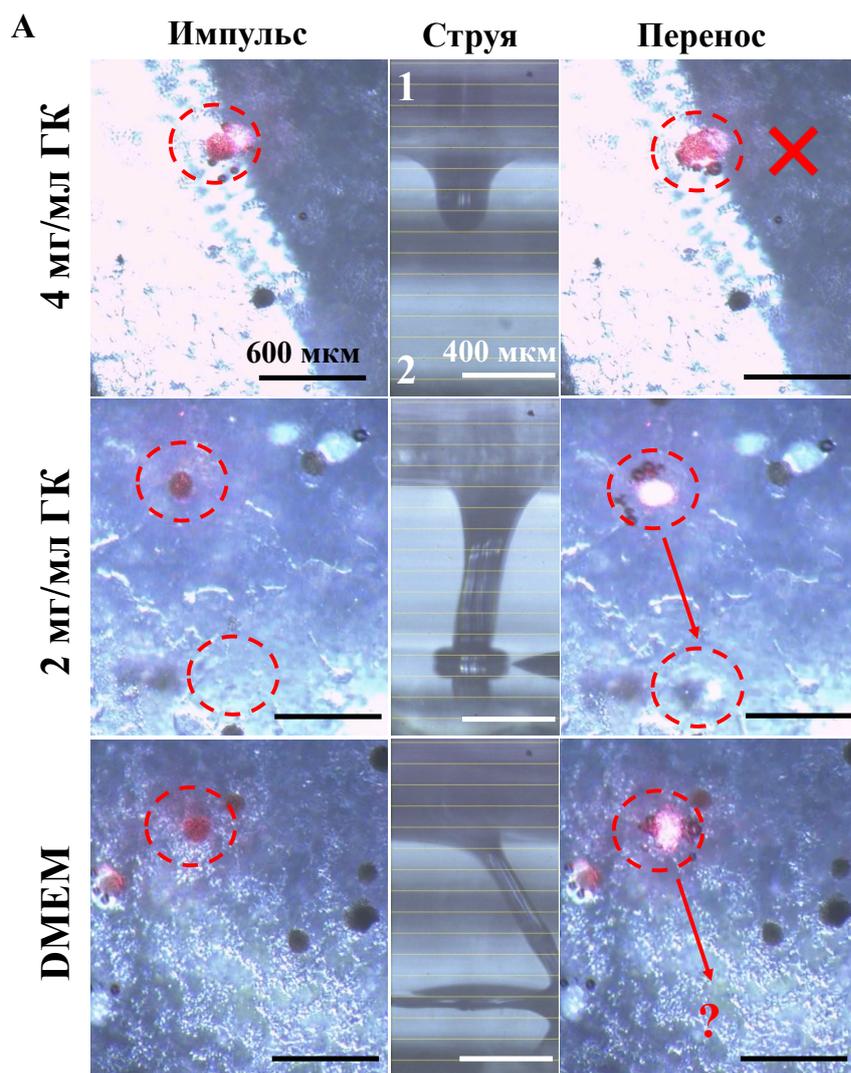


Рисунок 42 – LIFT-биопечать сфероидов в различных биочернилах (А) на затвердевающую коллекторную подложку (Б, В). 1 – донорная подложка, 2 – коллекторная подложка

В испытаниях с частотной разверткой (при деформации 0,5%) наблюдалось увеличение как модуля сохранения, так и модуля потерь G'' с увеличением

частоты (Рисунок 42В). Однако модуль сохранения G' , связанный с жесткостью вязкоупругого материала, доминировал во всем исследованном диапазоне частот. Преобладание компонента упругости привело к достаточно прочной фиксации сфероидов в геле и сохранению напечатанных паттернов из сфероидов.

Таблица 6 – Определение оптимальной вязкости биочернил для LIFT

Параметр	4 мг/мл ГК	2 мг/мл ГК	DMEM
Вязкость, мПа*С ⁻¹	22.4 ± 2.0	10.1 ± 1.1	5.4 ± 0.3
Перенос	Нет	Точный	Хаотичный

Примечание. ГК – гиалуроновая кислота.

При сравнении режимов биопечати в режиме Гаусса (без функционирования Пи-шейпера) и двойного кольца (с включенным Пи-шейпером) в отношении жизнеспособности сфероидов после печати было показано, что гауссово распределение энергии вызывало значительные повреждения при переносе сфероидов, и количество живых клеток было статистически значимо меньше, чем в других группах (мертвых, соответственно, статистически значимо больше, чем в других группах) (Рисунок 43А).

На соответствующем рисунке для группы Гаусса видна группа окрашенных пропидием йодидом мертвых клеток в апикальной части сфероида, что, предположительно, соответствует области лазерно-индуцированного повреждения. Количество живых клеток в этой группе составило $56.1 \pm 5.8\%$. В то же время показатели живых клеток не отличались между группой двойного кольца и контролем ($76.6 \pm 13\%$ и $81.1 \pm 13.7\%$ соответственно). Тем не менее при сравнении распластывания перенесенных методом LIFT сфероидов в наиболее безопасном режиме (с включенным Пи-шейпером) и контрольных сфероидов было показано, что последние распластывались более интенсивно ($1,12 \pm 0,4 \text{ мм}^2$ против $1,9 \pm 0,2 \text{ мм}^2$, Рисунок 43Б) на 3-й день после печати.

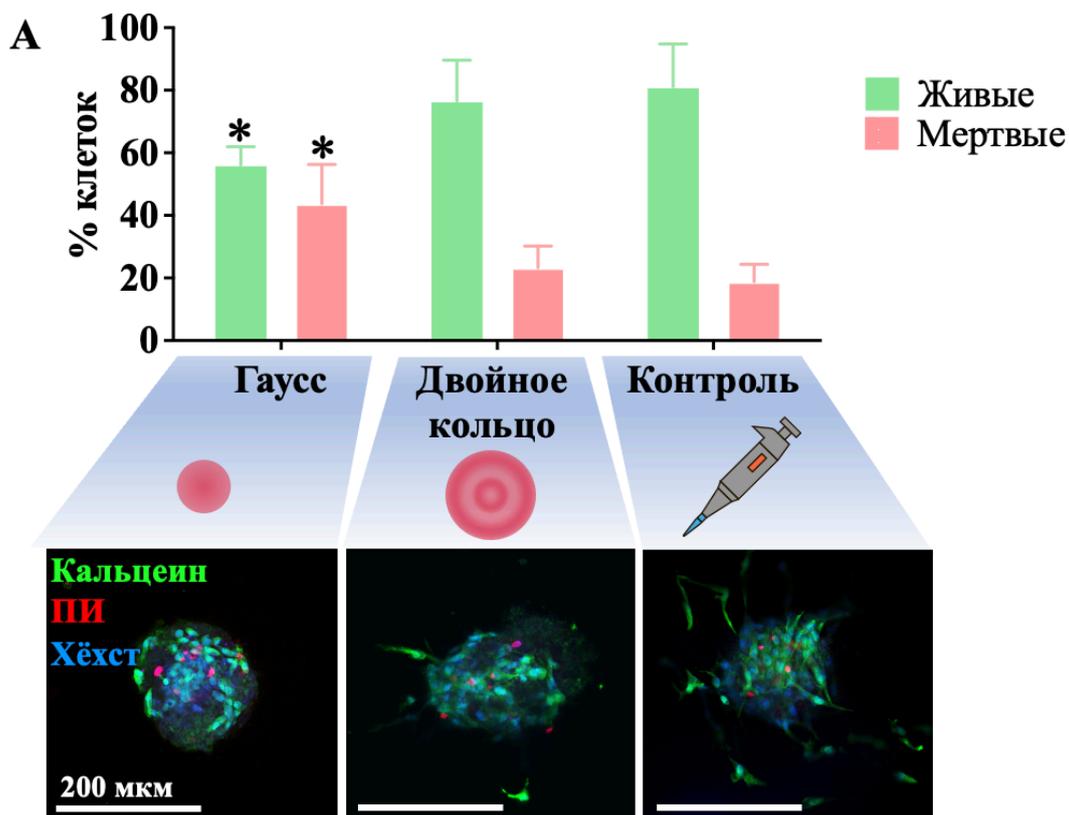


Рисунок 43 – Влияние LIFT на сфероиды. А) Выживаемость сфероидов. Тест Живой/Мертвый (конфокальная микроскопия). Флуоресцентное окрашивание живых клеток (кальцеином, свечение зеленым), мертвых клеток (пропидий йодидом, свечение красным), ядер (хехст, свечение синим). Б) Распластывание сфероидов (фазово-контрастная микроскопия). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. * $P < 0,05$

3.3.2. Биопечать сфероидов

На первом этапе доказана принципиальная применимость LIFT для переноса жизнеспособных сфероидов на гидрогелевую основу. Сфероиды

переносили в виде простых геометрических паттернов (Рисунок 44): линии, треугольника и квадрата. Для этого был выбран режим переноса с наибольшей выживаемостью клеток (с включенным Пи-шейпером, двойное кольцо). Сфероиды визуализировали с помощью фазово-контрастного и конфокального микроскопов. В случае последнего был также проведен качественный анализ Живой/Мертвый, который также показал высокую жизнеспособность напечатанных сфероидов: через день после биопечати во всех конструкциях можно было наблюдать большое количество зеленых жизнеспособных клеток.

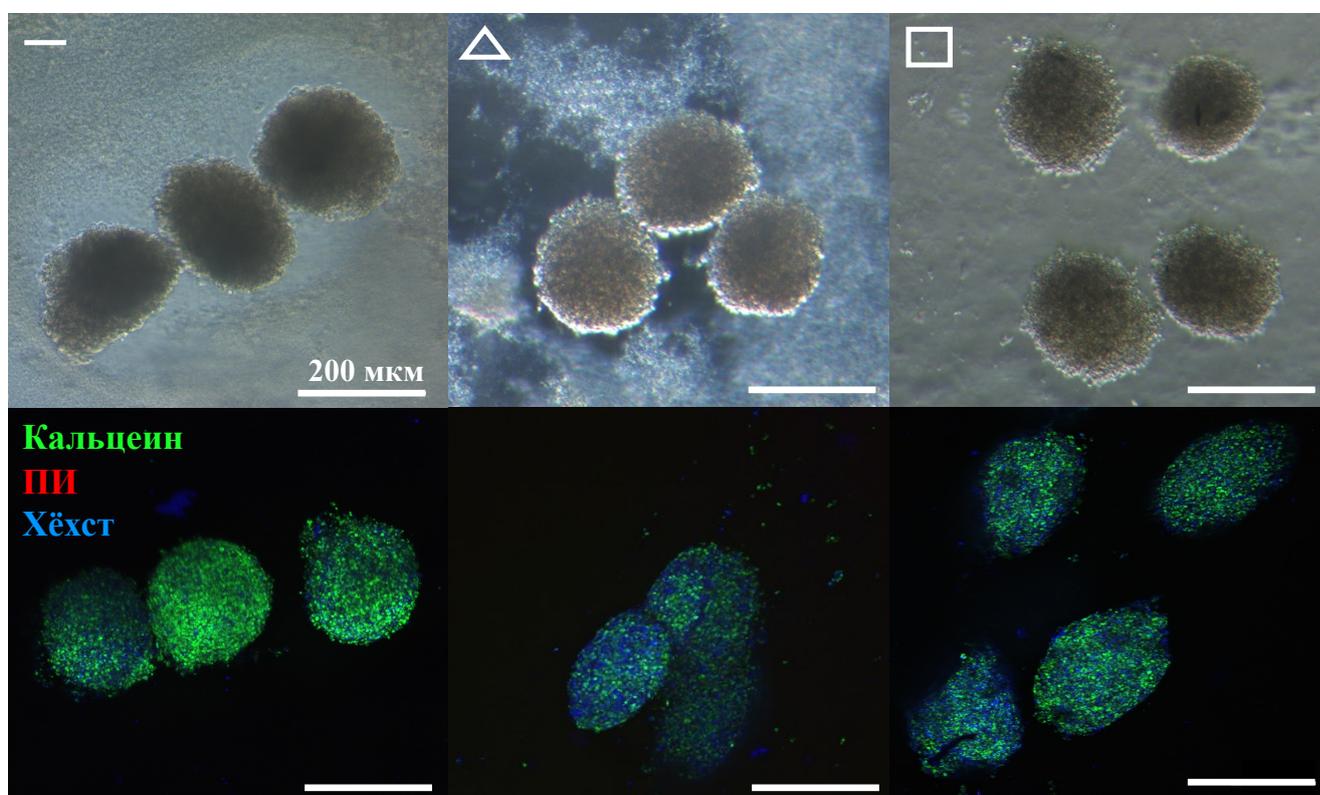


Рисунок 44 – Прецизионная LIFT-биопечать сфероидов. Визуализация сфероидов при помощи фазово-контрастной микроскопии (верхний ряд) и теста Живой/Мертвый, конфокальная микроскопия (нижний ряд). Флуоресцентное окрашивание живых клеток (кальцеином, свечение зеленым), мертвых клеток (пропидий йодидом, свечение красным), ядер (хехст, свечение синим)

На втором этапе LIFT также в режиме включенного Пи-шейпера (двойное кольцо) был применен для переноса жизнеспособных сфероидов на коллагеновую Янус-матрицу для создания модельного ТИК уретры. На Рисунке 45 показан модельный ТИК уретры, состоящий из коллагеновой Янус-матрицы, на которую

были напечатаны сфероиды из МСК. На поперечном срезе модельного ТИК (Рисунок 45А) можно увидеть его пористую Янус-структуру, где нижняя поверхность имеет «изъеденную» перфорированную поверхность, а верхняя поверхность гладкая и содержит наросший слой из клеток.

На Рисунке 45Б видно, как напечатанные LIFT сфероиды в режиме двойного кольца полностью сохранили свою жизнеспособность на 3-й день после печати, они активно распластываются, клетки из сфероидов мигрируют, и на поверхности коллагеновой Янус-матрицы формируется клеточный монослой. Окраска Живой/Мертвый и дальнейший количественный подсчет показали, что почти все клетки были живыми ($95 \pm 0.5\%$), в то время как мертвых клеток было минимальное количество ($5 \pm 0.5\%$).

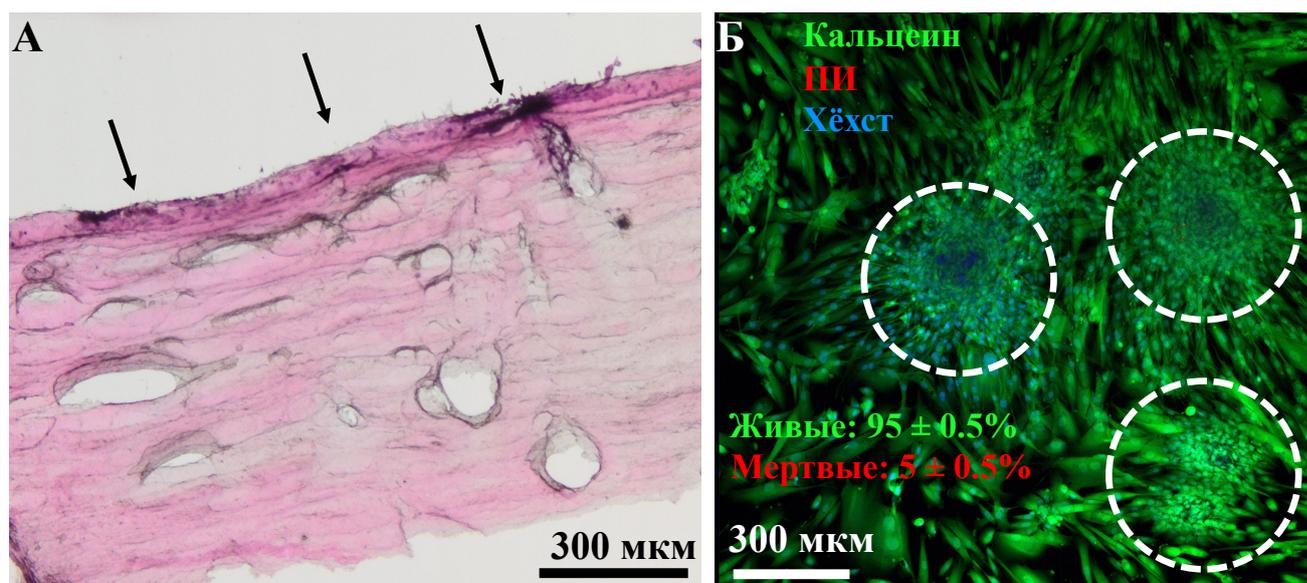


Рисунок 45 – Модельный тканеинженерный конструкт уретры. А – поперечный срез конструкта, окраска гематоксилин-эозин, светлопольная микроскопия.

Стрелки указывают на клеточный слой на поверхности. Б – поверхность конструкта с клетками, окраска Живой/Мертвый, конфокальная микроскопия.

Пунктиром обведены распластывающиеся сфероиды. Флуоресцентное окрашивание живых клеток (кальцеином, свечение зеленым), мертвых клеток (пропидий йодидом, свечение красным), ядер (хехст, свечение синим). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве источника фибриллярного коллагена I типа мы выбрали ахилловы сухожилия КРС по нескольким причинам. Во-первых, самое высокое содержание чистого коллагена I типа находится в сухожилиях [186, 187] и их возможно легко получить в необходимых количествах на скотобойнях. Во-вторых, суспензия фибриллярного коллагена будет более стабильной в процессе ЭФО, поскольку она не подвергается одновременному процессу фибриллогенеза [188], как в случае субфибрилярных и молекулярных его форм, и поэтому возможен больший контроль над процессом ЭФО. В-третьих, фибриллярный коллаген из ахилловых сухожилий сохраняет свою природную надмолекулярную структуру, и поэтому он более желателен для создания матриц из-за лучшей способности к передаче прорегенеративных сигналов клеткам и высоких прочностных свойств [189], что имеет большое значение для его хирургического применения.

В результате гель-электрофореза и ИК-спектроскопии было показано, что выделенный коллаген – чистый и не содержит посторонних примесей, а также относится к 1-му типу [52, 190–193]. АСМ подтвердила, что выделенный коллаген имеет фибриллярную структуру, причем в растворе из-за жестких условий выделения (высокой кислотности раствора и ферментативной обработки) также присутствовало некоторое количество зигзагообразных (частично разрушенных) фибрилл. Такие фибриллы имели мантию из деспирализованных микрофибрилл, окутывавших их основной стержень, однако это явление наблюдалась и в работах других авторов, применявших аналогичные жесткие протоколы по выделению коллагена, позволяющие, с другой стороны, выделить коллаген с максимальным выходом из исходного сырья [194, 195].

К третьему циклу ЭФО-ППБ коллагеновой матрицы в послойном режиме эффективность осаждения оказалась ниже на 30% в сравнении с предыдущими двумя. Это объясняется тем, что вновь формирующиеся слои коллагена на полупроницаемом барьере экранируют катод и тем самым снижают

эффективность притяжения к нему новых фибрилл [45]. В сравнении с высушенными на воздухе коллагеновыми матрицами матрицы ЭФО-ППБ имели аналогичные значения температуры сваривания, набухаемости и индекса сшивки, однако они отличались на микроструктурном уровне. Для высушенных на воздухе коллагеновых матриц была характерна большая гетерогенность и неоднородность структуры, что, по-видимому, связано с кинетикой их постепенного высыхания на воздухе [196], в то время как матрицы ЭФО-ППБ обладали равномерной ламинарной структурой, типичной для процесса электрофоретического осаждения [47].

Интересным оказалось и преимущество ЭФО-ППБ перед сушкой на воздухе и по части остаточной ДНК. В результате сушки на воздухе в структуре матриц остается больше ДНК, и ее количество находится около пороговых значений безопасности для биоматериалов, применяемых в медицинских целях (50 нг/мг) [197]. В то же время для ЭФО-ППБ образцов уровень остаточной ДНК был значительно ниже (33.4 нг/мг), и это, вероятно, может быть связано с отрицательным зарядом ДНК. Во время ЭФО она движется к аноду, в то время как коллагеновые фибриллы, заряженные положительно, движутся к катоду, и тем самым производимая матрица становится чище от находящейся в суспензии ДНК [198, 199].

При механических испытаниях матриц ЭФО-ППБ была выявлена закономерность возрастания модуля Юнга с увеличением количества циклов осаждения. Самый низкий модуль Юнга наблюдался у матриц после одного цикла осаждения, и это связано с их относительной негомогенностью. Негомогенность возникает в результате образования на катоде пузырей, которые некоторое время на нем сохраняются, прежде чем открепиться и всплыть. За этот промежуток на катоде образуется экранирующая область в месте формирования пузыря, которая мешает локальному осаждению коллагена в этой точке. По мере увеличения времени осаждения и открепления сформированных пузырей такие дефектные участки устраняются и заполняются коллагеном [45]. Кроме того, с увеличением количества циклов осаждения ранее осажденные слои все больше

«утрамбовываются» друг в друга и переплетаются, становясь плотнее, что также может вызывать общее упрочнение полученной многослойной структуры [200, 201].

В сравнении с электрофоретически осажденными матрицы, полученные сушкой на воздухе, были по механическим характеристикам приближены к матрицам ЭФО-ППБ одного цикла, что также свидетельствует об их негомогенности, связанной с кинетикой высыхания [196]. Тем не менее различия в деформации при разрыве для одноциклических ЭФО-ППБ матриц и высушенных на воздухе (54 ± 11 % против 28 ± 6 % соответственно) показывают то, что, по-видимому, метод ЭФО-ППБ способствует иной укладке коллагеновых фибрилл с большим числом межфибриллярных взаимодействий [202–204].

Об иной структуре межфибриллярной укладки и взаимодействиях свидетельствует и разница в механических свойствах сшитых образцов. Несмотря на то, что химическая сшивка матриц генипином снизила вклад структурных различий в статистически значимую разницу в модуле Юнга у матриц ЭФО-ППБ и полученных на воздухе [205, 206], она не сравняла значения деформации при разрыве и предела прочности, и для ЭФО-ППБ матриц всех циклов эти значения были существенно выше.

Сшивка также повлияла и на поведение клеток, которые культивировались на ЭФО-ППБ матрицах. Для сшитых образцов была заметна тенденция по уменьшению расплывания на них клеток – как МСК, так и фибробластов. И если для МСК это можно обосновать их большей нативной склонностью к расплыванию на менее жестком субстрате [207–209], то в случае фибробластов этот факт не согласуется с другими исследованиями [210, 211]. Вероятно, что дело в данной ситуации не только в жесткости материала, но и в доступности свободных его аминогрупп для связи с белками адгезии клеток: химическая сшивка, по-видимому, уменьшила их количество и заблокировала некоторые домены связывания [212–214]. Тем не менее после воздействия экстрактами обоих типов матриц на клетки их выживаемость была более 70% от контроля, и поэтому матрицы можно считать нетоксичными [24].

При имплантации ЭФО-ППБ матриц *in vivo* была продемонстрирована их возможность по-разному рассасываться (биodeградировать) в зависимости от сшивки. Кроме того, был показан и различный паттерн деградации в зависимости от сшивки: несшитые матрицы к 7-му дню после операции расслаивались на макрослой (3 слоя), соответствовавшие циклам осаждения, демонстрируя слабую межслойную адгезию [215]. Интересно, что третий (последний при осаждении) слой на поляризационной микроскопии показал меньшую плотность и большую подверженность к врастанию ткани, поскольку при ЭФО-ППБ он был дальше от катода и, следовательно, степень его притяжения и утрамбовывания была наиболее низкой [45].

Сшитая коллагеновая матрица вызвала более интенсивный гигантоклеточный ответ, чем несшитая, а также большую активацию миофибробластов. Несмотря на то, что коллаген является биodeградируемым, нетоксичным и полностью биосовместимым материалом, при его слишком большом сроке рассасывания инициируется физиологическая реакция на инородное тело [216]. Это является неизбежным, а ряд авторов считает, что такая реакция и вовсе положительна, поскольку может способствовать его более быстрой васкуляризации [217–219].

В абсолютных значениях деградация коллагеновых матриц существенно различалась в зависимости от сшивки. Сшитые матрицы биodeградировали в 3,5 раза медленнее несшитых, и при этом они не разволокнялись и не деламинировались, и наблюдалось лишь слабое врастание соединительной ткани с краев имплантата. Основная резорбция таких образцов происходила с их поверхностей. Стоит отметить, что эксперимент по оценке биodeградации шел в течение 21 дня, и полного цикла биodeградации матриц в нем зафиксировано не было. Однако на основании полученных данных (темпов и паттернов биodeградации) мы можем предположить, что для несшитых образцов срок биodeградации будет ограничен 1–1,5 месяцами, а в случае сшитых образцов – более 3 месяцев.

В работах пионеров тканевой инженерии уретры оптимальные сроки деградации используемых матриц варьируются от нескольких недель до месяцев – срока, за который эпителиальная выстилка успеет сформироваться и созреть поверх материала импланта для обеспечения барьерной функции [4, 220]. В то же время более длительные сроки их биодеградации могут вызвать гигантоклеточный ответ, профибротическую реакцию и, как следствие, стриктуру уретры [216, 221–223]. Исходя из полученных нами данных, для дальнейших экспериментов по уретропластике было решено выбрать химически несшитые ЭФО-ППБ матрицы, полученные в результате 3 циклов осаждения: они обладают наибольшей прочностью, лучшей адгезивностью для клеток, сроки их биодеградации попадают в оптимальное окно, а риск профибротических осложнений невысок.

При создании импланта для уретропластики необходимость придания Янус-структуры коллагеновым ЭФО-ППБ матрицам диктуется, с одной стороны, условиями создания барьера для проникновения мочи в окружающие ткани [224], а с другой – их более быстрой интеграцией в окружающие ткани и прорастанию сосудами [53]. Янус-структура, согласно определению [131], это такая структура, которая обладает двойственностью, названа в честь древнеримского бога Януса. В нашем случае одна сторона Янус-матрицы была неперфорированной (сплошной), а другая изрешечена перфорациями.

Неперфорированная сторона при имплантации Янус-матрицы была обращена внутрь просвета уретры – по ней нарастал эпителий. Неперфорированная сторона Янус-матрицы обеспечивала необходимый механический барьер для проникновения через нее мочи до момента, пока вновь выросший эпителий не приобретет достаточную барьерную функцию. Именно с проникновением мочи через толщу импланта и вызываемым этим хроническим воспалением окружающих тканей многие исследователи связывают вторичное образование стриктур окружающих тканей [3, 7, 225]. Тем не менее в текущем эксперименте, исходя из данных ретроградной цистоуретрографии, Янус-матрицы во всех случаях не допустили затекания мочи в окружающие ткани (Рисунок 32).

Другая поверхность была искусственно перфорирована – эта сторона плотно прилежала к дну тканевого дефекта стенки уретры (белочной оболочки пещеристых тел, на которую она пришивалась), что после имплантации обуславливало более быстрое врастание соединительной ткани и сосудов в ее толщу. Толща Янус-матрицы также быстро прорастала соединительной тканью и сосудами за счет пористости, полученной лиофилизацией. Такая эффективная биодеградация и интеграция импланта предотвращала гигантоклеточный профибротический ответ и таким образом сказывалась на эффективном заживлении дефекта уретры без формирования стриктур [226].

Улучшению результатов приживаемости и интеграции матрицы с окружающими тканями могла служить и схожесть ее механических параметров с нативной уретрой (модуль Юнга Янус-матрицы – 2.2 ± 0.5 МПа, в то время как у нативной уретры – 2 ± 0.7 МПа [96, 227]). В ряде исследований было показано, что такой природоподобный дизайн импланта является важным фактором, предотвращающим развитие негативных реакций на имплант и влияющим на эффективность последующей регенерации [228]. Схожесть механических свойств Янус-матрицы с уретрой обуславливалась, во-первых, пористостью матрицы [53], а также фибриллярностью коллагенового сырья – за счет неразрушенной нативной надмолекулярной структуры, подобной таковой в естественном внеклеточном матриксе [229].

Кроме того, фибриллярность обуславливала и механическую прочность создаваемой матрицы [230, 231]. Ни одна из имплантированных Янус-матриц не была подвержена образованию дефектов или повреждений при манипулировании хирургом и наложении швов. Стоит отметить, что в других работах по созданию пористых коллагеновых матриц упоминаются их плохие механические свойства [232–234]. В нашей работе мы создали пористые Янус-импланты, которые смогли выдержать прошивание хирургической нитью. Механическая прочность обуславливалась и методом плотной укладки матрицы при помощи ЭФО-ППБ. ЭФО позволяет достигнуть повышенной плотности укладки коллагена в

сравнении с другими методами его реконструкции и, как следствие, улучшенных механических свойств [235, 236].

Результаты имплантации созданных Янус-матриц показали, что матрица не вызвала фибротического ответа в окружающих тканях, а также каких-либо других осложнений в зоне имплантации. Как мы ожидали, Янус-матрица почти полностью биодegradировала в течение 45 суток с одновременной регенерацией эпителия. Интересно, что в сравнении с контрольной группой на первых сроках опыта (15 дней) в экспериментальной группе эпителизация шла медленнее, однако к 45 суткам этот темп сравнялся. Это связано непосредственно с наличием матрицы в области имплантации, а также процессом ее дегradации – для достаточной васкуляризации в области нарастания уротелия на ее поверхности требовалось время, пока сосуды из окружающих тканей прорастут в ее толщу. Такой результат является довольно необычным, поскольку в литературе, напротив, контрольные группы либо вовсе не эпителизировались [108], либо эпителизировались за аналогичный экспериментальным группам срок [95], либо их срок эпителизации и вовсе не был указан [86, 237].

Более того, в указанных работах гистологические исследования проводились, как правило, начиная с 4-й недели (с 28-го дня). Таким образом, начальные сроки регенерации стенки уретры для обеих групп в данных исследованиях проанализированы не были, что выгодно отличает наше исследование и увеличивает его ценность с точки зрения получения уникальных научных данных. Более высокая воспалительная реакция в экспериментальной группе на сроках 15–45 дней также обусловлена наличием матрицы в зоне дефекта, а также процессом ее биодegradации [41, 102, 225, 238], в то время как в результате полного рассасывания матрицы воспалительная инфильтрация на 180-е сутки в стенке уретры практически отсутствовала.

По сравнению с экспериментальной группой в контрольной наблюдалось формирование клинически ярко выраженных стриктур уретры уже к 45-м суткам эксперимента (2 из 3 кроликов). Мы намеренно по этическим соображениям завершили эксперимент в контрольной группе к этому сроку, поскольку

опирались на данные литературы [86, 95], где у 100% кроликов из контрольных групп без имплантации матрицы к 1–3 месяцу после операции развивалась стриктура уретры. Таким образом, наши результаты коррелировали с приведенными выше данными.

Несмотря на почти полное восстановление стенки уретры на 180-е сутки после наблюдения в экспериментальной группе и 100% успешности операций, в будущем для создания на основе Янус-матриц тубулярных конструктов, согласно ряду авторов, стоит рассмотреть возможность предзаселения их клеточным компонентом [18, 119]. Исследования с тубуляризованными конструктами всегда демонстрируют худшие показатели в сравнении с исследованиями по аугментационной уретропластике, и было показано, что клеточный эпителиальный компонент в случае тубуляризованных матриц может существенно улучшить прогноз [111]. Клеточный компонент будет дополнительно способствовать предотвращению проникновения мочи в окружающие ткани [91], а также ускорению сроков регенерации, улучшению ее качества [111].

С этой целью в данном исследовании была продемонстрирована пригодность LIFT для биопечати клеточных сфероидов на коллагеновые Янус-матрицы, что позволило нам создать модельный ТИК уретры. Модельным ТИК назван по причине того, что типами сфероидов, использованном при биопечати, были не фибробласты, эпителиальные или гладкомышечные клетки, составляющие основу нативной структуры уретры [239], а мезенхимальные стромальные клетки. Это обусловлено тем, что задачей данного этапа работы являлась не печать полноценного ТИК уретры, а демонстрация принципиальной возможности и методики его создания методом LIFT из сфероидов, что ранее не было описано в литературе [61]. Для этой задачи МСК подходили лучше остальных клеток по следующим причинам.

Выбор МСК как модели обусловлен тем, что они являются универсальным и одним из наиболее изученных типов клеток, способных к многолинейной дифференцировке, которые легко выделяются и экспандируются *in vitro*, а также

разрешены к клиническому применению [240]. Это делает МСК объектом выбора для многих работ, посвященных биопечати различных органов и тканей (в том числе нервной, хрящевой, костной, жировой) из сфероидов [54]. Поэтому для сравнения разработанного нами протокола с другими протоколами биопечати сфероидов и его валидации был выбран именно данный тип клеток. Таким образом, сфероиды из МСК служили универсальной моделью, которая в дальнейших работах будет заменена на любой из типов клеток, характерных для структуры стенки уретры.

Для биопечати мы использовали сфероиды, содержавшие ~2000 клеток и имевшие диаметр 150–200 мкм, что является оптимальным для предотвращения образования некротического ядра при обеспечении достаточной жизнеспособности и плотности клеток напечатанных конструкций [241, 242]. Кроме того, такой размер сфероидов подходит для их успешного отрыва от донорной подложки и переноса на коллекторную подложку, что было установлено в экспериментах Phamduy и др. [56] на альгинатных микробусинах разного размера, перенесенных методом LIFT.

При снижении вязкости в 2 раза за счет понижения концентрации ГК с 4 мг/мл до 2 мг/мл произошла смена режима печати: с формирования нависающего гидрогелевого «выступа» (нет печати) на струеобразование (точная печать) [243, 244]. Это объясняется двукратным снижением вязкости биочернил, что, очевидно, сделало энергию лазерного импульса достаточной для инициирования струи и переноса сфероидов [180]. В то же время печать без ГК и без DMEM инициировала хаотичный режим с разбрызгиванием и отклонением струи, что было обусловлено низкой вязкостью.

В ряде статей было показано, что лазерное излучение с гауссовым распределением энергии в пучке может негативно влиять на клетки, расположенные в центре лазерного пятна, и повреждать их из-за повышенного механического напряжения [245, 246] и температуры окружающей среды [247] во время LIFT-биопечати. Эта проблема может возникнуть и при переносе клеточных сфероидов (150–350 мкм), где основной негативный эффект будет

оказываться на их апикальную часть, которая находится ближе всего к поглощающему слою [248]. В данной работе для LIFT-биопечати использовалось устройство (Пи-шейпер), изменяющее распределение энергии в лазерном пучке на негауссово, что позволило снизить воздействие лазерного излучения на апикальную часть сфероидов (режим двойного кольца) [61].

Также за счет кольцевой схемы распределения энергии в лазерном пятне было достигнуто снижение градиентов давления в сфероиде и окружающем геле при лазерной печати. Это позволило сместить область максимального градиента давления за пределы области расположения сфероидов и осуществить его перенос без сильных перепадов давления [249]. В то же время наблюдаемый процент живых клеток при биопечати сфероидов на гидрогель в режиме двойного кольца (~80%) сопоставим с другими техниками биопечати (70–80% для экструзионной биопечати [165], 85–95% для Kenzan-биопечати [250] и акустической биопечати [164]). Высокая жизнеспособность клеток после биопечати была также обеспечена относительно низкой интенсивностью лазерного излучения в режиме двойного кольца (~0,17 Дж/см²), что даже ниже, чем в других исследованиях по биопечати с помощью LIFT (0,2-1,5 Дж/см²) [176,243,251,252].

Однако более слабое распластывание сфероидов ($1,12 \pm 0,36$ мм² против $1,9 \pm 0,16$ мм²) на 3-й день после биопечати в сравнении с контролем указывало на то, что сфероиды все еще подвергались некоторому стрессу во время LIFT [253–255]. Тем не менее при переносе сфероидов на Янус-матрицы также в режиме двойного кольца их выживаемость была на 3-й день выше, чем в случае переноса на гидрогель, и составила $95 \pm 0.7\%$. Такая выживаемость клеток является достаточной для адекватного формирования тканеинженерного конструкта [256] и может объясняться положительным влиянием коллагеновой Янус-подложки, способной представлять клеткам необходимые биологические сигналы для их адгезии и пролиферации [257, 258].

4.1. Ограничения исследования и дальнейшая работа

В данном исследовании мы применили наиболее простую модель уретропластики – без предварительного повреждения тканей уретры, и полученные результаты необходимо будет также валидировать в будущих экспериментах на более продвинутых и сложных моделях уретропластики: с развившимся фибротическим компонентом в зоне имплантации [75, 106, 108], а также с применением тубуляризованных имплантов [32, 225, 238].

Стоит также отметить, что в нашем эксперименте, а также во многих других исследованиях [82, 88, 95] были использованы молодые животные – у них регенерация происходит быстрее, однако для полной экстраполяции результатов на клиническое применение стоит рассмотреть возможность использования стареющих животных, поскольку стриктура уретры – это возраст-ассоциированное заболевание [1].

При создании модельного ТИК мы использовали МСК как наиболее удобный вид клеток, и разработанный нами протокол биопечати с помощью LIFT является первым шагом к созданию полноценного ТИК уретры. В дальнейшем разработанный нами протокол переноса сфероидов из МСК должен быть валидирован и на другие типы сфероидов. Кроме того, несмотря на то, что нам удалось прецизионно напечатать сфероиды при помощи LIFT на гидрогелевую основу в количестве 3–4 штук для воспроизведения простых геометрических фигур, модельный ТИК уретры был напечатан в хаотичном режиме и заселен одним слоем сфероидов.

Это связано с тем, что воспроизведение более сложной модели прецизионного нанесения сфероидов (например, многослойной для воспроизведения эпителиальной выстилки) на относительно большую площадь Янус-матрицы (2 см^2) с необходимой плотностью потребовало бы гораздо большего количества времени. Это, в свою очередь, было бы сопряжено с высокой вероятностью клеточной гибели, поскольку процесс переноса осуществлялся нами вручную [259]. Несомненно, в дальнейших работах для

раскрытия полного потенциала LIFT для создания ТИК и переноса сложных клеточных (сфероидных) паттернов будет необходимо автоматизировать этот процесс при помощи системы автоматического нацеливания [260].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты впервые практически демонстрируют потенциал ЭФО-ППБ для создания коллагеновых матриц, которые могут применяться для нужд тканевой инженерии. Разработанная технология ЭФО-ППБ позволила получать матрицы в полностью бездефектном виде при относительно высоком напряжении (60 В). Применение такого напряжения обеспечило получение матриц с более высокими прочностными характеристиками в сравнении с контрольными (высушенными на воздухе) образцами.

В результате биологических испытаний было показано, что и сшитые, и несшитые ЭФО-ППБ матрицы не обладают негативным действием на МСК и фибробласты линии 3Т3 – как в тесте с контактной цитотоксичностью, так и в экстракционном тесте. При имплантации под кожу крысам у коллагеновых матриц различались сроки биодеградации – сшитые матрицы биодеградировали на 21-й день в 3,5 раза медленнее несшитых. Несмотря на то, что обе матрицы, исходя из гистологической картины, были в достаточной мере биосовместимы, у сшитых матриц наблюдался профибротический и гигантоклеточный ответ. Поэтому для дальнейших экспериментов с уретропластикой было решено выбрать химически несшитые ЭФО-ППБ матрицы с минимальным риском профибротических осложнений, а также оптимальным сроком биодеградации.

На основе выбранных несшитых ЭФО-ППБ коллагеновых матриц при помощи лиофилизации и механической перфорации для экспериментов с уретропластикой были созданы Янус-матрицы. Особенностью Янус-матриц была двойственность их структуры: одна их сторона была неперфорированной и сплошной, вторая сторона была перфорированной. По неперфорированной стороне, обращенной после имплантации внутрь просвета уретры, нарастал эпителий, а также она обеспечивала барьерную функцию и предотвращала проникновение мочи в окружающие ткани. Внутри перфорированной стороны, обращенной ко дну дефекта уретры (белочной оболочке пещеристых тел), быстрее прорастала соединительная ткань и сосуды, необходимые для

неоэпителизации и биоинтеграции Янус-матрицы. Кроме того, Янус-матрица была схожа по механическим свойствам с нативной уретрой по механическим свойствам (их модуль Юнга был практически идентичным), что также является важным фактором для успешного приживления матриц и быстрого заживления тканевых дефектов.

За счет такого оптимально подобранного дизайна коллагеновой Янус-матрицы к 180-му дню после имплантации на модели аугментационной уретропластики наблюдалась полная эпителизация дефекта с почти полным восстановлением нативной структуры слизистой вплоть до восстановления сосочков. Матрица полностью биодegradировала к 45–90 суткам, вызвав вначале небольшой физиологический воспалительный ответ, который также к 180-м суткам регрессировал. Признаки фиброзно-рубцовых изменений в стенке слизистой уретры отсутствовали. Таким образом, созданная коллагеновая Янус-матрица продемонстрировала отличный потенциал для ее применения в целях аугментационной уретропластики.

В контрольной же группе к 45-м суткам у 2 из 3 животных развилась явная стриктура уретры, подтвердившаяся данными ретроградной цистоуретрографии, и эксперимент на этой точке был завершён по этическим соображениям. При этом к 45-м суткам слизистая оболочка уретры в области дефекта была восстановлена и полностью эпителизирована, однако сосочки слизистой оболочки отсутствовали, а уротелий был малодифференцированным, неоднородной толщины и с широко распространенной вакуольной дистрофией поверхностного слоя. В соединительнотканной основе слизистой оболочки развивался мощный фиброз: она была представлена фиброзно-рубцовой тканью с умеренной лимфомакрофагальной инфильтрацией и фиброзированными сосудами.

Для возможности улучшения прогноза применения Янус-матрицы в более сложных видах уретропластики (например, заместительной), мы разработали способ ее заселения 3D-клеточными сфероидными на основе МСК, создав тем самым модельный тканеинженерный конструкт уретры. Нами впервые была доказана принципиальная применимость метода лазерно-индуцированного

прямого переноса (LIFT) для биопечати 3D-клеточных сфероидов с высокой выживаемостью. Это стало возможным за счет применения специального устройства – Пи-шейпера, способного менять гауссово распределение энергии в лазерном пучке (повреждающее сфероиды) на негауссово (в форме двойного кольца, минимизирующего негативное воздействие на сфероид). В дальнейших работах LIFT-биопечать будет применена для прецизионного переноса сфероидов на основе клеток, специфичных для уретры (эпителиальной и гладкомышечной природы), с высокой плотностью и упорядоченностью, что позволит создать полноценный и функциональный тканеинженерный конструкт уретры.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная технология электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером, позволяющая получать прочные коллагеновые матрицы с бездефектной и плотноупакованной структурой. За счет химической сшивки возможно регулировать механические свойства матриц в широком диапазоне: модуль Юнга (7–64 МПа), деформацию при разрыве (24–60%) и предел прочности (2–10 МПа).

2. Установлено, что несшитые и сшитые коллагеновые матрицы не оказывают контактного цитотоксического действия на клетки (МСК и 3Т3). Экстракты обоих типов матриц также оказались нетоксичными для клеток (выживаемость >70%).

3. Показано, что на 21-й день после подкожной имплантации крысам сшитые матрицы резорбируются в 3,5 раза медленнее несшитых, а также вызывают гигантоклеточную реакцию и активацию миофибробластов. Таким образом, для Янус-модификации были выбраны несшитые коллагеновые матрицы.

4. Разработан способ получения матриц с Янус-структурой из несшитых коллагеновых матриц при помощи механической перфорации и лиофилизации. Одна сторона таких Янус-матриц является сплошной и неперфорированной, другая содержит перфорации; толщина Янус-матриц пористая.

5. Янус-матрицы были успешно испытаны на модели аугментационной уретропластики: к 180-му дню после имплантации слизистая в области дефекта почти полностью регенерировала, а стриктура не развилась ни у одного из кроликов. В контрольной группе эксперимент был остановлен на 45-й день по этическим причинам – 2 из 3 кроликов имели клинически выраженную стриктуру.

6. Разработана оригинальная технология биопечати клеточных сфероидов методом лазерно-индуцированного прямого переноса с применением оптического устройства – Пи-шейпера. Данной технологией сфероиды из мезенхимальных стромальных клеток были перенесены на коллагеновую Янус-матрицу с высокой

выживаемостью ($95 \pm 0,5\%$), что позволило создать модельный тканеинженерный конструкт уретры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод электрофоретического осаждения с полупроницаемым барьером позволяет получить прочные бездефектные коллагеновые матрицы, пригодные для хирургического применения. Созданные на их основе Янус-матрицы могут использоваться в качестве трансплантатов для аугментационной уретропластики.

2. Применение Пи-шейпера для изменения распределения энергии в лазерном пучке при LIFT-биопечати сфероидов позволяет существенно увеличить их выживаемость. LIFT-биопечать с использованием Пи-шейпера можно использовать для создания ТИК уретры на основе сфероидов и коллагеновых Янус-матриц.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ПМК – полимолочная кислота
- ПГК – полигликолевая кислота
- ПКЛ – поликапролактон
- ЭФО – электрофоретическое осаждение
- ППБ – полупроницаемый барьер
- ЭФО-ППБ – электрофоретическое осаждение с полупроницаемым барьером
- LIFT – laser-induced forward transfer (рус. – лазерно-индуцированный прямой перенос)
- ТИК – тканеинженерный конструкт
- FDA – Food and Drug Administration (рус. – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)
- α-SMA – альфа-актин гладких мышц
- ВММП – внеклеточный матрикс мочевого пузыря
- БЦ – бактериальная целлюлоза
- МСК – мезенхимальные стромальные клетки
- FGFR2 – рецептор фактора роста фибробластов-2
- CD – кластер дифференцировки
- Л-ПЛА – L-полилактид
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- АЕ – антитела против панцитокератина
- ПЛГ – полилактид-ко-гликолид
- ПОТК – подслизистая основа тонкой кишки
- ПОМП – подслизистая основа мочевого пузыря
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- КРС – крупный рогатый скот
- ГК – гиалуроновая кислота

GMP – Good Manufacturing Practice (рус. – надлежащая производственная практика)

АСМ – атомно-силовая микроскопия

США – Соединенные Штаты Америки

НИН – National Institute of Health (рус. – Национальный институт здоровья)

pI – изоэлектрическая точка

ИК – инфракрасный

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

OD – optical density (рус. – оптическая плотность)

CI – crosslinking index (рус. – индекс сшивки)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

3Т3 – линия клеток фибробластов мыши

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (рус. – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)

bFGF – basic fibroblast growth factor (рус. – основной фактор роста фибробластов)

FCS – fetal calf serum (рус. – фетальная телячья сыворотка)

ПОД – послеоперационный день

Г&Э – окраска гематоксилин-эозином

ПСК – пикросириус красный

PEG-NHS – O,O'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил]поли(этиленгликоль)

G' – модуль сохранения

G'' – модуль потерь

ANOVA – analysis of variance (рус. – дисперсионный анализ)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alwaal, A. Epidemiology of urethral strictures / A. Alwaal, S.D. Blaschko, J.W. McAninch, B.N. Breyer // *Translational Andrology and Urology*. – 2014. – Vol 3. – No 2. – P. 209-213.
2. Mangera, A. A systematic review of graft augmentation urethroplasty techniques for the treatment of anterior urethral strictures / A. Mangera, J.M. Patterson, C.R. Chapple // *European Urology*. – 2011. – Vol 59. – Issue 5. – P. 797-814.
3. Abbas, T.O. From acellular matrices to smart polymers: degradable scaffolds that are transforming the shape of urethral tissue engineering / T.O. Abbas, H.C. Yalcin, C.P. Pennisi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – E1763.
4. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies / A. Atala, M. Danilevskiy, A. Lyundup, [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2017. – Vol. 11. – Issue 1. – P. 3-19.
5. Santucci, R.A. Male Urethral Stricture Disease / R.A. Santucci, G.F. Joyce, M. Wise // *Journal of Urology*. – 2007. – Vol. 177. – Issue 5. – P. 1667-1674.
6. Porcine Small Intestinal Submucosa Graft for Repair of Anterior Urethral Strictures / R. Fiala, A. Vidlar, R. Vrtal, [et al.] // *European Urology*. – 2007. – Vol. 51. – Issue 6. – P. 1702-1708.
7. Bioengineered Scaffolds as Substitutes for Grafts for Urethra Reconstruction / M. Culenova, D. Bakos, S. Ziaran, [et al.] // *Materials*. – 2019. – Vol. 12. – Issue 20. – Article number: 3449.
8. Denstedt, J. Biomaterials and Tissue Engineering in Urology / J. Denstedt, A. Atala. – Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing, 2009. – 592 p. – ISBN: 978-1-84-569402-9. – Текст: непосредственный.
9. Ribeiro-Filho, L.A. Acellular matrix in urethral reconstruction / L.A. Ribeiro-Filho, K.D. Sievert // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2015. – Vol. 82-83. – P. 38-46.

10. Osteochondral tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications / P. Nooeaid, V. Salih, J.P. Beier, [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 16. – Issue 10. – P. 2247-2270.
11. Chen, G. Hybrid biomaterials for tissue engineering: A preparative method for PLA or PLGA-collagen hybrid sponges / G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi // *Advanced Materials*. – 2000. – Vol. 12. – Issue 6. – P. 455-457.
12. Carmagnola I. Scaffold functionalization to support a tissue biocompatibility / I. Carmagnola, E. Ranzato, V. Chiono // *Functional 3D tissue engineering scaffolds: materials, technologies, and applications* / ed. by Y. Deng, J. Kuiper. – Duxford, United Kingdom: Elsevier/Woodhead Publishing. – 2018. – P. 255-277.
13. Nosrati, H. A review on some natural biopolymers and their applications in angiogenesis and tissue engineering / H. Nosrati, S. Pourmotabed, E. Sharifi // *Journal of Applied Biotechnology Reports*. – 2018. – Vol. 5. – Issue 3. – P. 81-91.
14. Moon, J.J. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angiogenesis in biomaterials / J.J. Moon, J.L. West // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 5. – Issue 3. – P. 300-310.
15. Regenerative and engineered options for urethroplasty / F. Pederzoli, G. Joice, A. Salonia, [et al.] // *Nature Reviews Urology*. – 2019. – Vol. 16. – P. 453-464.
16. Wang, Y. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering / Y. Wang, Z. Wang, Y. Dong // *ACS. Biomaterials Science and Engineering*. – 2023. – Vol. 9. – Issue 3. – P. 1132-1150.
17. Tissue Engineering of the Urethra: A Systematic Review and Meta-analysis of Preclinical and Clinical Studies [Figure presented] / L.R.M. Versteegden, P.K.J.D. de Jonge, J. IntHout, [et al.] // *European Urology*. – 2017. – Vol. 72. – Issue 4. – P. 594-606.
18. Qi, N. A systematic review of animal and clinical studies on the use of scaffolds for urethral repair / N. Qi, W. jiao Li, H. Tian // *Journal of Huazhong University of Science and Technology: Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 36. – P. 111-117.

19. Reddy, R. Biomimetic approaches for tissue engineering / R. Reddy, N. Reddy // *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. – Vol. 29. – Issue 14. – P. 1667-1685.
20. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs / N. Ashammakhi, S. Ahadian, C. Xu, [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2019. – Vol. 1. – E100008.
21. Ozbolat, I.T Application areas of 3D bioprinting / I.T. Ozbolat, W. Peng, V. Ozbolat // *Drug Discovery Today*. – 2016. – Vol. 21. – Issue 8. – P. 1257-1271.
22. Strategies for 3D bioprinting of spheroids: A comprehensive review / D. Banerjee, Y.P. Singh, P. Datta, [et al.] // *Biomaterials*. – 2022. – Vol. 291. – E121881.
23. Liu, D. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development / D. Liu, S. Chen, M. Win Naing // *Biotechnology & Applied Microbiology*. – 2021. – Vol. 118. – Issue 2. – P. 542-554.
24. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro / I.M. Zurina, A.I. Shpichka, I.N. Saburina, [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2018. – Vol. 13. – No 5. – E054104.
25. Decellularized matrices for tissue engineering / T. Hoshiba, H. Lu, N. Kawazoe, [et al.] // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2010. – Vol. 10. – Issue 12. – P. 1717-1728.
26. Patient-to-patient variability in autologous pericardial matrix scaffolds for cardiac repair / S.B. Seif-Naraghi, D. Horn, P.A. Schup-Magoffin, [et al.] // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. – 2011. – Vol. 4. – P. 545-556.
27. Mammalian Pericardium-Based Bioprosthetic Materials in Xenotransplantation and Tissue Engineering / E.A. Grebenik, E.R. Gafarova, L.P. Istranov, [et al.] // *Biotechnology Journal*. – 2020. – Vol. – Issue 8. – Article number: 1900334.
28. Applications of decellularized materials in tissue engineering: Advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives / J. Liao, B. Xu, R. Zhang, [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – Vol. 20. – No 8. – P. 10023-10049.

29. Local delivery of pirfenidone by pla implants modifies foreign body reaction and prevents fibrosis / A. Fayzullin, S. Churbanov, N. Ignatieva, [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – Article number: 853.
30. Wong, M.L. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal vs. decellularization / M.L. Wong, L.G. Griffiths // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10. – Issue 5. – P. 1806-1816.
31. Roth, C.C. Recent advances in urologic tissue engineering / C.C. Roth, B.P. Kropp // *Current Urology Reports*. – 2009. – Vol. 10. – P. 119-125.
32. Engineered acellular collagen scaffold for endogenous cell guidance, a novel approach in urethral regeneration / K. Pinnagoda, H.M. Larsson, G. Vythilingam, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – Vol. 43. – P. 208-217.
33. Weadock, K. Evaluation of collagen crosslinking techniques / K. Weadock, R.M. Olson, F.H. Silver // *Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs*. – 1983. – Vol. 11. – Issue 4. – P. 293-318.
34. Effect of the application of a dehydrothermal treatment on the structure and the mechanical properties of collagen film / X. Chen, L. Zhou, H. Xu, [et al.] // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – No 2. – Article number: 377.
35. Wess, T.J. Changes in collagen structure: Drying, dehydrothermal treatment and relation to long term deterioration / T.J. Wess, J.P. Orgel // *Thermochimica Acta*. – 2000. – Vol. 365. – Issues 1-2. – P. 119-128.
36. Stability of collagen during denaturation / R. Penkova, I. Goshev, S. Gorinstein, [et al.] // *Journal of Protein Chemistry*. – 1999. – Vol. 18. – P. 397-401.
37. Hayashi, T. Effect in of pH on the Stability of Collagen Molecule Solution / T. Hayashi, Y. Nagai // *The Journal of Biochemistry*. – 1973. – Vol. 73. – Issue 5. – P. 999-1006.
38. Urethral reconstruction of critical defects in rabbits using molecularly defined tubular type i collagen biomatrices: Key issues in growth factor addition / J.E. Nuninga, M.J.W. Koens, D.M. Tiemessen, [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2010. – Vol. 16. – No. 11. – P. 3319-3328.

39. Recent progress in tissue engineering and regenerative medicine / Z. Li, M. Bin Xie, Y. Li, [et al.] // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. – 2016. – Vol. 6. – P. 755-766.
40. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties / R.J. Kane, H.E. Weiss-Bilka, M.J. Meagher, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2015. – Vol. 17. – P. 16-25.
41. HA-coated collagen nanofibers for urethral regeneration via in situ polarization of M2 macrophage / Y. Niu, F.J. Stadler, X. Yang, [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19. – Article number: 283.
42. New polymers for needleless electrospinning from low-toxic solvents / M. Wortmann, N. Frese, L. Sabantina, [et al.] // *Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 9. – Issue 1. – Article number: 52.
43. Study on structure, mechanical property and cell cytocompatibility of electrospun collagen nanofibers crosslinked by common agents / X. Luo, Z. Guo, P. He, [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 113. – P. 476-486.
44. Electrobiofabrication: electrically based fabrication with biologically derived materials., *Biofabrication* / J. Li, S. Wu, E. Kim, [et al.] // *Biofabrication*. – 2019. – Vol. 11. – No 3. – Article number: 032002.
45. Sikkema, R. Electrophoretic deposition of polymers and proteins for biomedical applications / R. Sikkema, K. Baker, I. Zhitomirsky // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2020. – Vol. 284. – Article number: 102272.
46. Electrochemical fabrication of a biomimetic elastin-containing bi-layered scaffold for vascular tissue engineering / T.U. Nguyen, M. Shojaee, C.A. Bashur, [et al.] // *Biofabrication*. – 2019. – Vol. 11. – No 1. – Article number: 15007.
47. Fabrication of free-standing collagen membranes by pulsed-electrophoretic deposition / D.J. Barrett, M.D. Linley, S.M. Best, [et al.] // *Biofabrication*. – 2019. – Vol. 11. – No 4. – Article number: 045017.
48. In vitro characterization of electrochemically compacted collagen matrices for corneal applications / V. Kishore, R. Iyer, A. Frandsen, [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2016. – Vol. 11. – Article number: 55008.

49. An electrochemically deposited collagen wound matrix combined with adipose-derived stem cells improves cutaneous wound healing in a mouse model of type 2 diabetes / N. Edwards, D. Feliers, Q. Zhao, [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2018. – Vol. 33. – Issue 4. – P. 553-565.
50. Ghodbane, S.A. Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons / S.A. Ghodbane, M.G. Dunn // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2016. – Vol. 104. – Issue 11. – P. 2685-2692.
51. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering / A.D. Nocera, R. Comín, N.A. Salvatierra [et al.] // *Biomedical Microdevices*. – 2018. – Vol. 20. – Article number: 26.
52. Oriented collagen fiber membranes formed through counter-rotating extrusion and their application in tendon regeneration / S. Yang, X. Shi, X. Li, [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 207. – P. 61-75.
53. Mechanical, compositional and morphological characterisation of the human male urethra for the development of a biomimetic tissue engineered urethral scaffold / E.M. Cunnane, N.F. Davis, C. V. Cunnane, [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – Vol. 269. – Article number: 120651.
54. Building a tissue: gingiva- and adipose-derived mesenchymal cell spheroids' survivability and functionality after 3D extrusion bioprinting / P. Bikmulina, N. Kosheleva, Y. Efremov, [et al.] // *Bioprinting*. – 2023. – Vol. 32. – E00279.
55. LIFT-bioprinting, is it worth it? / A.A. Antoshin, S.N. Churbanov, N. V. Minaev, [et al.] // *Bioprinting*. – 2019. – Vol. 15. – E00052.
56. Laser direct-write of single microbeads into spatially-ordered patterns / T.B. Phamduy, N.A. Raof, N.R. Schiele, [et al.] // *Biofabrication*. – 2012. – Vol. 4. – Issue 4. – Article number: 025006.
57. Single-step laser-based fabrication and patterning of cell-encapsulated alginate microbeads / D.M. Kingsley, A.D. Dias, D.B. Chrisey, [et al.] // *Biofabrication*. – 2013. – Vol. 5. – Issue 4. – Article number: 045006.

58. Laser direct-write based fabrication of a spatially-defined, biomimetic construct as a potential model for breast cancer cell invasion into adipose tissue / B.T. Vinson, T.B. Phamduy, J. Shipman, [et al.] // *Biofabrication*. – 2017. – Vol. 9. – Issue 2. – Article number: 025013.
59. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks / V. Mironov, R.P. Visconti, V. Kasyanov, [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30. – P. 2164-2174.
60. LIFT of cell spheroids: Proof of concept / A. Antoshin, E. Minaeva, P. Koteneva, [et al.] // *Bioprinting*. – 2023. – Vol. 34. – E00297.
61. Laser Bioprinting with Cell Spheroids: Accurate and Gentle, Micromachines / E.D. Minaeva, A.A. Antoshin, N. V Kosheleva [et al.] // *Micromachines*. – 2023. – Vol. 14. – Issue 6. – Article number: 1152.
62. Treatment of urethral stricture disease in women: Nonsystematic review of surgical techniques and intraoperative considerations / K.J. Chua, M. Mikhail, H. V. Patel, [et al.] // *Research and Reports in Urology*. – 2021. – Vol. 13. – P. 381-406.
63. Anatomy and histology of the lower urinary tract / W. Pradidarcheep, C. Wallner, N.F. Dabhoiwala, [et al.] // *Urinary Tract. Handbook of Experimental Pharmacology* / ed. by K.E. Andersson, M. Michel. –Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. – P. 117-148.
64. Mills, S.E. *Histology for Pathologists*. / S.E. Mills. – Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2012. – 1328 p. – ISBN: 978-1-49-639894-9. – Текст: непосредственный.
65. Stoddard, N. *Histology, Male Urethra* / N. Stoddard, SW. Leslie. – StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. – PMID: 31194395.
66. Semiology of the male urethra ultrasonography. Key concepts: [poster : materials of “ECR 2016” Congress, Vienna, March 2-6 2016] / L.K. Cifuentes Gaitan, E. Salinas, D. Sossa, [et al.]. -Текст: электронный // EPOS. – URL: <https://epos.myesr.org/>.
67. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices // R.E. De Filippo, B.S. Kornitzer, J.J. Yoo, [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2015. – Vol. 9. – Issue 3. – P. 257-264.

68. The multilayered structure of the human corpus spongiosum / P. De Graaf, R. Ramadan, E.C. Linssen, [et al.] // *Histol Histopathol.* – 2018. – Vol. 33. – Issue 12. – P. 1335-1345.
69. Regional differences in the extracellular matrix of the human spongy urethra as evidenced by the composition of glycosaminoglycans / E.A. Da Silva, F.J.B. Sampaio, V. Ortiz, [et al.] // *Journal of Urology.* – 2002. – Vol. 167. – Issue 5. – P. 2183-2187.
70. Российская Федерация. Министерство здравоохранения. Клинические рекомендации «Стриктура уретры. МКБ 10: N35. Возрастная категория: взрослые». Министерство здравоохранения: офиц. сайт. URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/651_1 (дата обращения: 11.10.2023).
71. Mechanically-competent and cytocompatible polycaprolactone-borophosphosilicate hybrid biomaterials / D. Mondal, S.J. Dixon, K. Mequanint, [et al.] // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* – 2017. – Vol. 75. – P. 180-189.
72. Oladapo, B.I. 3D printing of bone scaffolds with hybrid biomaterials / B.I. Oladapo, S.A. Zahedi, A.O.M. Adeoye // *Composites Part B: Engineering.* – 2019. – Vol. 158. – P. 428-436.
73. Application of Tissue Engineering Construct Seeded with Buccal Epithelium Cells for Replacement Urethroplasty / N.M. Yuditceva, Y.A. Nashchekina, M.A. Shevtsov, [et al.] // *Cell and Tissue Biology.* – 2020 – Vol. 14. – P. 481-491.
74. Bucciarelli, A. Use of Bombyx mori silk fibroin in tissue engineering: From cocoons to medical devices, challenges, and future perspectives / A. Bucciarelli, A. Motta // *Biomaterials Advances.* – 2022. – Vol 139. – E212982.
75. Repair of injured urethras with silk fibroin scaffolds in a rabbit model of onlay urethroplasty / K. Algarrahi, S. Affas, B.S. Sack, [et al.] // *Journal of Surgical Research: Clinical and Laboratory Investigation.* – 2018. – Vol. 229. – P. 192-199.
76. Prevascularized bladder acellular matrix hydrogel/silk fibroin composite scaffolds promote the regeneration of urethra in a rabbit model / N. Cao, L. Song, W. Liu, [et al.] // *Biomedical Materials.* –2019. – Vol. 14. – No 1. – Article number: 015002.

77. Biomaterial-Based Scaffolds as Antibacterial Suture Materials / S. Fan, K. Chen, W. Yuan, [et al.] // ACS. Biomaterials Science & Engineering. – 2020. – Vol. 6. – P. 3154-3161.
78. Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering / X. Lv, Z. Li, S. Chen, [et al.] // Biomaterials. – 2016 – Vol. 84. – P. 99-110.
79. Comparative study of different seeding methods based on a multilayer SIS scaffold: Which is the optimal procedure for urethral tissue engineering? / X.G. Lv, C. Feng, Q. Fu, [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2016. – Vol. 4. – Issue 6. – P. 1098-1108.
80. Development of a cellulose-based prosthetic mesh for pelvic organ prolapse treatment: In vivo long-term evaluation in an ewe vagina model / C. Lai, S.J. Zhang, X.C. Chen, [et al.] // Materials Today Bio. – 2021. – Vol. 12. – Article number: 100172.
81. Double-Modified Bacterial Cellulose/Soy Protein Isolate Composites by Laser Hole Forming and Selective Oxidation Used for Urethral Repair / J. Yang, Z. Zhu, Y. Liu, [et al.] // Biomacromolecules. – 2022. – Vol. 23. – Issue 1. – P. 291-302.
82. Clinical application of a double-modified sulfated bacterial cellulose scaffold material loaded with FGFR2-modified adipose-derived stem cells in urethral reconstruction / Z. Zhu, J. Yang, X. Ji, [et al.] // Stem Cell Research & Therapy. – 2022. – Vol. 13. – Article number: 463.
83. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion / A. Bodin, S. Bharadwaj, S. Wu, [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – Issue 34. – P. 8889-8901.
84. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model / J.W. Huang, X.G. Lv, Z. Li, [et al.] // Biomedical Materials. – 2015. – Vol. 10. – No 5. – Article number: 05505.
85. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers / Y. Ramot, M. Haim-Zada, A.J. Domb [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 107. – P. 153-162.

86. Outcome of small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures / Y.M. Xu, Q. Fu, Y.L. Sa, [et al.] // *International Journal of Urology*. – Vol. 20. – Issue 6. – P. 622-629.
87. Effects of carbodiimide crosslinking conditions on the physical properties of laminated intestinal submucosa / K. Billiar, J. Murray, D. Laude, [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2001. – Vol. 56. – Issue 1. – P. 101-108.
88. Repair of urethral defects with polylactide acid fibrous membrane seeded with adipose-derived stem cells in a rabbit model / D.J. Wang, M.Y. Li, W.T. Huang, [et al.] // *Connective Tissue Research*. – 2015. – Vol. 56. – Issue 6. – P. 434-439.
89. Cell-to-cell contact induces human adipose tissue-derived stromal cells to differentiate into urothelium-like cells in vitro / J. Liu, J. Huang, T. Lin, [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009. – Vol. 390. – Issue 3. – P. 931-936.
90. Iyer, S.S. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: Novel concept for future therapies / S.S. Iyer, M. Rojas // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2008. – Vol. 8. – P. 569-581.
91. Electrospun PLGA and PLGA/gelatin scaffolds for tubularized urethral replacement: Studies in vitro and in vivo / J. Hu, B. Ai, S. Zhu, [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2022. – Vol. 36. – Issue 6. – P. 956-964.
92. Zou, Q. Tissue engineering for urinary tract reconstruction and repair: Progress and prospect in China / Q. Zou, Q. Fu // *Asian Journal of Urology*. – 2018. – Vol. 5. – Issue 2. – P. 57-68.
93. Recent advances in tissue engineering scaffolds based on polyurethane and modified polyurethane / B. Naureen, A.S.M.A. Haseeb, W.J. Basirun, [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2021. – Vol. 118. – Article number: 111228.
94. In vivo degradation of polyurethane foam with 55 wt % polyethylene glycol / F.I. Broekema, M.B.M. Van Leeuwen, B. Van Minnen [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2015. – Vol. 103. – Issue 11. – P. 3666-3675.
95. Stretchable collagen-coated polyurethane-urea hydrogel seeded with bladder smooth muscle cells for urethral defect repair in a rabbit model / C. Wang, C. Chen, M.

Guo, [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2019. – Vol. 30. – Article number: 135.

96. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction / C. Feng, Y.M. Xu, Q. Fu, [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2010. – Vol. 94. – P. 317-325.

97. Urethral reconstruction using an amphiphilic tissue-engineered autologous polyurethane nanofiber scaffold with rapid vascularization function / Y. Niu, G. Liu, C. Chen, [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2020. – Vol. 8. – P. 2164-2174.

98. Designing a multifaceted bio-interface nanofiber tissue-engineered tubular scaffold graft to promote neo-vascularization for urethral regeneration / Y. Niu, G. Liu, M. Fu, [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1748-1758.

99. Small Intestinal Submucosa (SIS) Graft Urethroplasty: Short-term Results / E. Palminteri, E. Berdondini, F. Colombo, [et al.] // *European Urology*. – 2007. – Vol. 51. – Issue 6. – P. 1695-1701.

100. Long-term results of small intestinal submucosa graft in bulbar urethral reconstruction / E. Palminteri, E. Berdondini, F. Fusco, [et al.] // *Urology*. – 2012. – Vol. 79. – Issue 3. – P. 695-701.

101. Bladder cell culture on small intestinal submucosa as bioscaffold: Experimental study on engineered urothelial grafts / F. Campodonico, R. Benelli, A. Michelazzi, [et al.] // *European Urology*. – 2004. – Vol. 46. – Issue 4. – P. 531-537.

102. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model / Y. Liu, W. Ma, B. Liu, [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8. – No. 64. – P. 5-10.

103. Tensile strength of cadaveric fascia lata compared to small intestinal submucosa using suture pull through analysis / W.S. Kubricht, B.J. Williams, J.A. Eastham, [et al.] // *Journal of Urology*. – 2001. – Vol. 165. – Issue 2. – P. 486-490.

104. Urethral Reconstruction with Small Intestinal Submucosa Seeded with Oral Keratinocytes and TIMP-1 siRNA Transfected Fibroblasts in a Rabbit Model / H. Guo, Y. Sa, J. Huang, [et al.] // *Urologia Internationalis*. – 2016. – Vol. 96. – P. 223-230.

105. Development of a cell-seeded modified small intestinal submucosa for urethroplasty / L. Zhang, A. Du, J. Li, [et al.] // *Heliyon*. – 2016. – Vol. 2. – No 3. – E00087.
106. Creation of Tissue-Engineered Urethras for Large Urethral Defect Repair in a Rabbit Experimental Model / M.V. Amesty, C.I. Chamorro, P. López-Pereira, [et al.] // *Frontiers in Pediatrics*. – 2021. – Vol. 9. – P. 11-31.
107. Epithelial-differentiated adipose-derived stem cells seeded bladder acellular matrix grafts for urethral reconstruction: An animal model / H. Li, Y. Xu, H. Xie, [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2014. – Vol. 20. – No. 3. – P. 774-784.
108. Urethroplasty using autologous urethral tissue-embedded acellular porcine bladder submucosa matrix grafts for the management of long-segment urethral stricture in a rabbit model / S.Y. Chun, B.S. Kim, S.Y. Kwon, [et al.] // *Journal of Korean Medical Science*. – 2015. – Vol. 30. – No. 8. – P. 301-307.
109. Reconstruction of penile urethra with the 3-dimensional porous bladder acellular matrix in a rabbit mode / J.W. Huang, M.K. Xie, Y. Zhang, [et al.] // *Urology*. – 2014. – Vol. 84. – Issue 6. – P. 1499-1505.
110. A preclinical study of cell-seeded tubularized scaffolds specially secreting Il37 for reconstruction of long urethral defects / Y. Li, J. Wu, F. Feng, [et al.] // *Anticancer Research*. – 2017. – Vol. 37. – No 8. – P. 4295-4301.
111. Tubularized urethral replacement using tissue-engineered peritoneum-like tissue in a rabbit mode / G.L. Gu, S.J. Xia, J. Zhang, [et al.] // *Urologia Internationalis*. – 2012. – Vol. 89. – No 3. – P. 358–364.
112. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in a consecutive series / S. Hauser, P.J. Bastian, G. Fechner, [et al.] // *Urology*. – 2006. – Vol. 68. – Issue 6. – P. 263-266.
113. Le Roux, P.J. Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: A pilot study / P.J. Le Roux // *Journal of Urology*. – 2005. – Vol. 173. – P. 140-143.
114. Dorsal onlay augmentation urethroplasty with small intestinal submucosa: Modified Barbagli technique for strictures of the bulbar urethra / I.I. Donkov, A. Bashir,

- C.H.G. Elenkov, [et al.] // *International Journal of Urology*. – 2006. – Vol. 13. – Issue 11. – P. 1415-1417.
115. Outcome of small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures / Y.M. Xu, Q. Fu, Y.L. Sa, [et al.] // *International Journal of Urology*. – 2013. – Vol. 20. – Issue 6. – P. 622-629.
116. The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold / B.M. Sicari, S.A. Johnson, B.F. Siu, [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – Issue 22. – P. 5524-5533.
117. A decellularized porcine xenograft-derived bone scaffold for clinical use as a bone graft substitute: A critical evaluation of processing and structure / D.N. Bracey, T.M. Seyler, A.H. Jinnah, [et al.] // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2018. – Vol. 9. – No 3. – E045.
118. Naito, Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages / Y. Naito, T. Takagi, Y. Higashimura // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – Vol. 564. – P. 83-88.
119. Tissue engineering of the urethra: From bench to bedside / D. Pastorek, M. Culenova, M. Csobonyeiova, [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – E1917.
120. Tissue engineering in reconstructive urology—The current status and critical insights to set future directions-critical review / K. Ławkowska, C. Rosenbaum, P. Petrasz, [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 1-23.
121. Besra, L. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) / L. Besra, M. Liu // *Progress in Materials Science*. – 2007. – Vol. 52. – Issue 1. – P. 1-61.
122. Ammam, M. Electrophoretic deposition under modulated electric fields: A review / M. Ammam // *RSC Advances*. – 2012. – Vol. 20 – No. 1. – P. 7633-7646.
123. Karube, I. Electrochemical aggregation of tropocollagen / I. Karube, S. Suzuki // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1972. – Vol. 48. – P. 320-325.

124. Magnetically Assisted Electrodeposition of Aligned Collagen Coatings / J. Zhuang, S. Lin, L. Dong, [et al.] // ACS: Biomaterials Science & Engineering. – 2018. – Vol. 4. – P. 1528-1535.
125. Nguyen, T.-U. Impact of elastin incorporation into electrochemically aligned collagen fibers on mechanical properties and smooth muscle cell phenotype/ T.-U. Nguyen, C.A. Bashur, V. Kishore // Biomedical Materials. – 2016. – Vol. 11. –No. 2. – E25008.
126. Tenogenic Induction of Human MSCs by Anisotropically Aligned Collagen Biotextiles / M. Younesi, A. Islam, V. Kishore, [et al.] // Advanced Functional Materials. – 2014. – Vol. 24. – Issue 36. – P. 5762-5770.
127. Electrical Signal Initiates Kinetic Assembly of Collagen to Construct Optically Transparent and Geometry Customized Artificial Cornea Substitutes / M. Lei, S. Zhang, H. Zhou, [et al.] // ACS Nano. – 2022. – Vol. 16. – No. 7. – P. 10632-10646.
128. An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles / X. Cheng, U.A. Gurkan, C.J. Dehen, [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – P. 3278-3288.
129. Uquillas, J.A. Effects of phosphate-buffered saline concentration and incubation time on the mechanical and structural properties of electrochemically aligned collagen threads / J.A. Uquillas, V. Kishore, O. Akkus // Biomedical Materials. – 2011. – Vol. 6. – No. 3. – P. 3-8.
130. Hydrogen production by water electrolysis using tetra-alkyl-ammonium- sulfonic acid ionic liquid electrolytes / F. Fiegenbaum, E.M. Martini, M.O. De Souza, [et al.] // Journal of Power Sources. – 2013. – Vol. 243. – P. 822-825.
131. Programmable Electrofabrication of Porous Janus Films with Tunable Janus Balance for Anisotropic Cell Guidance and Tissue Regeneration / M. Lei, X. Qu, H. Liu, [et al.] // Advanced Functional Materials. – 2019. – Vol. 29. – E0065.
132. Dense, bubble-free ceramic deposits from aqueous suspensions by electrophoretic deposition / T. Uchikoshi, K. Ozawa, B.D. Hatton, [et al.] // Journal of Materials Research. – 2001. – Vol. 16. – P. 321-324.

133. Hydrogen peroxide-induced degradation of type I collagen fibers of tilapia skin / X. Liu, Y. Jiang, H. He, [et al.] // *Food Structure*. – 2014. – Vol. 2. – Issues 1-2. – P. 41-48.
134. Valdes, D. Effect of Hydrogen Peroxide on Collagen / D. Valdes, J. Tellez, K. Keenan // *The FASEB Journal*. – 2019. – Vol. 33. – Article number: 7835.
135. Molecular and fibrillar structure collagen analysis by FTIR spectroscopy / Y.A. Nashchekina, A.A. Starostina, N.A. Trusova, [et al.] // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2020. – Vol. 1697. – P. 1-5.
136. Artman, D. Desorption of Hydrogen from Palladium and Palladium-Silver Alloys followed by Differential Scanning Calorimetry / D. Artman, T.B. Flanagan // *Canadian Journal of Chemistry*. – 1972. – Vol.50. – P. 1321-1324.
137. A study of the hydrogen absorption and desorption reactions in palladium electrodes using the potential step method / P. Millet, M. Srour, R. Faure, [et al.] // *Electrochemistry Communications* – 2001. – Vol. 3. – Issue 9. – P. 478-482.
138. Schofield, E.R. Perspective on the Criticality of Palladium in Organic Synthesis / E.R. Schofield // *Johnson Matthey Technology Review*. – 2022. – Vol. 67. – No 3. – P. 285-289.
139. Tabellion, J. Electrophoretic deposition from aqueous suspensions for near-shape manufacturing of advanced ceramics and glasses - applications / J. Tabellion, R. Clasen // *Journal of Materials Science*. – 2004. – Vol. 39. – P. 803-811.
140. Ordnung, M. Fabrication of fibre reinforced green bodies by electrophoretic deposition of silicon powder from aqueous suspensions / M. Ordnung, J. Lehmann, G. Ziegler, [et al.] // *Journal of Materials Science*. – 2004. – Vol. 39. – P. 889-894.
141. Li, W.W. A novel chitosan hydrogel membrane by an improved electrophoretic deposition and its characteristics in vitro and in vivo / W.W. Li, H.Y. Wang, Y.Q. Zhang // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – Vol. 74. – P. 287-297.
142. Wang, H.Y. Processing and characterization of a novel electropolymerized silk fibroin hydrogel membrane / H.Y. Wang, Y.Q. Zhang // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 61-82.

143. Van Vlierberghe, S. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review / S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht // *Biomacromolecules*. – 2011. – Vol. 5. – P. 1387-1408.
144. Patent No: 201917056391 US 2021/0187156 A1 : 187-755-293-988-267 Collagen Biomaterials And Methods For Manufacturing Collagen Biomaterials : N 201917056391 : Filed: May 17, 2019 : Published: Jun 24, 2021 : Earliest Priority: May 18, 2018 / Cameron R.E., Best S.M., Barrett D.J. / , Best Serena Michelle , Barrett David James , Linley Matthew // The LENS URL: <https://www.lens.org/lens/patent/187-755-293-988-267/frontpage> (дата обращения 11.10.2023).
145. Transplantation of Amniotic Scaffold-Seeded Mesenchymal Stem Cells and/or Endothelial Progenitor Cells from Bone Marrow to Efficiently Repair 3-cm Circumferential Urethral Defect in Model Dogs / C. Chen, S. Zheng, X. Zhang, [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2018. – Vol. 24. – No. 1-2. – P. 47-56.
146. Seeding cell approach for tissue-engineered urethral reconstruction in animal study: A systematic review and meta-analysis / D. Xue, J. Gao, Q. Fu, [et al.] // *Experimental Biology and Medicine*. – 2016. Vol. 241. – No. 13. – P. 1416-1428.
147. Ancans, J. Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development / J. Ancans // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 253-268.
148. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia / F. Han, J. Wang, L. Ding, [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1-35.
149. Mironov, V. Review: Bioprinting: A Beginning / V. Mironov, N. Reis, B. Derby // *Tissue Engineering*. – 2006. – Vol. 3. – P. 631-634.
150. Microfluidic Bioprinting: Digitally Tunable Microfluidic Bioprinting of Multilayered Cannular Tissues / Q. Pi, S. Maharjan, X. Yan, X. Liu, [et al.] // *Advanced Materials*. – 2018. – Vol. 30. – Issue 43. – P. 2-26.
151. The application of 3D bioprinting in urological diseases / K. Xu, Y. Han, Y. Huang, [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2022. – Vol. 16. – P. 1-17.

152. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment / K. Zhang, Q. Fu, J. Yoo, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – Vol. 50. – P. 154-164.
153. The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications / S.J. Chae, J. Hong, H. Hwangbo, [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – No. 14. – P. 6818-6832.
154. Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine / S. Jeong Kim, E.M. Kim, M. Yamamoto, [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – Vol. 9. – E2000608.
155. Laschke, M.W. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering / M.W. Laschke, M.D. Menger // *Trends in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 35. – Issue 2. – P. 133-144.
156. 3D-Bioassembly of VH-Spheroids for Cartilage Regeneration: in Vitro Evaluation of Chondrogenesis, Fusion and Lateral Integration / L. Veenendaal, A. Longoni, G.J. Hooper, [et al.] // *Advanced Materials Interfaces*. – 2022. – Vol. 9. – Issue 31. – E2200882.
157. Malda, J. A Step Towards Clinical Translation of Biofabrication / J. Malda, J. Groll // *Trends in Biotechnology*. – 2016. – Vol. 34. – P. 356-357.
158. Aspiration-assisted bioprinting of co-cultured osteogenic spheroids for bone tissue engineering / D.N. Heo, B. Ayan, M. Dey, [et al.] // *Biofabrication*. – Vol. 13. – No. 1. – E015013.
159. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts / M. Heller, E. V. Frerick-Ochs, H.K. Bauer, [et al.] // *Biomaterials*. – 2016 – Vol. 77. – P. 207-215.
160. Culenova, M. Cells Involved in Urethral Tissue Engineering: Systematic Review / M. Culenova, S. Ziaran, L. Danisovic // *Cell Transplantation*. – 2019. – Vol. 28. – P. 43-63.

161. Tissue-engineered buccal mucosa using silk fibroin matrices for urethral reconstruction in a canine model / M. Xie, Y. Xu, L. Song, [et al.] // *Bioengineering/Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 188. – Issue 1. – P. 1-7.
162. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability / S. Boularaoui, G. Al Hussein, K.A. Khan, [et al.] // *Bioprinting*. – 2020. – Vol. 20. – E00093.
163. Aspiration-assisted freeform bioprinting of pre-fabricated tissue spheroids in a yield-stress gel / B. Ayan, N. Celik, Z. Zhang, [et al.] // *Communications Physics*. – 2020. – Vol. 3. – Article number: 183.
164. The acoustic droplet printing of functional tumor microenvironments / K. Chen, E. Jiang, X. Wei, [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2021. – P. 1604-1612.
165. Moldovan, N.I. Principles of the kenzan method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting / N.I. Moldovan, N. Hibino, K. Nakayama // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – Vol. 23. – P. 237-244.
166. Mp19-17 human urethra-engineered with human mesenchymal stem cell with maturation by rearrangement of cells for self-organization - newly developed scaffold-free three-dimensional bio-printer / T. Yamamoto, Y. Funahashi, Y. Mastukawa, [et al.] // *Journal of Urology*. – 2015. – Vol. 193. – Issue 4S. – P. 221-222.
167. Biofabrication of a Functional Tubular Construct from Tissue Spheroids Using Magnetoacoustic Levitational Directed Assembly / V.A. Parfenov, E. V. Koudan, A.A. Krokmal, [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2020. – Vol. 9. – P. 1-10.
168. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroid / T. Anada, J. Fukuda, Y. Sai, [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – E00721.
169. Chang, J. Laser-induced forward transfer-based laser bioprinting in biomedical applications / J. Chang, X. Sun // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 11. – E1255782.
170. Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting / M. Gruene, C. Unger, L. Koch, [et al.] // *BioMedical Engineering*. – 2011. – Vol. 10. – Article number: 19.

171. Micropatterning of endothelial cells to create a capillary-like network with defined architecture by laser-assisted bioprinting / O. K  rour  dan, J.M. Bourget, M. R  my, [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2019. – Vol. 30. – P. 1-12.
172. DNA deposition through laser induced forward transfer / M. Colina, P. Serra, J.M. Fernández-Pradas, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – Vol. 20. – Issue 8. – P. 1638-1642.
173. Laser printing of skin cells and human stem cells / L. Koch, S. Kuhn, H. Sorg, [et al.] // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2010. – Vol. 16. – No. 5. – P. 847–854.
174. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks / A. Sorkio, L. Koch, L. Koivusalo, [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 171. – P. 57–71.
175. Self-assembled human osseous cell sheets as living biopapers for the laser-assisted bioprinting of human endothelial cells / F. Kawecki, W.P. Clafshenkel, F.A. Auger, [et al.] // *Biofabrication*. – 2018. – Vol. 10. – E035006.
176. Alginate gelation-induced cell death during laser-assisted cell printing / H. Gudapati, J. Yan, Y. Huang, [et al.] // *Biofabrication*. – 2014. – Vol. 6. – E035022.
177. Liu, D. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development / D. Liu, S. Chen, M.W. Naing // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2021. – Vol. 118. – Issue 2. – P. 542-554.
178. The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology / E.V. Koudan, J.V. Korneva, P.A. Karalkin, [et al.] // *3D Printing and Additive Manufacturing*. – 2017. – Vol. 4. – No. 1. – P. 53-60.
179. Патент N 2744301 Российская Федерация, МПК С12N 1/00 (2006.01), СПК С12N 5/00 (2021.01). Способ получения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из пупочного канатика новорожденного : N 2020124246 : заявл. 21.07.2020 : опубл. 05.03.2021 / Свистунов А.А., Бутнару Д.В., Тимашев П.С., Кошелева Н.В., Бикмулина П.Ю., Пешкова М.В., Шпичка А.И. // *Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной*

собственности (Роспатент) «Изобретения. Полезные модели». – No. 7–2021, 28.02.2021-10.03.2021. ч. 3 з.п. ф-лы, 1 ил., 2 табл., 2 пр. URL: https://www.fips.ru/ofpstorage/BULLETIN/IZPM/2021/03/10/INDEX_RU.HTM (дата обращения 11.10.2023).

180. Laser-induced Forward Transfer Hydrogel Printing: A Defined Route for Highly Controlled Process / V. Yusupov, S. Churbanov, E. Churbanova, K. Bardakova, A. Antoshin, S. Evlashin, P. Timashev, N. Minaev // *International Journal of Bioprinting*. – 2020. – Vol. 6. – Issue 3. – Article number: 271.

181. Установка для исследования лазерно-индуцированного переноса гелевых микрокапель с живыми клеточными и микробными объектами / Н.В. Минаев, В.И. Юсупов, Е.С. Чурбанова, С. Н. Чурбанов, В.И. Жигарьков, А.А. Антошин // *Приборы и техника эксперимента*. – 2019. – № 1. – С. 153-155.

182. Laser printing of microbial systems: effect of absorbing metal film / V.S. Cheptsov, E.S. Churbanova, V.I. Yusupov, [et al.] // *Letters in Applied Microbiology*. – 2018. – Vol. 67. – Issue 6. – P. 544-549.

183. Building a tissue: Mesenchymal and epithelial cell spheroids mechanical properties at micro- and nanoscale / N. V Kosheleva, Y.M. Efremov, P.I. Koteneva, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – Vol. 165. – P. 140-152.

184. Nečas, D. Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis / D. Nečas, P. Klapetek // *Central European Journal of Physics*. – 2012. – Vol. 10. – P. 181-188.

185. Fabrication and handling of 3D scaffolds based on polymers and decellularized tissues / A. Shpichka, A. Koroleva, D. Kuznetsova, [et al.] // *Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models* / ed. by R.I. Dmitriev. – Cham: Springer International Publishing: Imprint: Springer, 2017. – P. 71-81.

186. Collagen: Animal sources and biomedical application / K.S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A.R. Bhat, [et al.] // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2015. – Vol. 5. – No. 03. – P. 123-127.

187. Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization / Í.B.D.S. Araújo, T.K.A. Bezerra, E.S. Do Nascimento, [et al.] // *Food Science and Technology*. – 2018. – Vol. 38. – No 1. – P. 167-173.

188. Ramesh Kumar, M. Correlating mechanical properties with aggregation processes in electrochemically fabricated collagen membranes / M. Ramesh Kumar, E.F. Merschrod S., K.M. Poduska // *Biomacromolecules*. – 2009. – Vol. 10. – P. 1970-1975.
189. An overview of the use of equine collagen as emerging material for biomedical applications / N. Gallo, M.L. Natali, A. Sannino, [et al.] // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2020. – Vol. 11. – No 4. – Article number: 79.
190. An insight on type I collagen from horse tendon for the manufacture of implantable devices / L. Salvatore, N. Gallo, D. Aiello, [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 154. – P. 291-306.
191. Cassel, J.M. Studies on the purification of collagen / J.M. Cassel, J.R. Kanagy // *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. – 1949. – Vol. 42. – P. 557-565.
192. Campos Vidal, B.De. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy / B.De Campos Vidal, M.L.S. Mello // *Micron*. – 2011. – Vol. 42. – Issue 3. – P. 283-289.
193. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications / M.H. Santos, R.M. Silva, V.C. Dumont, [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2013. – Vol. 33. – Issue 2. – P. 790-800.
194. Effects of ultrasound and thermal treatment on the ultrastructure of collagen fibers from bovine tendon using atomic force microscopy / Y. Wan, Y. Gao, J. Shao, [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 347. – E128985.
195. Zeugolis, D.I. Factors influencing the properties of reconstituted collagen fibers prior to self-assembly: Animal species and collagen extraction method / D.I. Zeugolis, R.G. Paul, G. Attenburrow // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2008. – Vol. 86. – P. 892-904.
196. Maache-Rezzoug, Z. Development of a new drying process - Dehydration by Cyclical Pressure Drops (D.D.S.): Application to the collagen gel / Z. Maache-Rezzoug, S.A. Rezzoug, K. Allaf // *Drying Technology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 109-129.
197. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – Vol. 32. – P. 3233-3243.

198. Influence of pH and ionic strength on transmission of plasmid DNA through ultrafiltration membranes / E. Arkhangelsky, B. Steubing, E. Ben-Dov, [et al.] // *Desalination*. – 2008. – Vol. 227. – P. 111–119.
199. DNA compaction and charge neutralization regulated by divalent ions in very low pH solution / T. Gao, W. Zhang, Y. Wang, [et al.] // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11. – No 2. Article number: 337.
200. Collagen-based substrates with tunable strength for soft tissue engineering / V.A. Kumar, J.M. Caves, C.A. Haller, [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2013. – Vol. 1. – P. 1193-1202.
201. Collagen I membranes for tendon repair: Effect of collagen fiber orientation on cell behavior / A. Gigante, E. Cesari, A. Busilacchi, [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2009. – Vol. 27. – P. 826-832.
202. Hadi, M.F. Microscale fiber network alignment affects macroscale failure behavior in simulated collagen tissue analogs / M.F. Hadi, V.H. Barocas // *Journal of Biomechanical Engineering*. – 2013. – Vol. 135. – Issue 2. – P. 21-26.
203. Microstructural and mechanical differences between digested collagen-fibrin co-gels and pure collagen and fibrin gels / V.K. Lai, C.R. Frey, A.M. Kerandi, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – Vol. 8. – Issue 11. – P. 4031-4042.
204. Uquillas, J.A. Modeling the electromobility of type-i collagen molecules in the electrochemical fabrication of dense and aligned tissue constructs / J.A. Uquillas, O. Akkus // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2012. – Vol. 40. – P. 1641–1653.
205. Chemical cross-linking of xenopericardial biomeshes: A bottom-up study of structural and functional correlations / E.A. Grebenik, L.P. Istranov, E. V. Istranova, [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2019. – Vol. 26. – E12506.
206. Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films / J.M.F. Pavoni, N.Z. dos Santos, I.C. May, [et al.] // *Polymer Bulletin*. – Vol. 78. – P. 981-1000.
207. The Role of Substrate Topography and Stiffness on MSC Cells Functions: Key Material Properties for Biomimetic Bone Tissue Engineering / F.K. Kozaniti, D.D.

Deligianni, M.D. Georgiou, [et al.] // *Biomimetics*. – 2022. – Vol. 7. – No 1. – Article number: 7.

208. Pek, Y.S. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel / Y.S. Pek, A.C.A. Wan, J.Y. Ying // *Biomaterials*. - 2010. – Vol. 31. – Issue 2. – P. 385-391.

209. Substrate stiffness controls osteoblastic and chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells without exogenous stimuli / R.O. Navarrete, E.M. Lee, K. Smith, [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – E0170312.

210. The influence of substrate stiffness gradients on primary human dermal fibroblasts / I. Hopp, A. Michelmore, L.E. Smith, [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – P. 5070-5077.

211. Building a microfluidic cell culture platform with stiffness control using Loctite 3525 glue / G. Vázquez-Victorio, C. Peto-Gutiérrez, B. Díaz-Bello, [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2019. – Vol. 19. – P. 3512-3525.

212. Extruded collagen fibres for tissue engineering applications: Effect of crosslinking method on mechanical and biological properties / D. Enea, F. Henson, S. Kew, [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2011. – Vol. 22. – P. 1569–1578.

213. Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films / C.N. Grover, J.H. Gwynne, N. Pugh, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – Vol. 8. – Issue 8. – P. 3080-3090.

214. Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers / M. Nair, R.K. Johal, S.W. Hamaia, [et al.] // *Biomaterials*. – 2020. – Vol. 254. – E120109.

215. Patent 094-989-331-971-58X, US: 2003/0133967 A1, Application No: 23162902 : Multilayer collagen matrix for tissue reconstruction : Filed: Aug 30, 2002 Published: Jul 17, 2003 Earliest Priority: Mar 9, 2000 : / R. Zbigniew, M. Robert, J. Johann // LENS: Explore global science and technology knowledge. URL: <https://www.lens.org/lens/patent/094-989-331-971-58X/citations?view=publications> (дата обращения 11.10.2023)

216. To Cross-Link or Not to Cross-Link? Cross-Linking Associated Foreign Body Response of Collagen-Based Devices / L.M. Delgado, Y. Bayon, A. Pandit, [et al.] // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2015. – Vol. 21. – No. 3. – P. 298-313.
217. In vivo implantation of a bovine-derived collagen membrane leads to changes in the physiological cellular pattern of wound healing by the induction of multinucleated giant cells: An adverse reaction? / S. Al-Maawi, C. Vorakulpipat, A. Orłowska, [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 6. – E 00104.
218. Porcine dermis-derived collagen membranes induce implantation bed vascularization via multinucleated giant cells: A physiological reaction? / M. Barbeck, J. Lorenz, A. Kubesch, [et al.] // *Journal of Oral Implantology*. – 2015. – Vol. 41. – No 6. – P. 238-251.
219. A defined road to tracheal reconstruction: laser structuring and cell support for rapid clinic translation / A. Fayzullin, G. Vladimirov, A. Kuryanova, [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2022. – Vol. 13. – Article number: 317.
220. Chowdhury, S.R. Urinary bladder and urethral tissue engineering, and 3D bioprinting approaches for urological reconstruction / S.R. Chowdhury, N. Keshavan, B. Basu // *Journal of Materials Research*. – 2021. – Vol. 36. – P. 3781-3820.
221. Porcine dermis and pericardium-based, non-cross-linked materials induce multinucleated giant cells after their in vivo implantation: A physiological reaction? / M. Barbeck, J. Lorenz, M.G. Holthaus, [et al.] // *Journal of Oral Implantology*. – 2015. – Vol. 12. – P. 267-281.
222. Vaddi, S.P. Buccal epithelium Expanded and Encapsulated in Scaffold-Hybrid Approach to Urethral Stricture (BEES-HAUS) procedure: A novel cell therapy-based pilot study / S.P. Vaddi, V.B. Reddy, S.J. Abraham // *International Journal of Urology*. – 2019. – Vol. 26. – P. 253-257.
223. Application of Wnt pathway inhibitor delivering scaffold for inhibiting fibrosis in urethra strictures: In vitro and in vivo study / K. Zhang, X. Guo, W. Zhao, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – P. 27659–27676.

224. An extracellular matrix-mimicking, bilayered, heterogeneous, porous, nanofibrous scaffold for anterior urethroplasty in a rabbit model / X. Wan, D. Zheng, H. Yao, [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2020. – Vol. 15. – No 6. – E065008.
225. Urethral tissue regeneration using collagen scaffold modified with collagen binding VEGF in a beagle model / W. Jia, H. Tang, J. Wu, [et al.] // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 69. – P. 45-55.
226. Yu, T. The role of macrophages in the foreign body response to implanted biomaterials / T. Yu, V.J. Tutwiler, K. Spiller // *Biomaterials in Regenerative Medicine and the Immune System* / ed. by L. Santambrogio. – Cham: Springer International Publishing: Imprint: Springer, 2015. – P. 17-34.
227. Evaluation of Selected Properties of Sodium Alginate-Based Hydrogel Material—Mechanical Strength, μ DIC / J. Kurowiak, A. Mackiewicz, T. Klekiel, [et al.] // *Materials*. – 2022. – Vol. 15. – No 3. – Article number: 1225.
228. Haag, H. The Synergy of Biomimetic Design Strategies for Tissue Constructs / H. Haag, P.D. Dalton, V. Bloemen // *Advanced Functional Materials*. – 2022. – Vol. 32. – Issue 32. – Article number: 2201414.
229. The effect of surface chemistry on the formation of thin films of native fibrillar collagen / J.T. Elliott, J.T. Woodward, A. Umarji, [et al.] // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – P. 576-585.
230. Characterization of an insoluble collagen sponge and the potential for tissue engineering scaffold / L. Zhang, Y. Zhang, B. Jiang, [et al.] // *Materials Science Forum*. – 2009. – Vol. 610–613. – P. 1378-1381.
231. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen / D. Li, C. Mu, S. Cai, [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2009. – Vol. 16. – Issue 5. – P. 605-609.
232. Lin, Y.K. Studies of novel hyaluronic acid-collagen sponge materials composed of two different species of type I collagen / Y.K. Lin, D.C. Liu // *Journal of Biomaterials Applications*. – 2007. – Vol. 21. – Issue 3. – P. 265-281.
233. Chen, G. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges / G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2000. – Vol. 51. – P. 273–279.

234. The formation mechanism of the β -TCP phase in synthetic fluorohydroxyapatite with different fluorine contents / H. Zhao, F. Wang, X. Chen, [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2010. – Vol. 5. – No 4. – E045011.
235. Preparation and in Vitro Evaluation of Electrochemically-Aligned Collagen Matrix as a Dermal Substitute / X. Cheng, N. Edwards, K. Leung, [et al.] // *MRS Advances*. – 2016. – Vol. 1. – P. 1295-1300.
236. Semipermeable barrier-assisted electrophoretic deposition of robust collagen membranes / A. Antoshin, O. Dubinin, L. Miao, [et al.] // *Journal of Materials Science*. – 2023. – Vol. 58. – P. 9675-9697.
237. Comparison of Poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) and Poly (trimethylene carbonate) Membranes for Urethral Regeneration: An in Vitro and in Vivo Study / R. Sartoneva, P.H. Nordback, S. Haimi, [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2018. – Vol. 24. – No. 1-2. – P. 117-127.
238. Collagen scaffolds tethered with bFGF promote corpus spongiosum regeneration in a beagle model / H. Tang, W. Jia, X. Hou, [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2018. – Vol. 13. – No 3. – E031001.
239. Tissue-engineered PLLA/gelatine nanofibrous scaffold promoting the phenotypic expression of epithelial and smooth muscle cells for urethral reconstruction / G. Liu, M. Fu, F. Li, [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – Vol. 111. – E110810.
240. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells / T. Zhou, Z. Yuan, J. Weng, [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – Article number: 24.
241. Human fibroblast-macrophage tissue spheroids demonstrate ratio-dependent fibrotic activity for: In vitro fibrogenesis model development / Y. Tan, A. Suarez, M. Garza, [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2020. – Vol.8. – P. 1951-1960.
242. Oxygen consumption rate of tumour spheroids during necrotic-like core formation / R. Mukomoto, Y. Nashimoto, T. Terai [et al.] // *Analyst*. – 2020. – Vol. 145. – P. 6342-6348.

243. Time-Resolved Imaging Study of Jetting Dynamics during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions / Z. Zhang, R. Xiong, R. Mei, [et al.] // *Langmuir*. – 2015. – Vol. 31. – P. 6447–6456.
244. Study of Impingement Types and Printing Quality during Laser Printing of Viscoelastic Alginate Solutions / Z. Zhang, R. Xiong, D.T. Corr, [et al.] // *Langmuir*. – 2016. – Vol. 32. – P. 3004-3014.
245. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting / S. Catros, B. Guillotin, M. Bačáková, [et al.] // *Applied Surface Science*. – 2011. – Vol. 257. – Issue 12. – P. 5142-5147.
246. Freeform drop-on-demand laser printing of 3D alginate and cellular construct / R. Xiong, Z. Zhang, W. Chai, [et al.] // *Biofabrication*. – 2015. – Vol. 7. – Article number: 45011.
247. Laser assisted bioprinting using a femtosecond laser with and without a gold transductive layer: a parametric study / H. Desrus, B. Chassagne, S. Catros, [et al.] // *Optical Interactions with Tissue and Cells*. – 2016. – Vol. XXVI. – Article number: 97060.
248. Theoretical and Experimental Assay of Shock Experienced by Yeast Cells during Laser Bioprinting / E. V. Grosfeld, V.S. Zhigarkov, A.I. Alexandrov, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Issue 17. – Article number: 9823.
249. Evolution of shock-induced pressure in laser bioprinting / E. Mareev, N. Minaev, V. Zhigarkov, V. Yusupov [et al.] // *Photonics*. – 2021. – Vol. 8. – Issue 9. – Article number: 374.
250. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells using the Regenova printer: Spheroid characterization and osteogenic differentiation / I.N. Aguilar, D.J. Olivos, A. Brinker, [et al.] // *Bioprinting*. – 2019. – Vol. 15. – E00050.
251. Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting / R. Xiong, Z. Zhang, W. Chai, [et al.] // *Biofabrication*. – 2017. – Vol. 9. – E024103.

252. High speed photography of laser induced forward transfer (LIFT) of single and double-layered transfer layers for single cell transfer / D. Riester, J. Budde, C. Gach, [et al.] // *Journal of Laser Micro/Nanoengineering*. – 2016. – Vol. 11. – No. 2. – P. 199-203.
253. Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment / P. Zhuang, Y.H. Chiang, M.S. Fernanda, [et al.] // *International Journal of Bioprinting*. – 2021. – Vol. 7. – No 4. – Article number: 444.
254. Engineering bioprintable alginate/gelatin composite hydrogels with tunable mechanical and cell adhesive properties to modulate tumor spheroid growth kinetics / T. Jiang, J.G. Munguia-Lopez, K. Gu, [et al.] // *Biofabrication*. – 2020. – Vol. 12. – Issue 1. – Article number: 015024.
255. Scalable fabrication of renal spheroids and nephron-like tubules by bioprinting and controlled self-assembly of epithelial cells / K. Tröndle, L. Rizzo, R. Pichler, [et al.] // *Biofabrication*. – 2021. – Vol. 13. – Issue 3. – Article number: 035019.
256. 3D or not 3D: a guide to assess cell viability in 3D cell systems / P. Bikmulina., N. Kosheleva, Y. Efremov, A. Antoshin, Z. Heydari, V. Kapustina, V. Royuk, V. Mikhaylov, V. Fomin, M. Vosough, P. Timashev, Y. Rochev, A. Shpichka // *Soft Matter*. Royal Society of Chemistry. - 2022. - Vol. 18 - Issue 11. - P. 2222–2233.
257. Integrin $\alpha 1\beta 1$ mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo / A. Pozzi, K.K. Wary, F.G. Giancotti, [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 1998. – Vol. 142. – Issue 2. – P. 587-594.
258. Collagen I promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by regulating integrin $\beta 1$ /FAK signaling pathway in nonalcoholic fatty liver / X. Zheng, W. Liu, J. Xiang, [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 95586-95595.
259. Bioprinting of Stem Cells: Interplay of Bioprinting Process, Bioinks, and Stem Cell Properties / S. Ding, L. Feng, J. Wu, [et al.] // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2018. – Vol. 4. – No 9. – P. 3108-3124.
260. A virtual scalpel system for computer-assisted laser microsurgery / L. S. Mattos, G. Dagnino, G. Becattini, [et al.] // *International Conference on Intelligent Robots and Systems*. – San Francisco, CA, USA: IEEE/RSJ, 2011. – P. 1359-1365.