

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

Васютин Игорь Алексеевич

**Изучение гистогенетической принадлежности клеток, выделенных из мочи, и
перспективы их применения в тканевой инженерии**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Люндуп Алексей Валерьевич

Научный консультант:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Кузнецов Сергей Львович

Москва, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	6
Актуальность темы	6
Цель исследования	9
Задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость	11
Методология и методы исследования.....	11
Положения, выносимые на защиту	12
Степень достоверности и апробация результатов	13
Объем и структура диссертации.....	13
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	13
Внедрение результатов диссертационного исследования в практику	14
Личный вклад	14
ГЛАВА 1 Обзор литературы	15
1.1 Анатомия и гистология мочеиспускательного канала	15
1.1.1 Псевдомногослойный цилиндрический эпителий уретры и многослойный кубический переходный эпителий мочевого пузыря.....	16
1.1.2 Микроструктура переходного эпителия	17
1.2 Стриктурная болезнь мочеиспускательного канала	19
1.2.1 Трансплантаты для заместительной уретропластики.....	21
1.3 Тканевая инженерия мочеиспускательного канала	22
1.4 Источники клеток для ТИК графта для заместительной уретропластики мочеиспускательного канала	24
1.4.1 Мочевой пузырь и слизистая ротовой полости.....	24

1.4.2	Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	26
1.4.3	Мезенхимальные стромальные клетки	27
1.4.4	Стволовые клетки из амниотической жидкости	28
1.5	Обзор биоматериалов, используемых в ТИК для заместительной уретропластики.....	29
1.5.1	Децеллюляризированные ткани.....	31
1.5.2	Натуральные полимеры	32
1.5.3	Синтетические полимеры.....	33
1.6	Обзор некоторых доклинических исследований ТИК в заместительной уретропластике мочеиспускательного канала	35
1.7	Стволовые клетки в моче.....	43
1.7.1	Характеристика стволовых клеток в моче.....	43
1.7.2	Стволовые клетки из мочи в тканевой инженерии мочеиспускательного канала	44
1.7.3	Происхождение стволовых клеток в моче.....	45
1.8	Стволовые клетки в почках	46
1.8.1	Дифферон CD133+CD24+ клеток париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана.....	47
1.8.2	Прогениторные клетки канальцев почки.....	48
1.8.3	Стволовые клетки капсулы Шумлянско-Боумана в моче	50
ГЛАВА 2	Материалы и методы.....	52
2.1	Выделение и культивирование стволовых клеток из мочи.....	52
2.2	Характеристика СКМ.....	55
2.2.1	Определение свойств культуры СКМ	55
2.2.2	Оценка экспрессии поверхностных маркеров СКМ.....	56

2.3	Выделение клеток уротелия и ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря.....	56
2.3.1	Выделение клеток уротелия из биопсийного материала мочевого пузыря.....	57
2.3.2	Выделение ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря.....	60
2.4	Иммуноцитохимическое окрашивание клеток уротелия и ГМК	61
2.5	Дифференцировка СКМ в ГМК	61
2.5.1	Изготовление среды для дифференцировки СКМ в ГМК	61
2.5.2	Протокол дифференцировки СКМ в ГМК.....	62
2.5.3	Изготовление среды для дифференцировки СКМ в клетки уротелия..	62
2.5.4	Протокол дифференцировки СКМ в клетки уротелия	62
2.5.5	Оценка результатов дифференцировки СКМ в ГМК и клетки уротелия с помощью иммуноцитохимического окрашивания	63
2.6	Оценка уровня экспрессии маркеров дифференцировки с помощью компьютерного анализа изображений флюоресцентной микроскопии	63
2.7	Оценка жизнеспособности СКМ в составе ТИК.....	65
2.7.1	Заселение скаффолда на основе коллагена СКМ человека	65
2.7.2	Оценка жизнеспособности СКМ в составе ТИК.....	66
2.7.3	Оценка жизнеспособности СКМ в составе тканеинженерной конструкции с помощью Live/Dead системы.....	66
ГЛАВА 3	Результаты	67
3.1	Выделение и культивирование СКМ.....	67
3.2	Проточная цитометрия и иммуноцитохимическое окрашивание для первичной оценки фенотипа СКМ	69
3.3	Определение гистогенетической принадлежности СКМ по профилю экспрессии поверхностных маркеров	74

3.4	Фенотип ГМК и клеток уротелия мочевого пузыря в культуре	83
3.5	Оценка дифференцировки СКМ в ГМК.....	85
3.6	Оценка дифференцировки СКМ в клетки уротелия	91
3.7	Оценка пролиферативной активности и жизнеспособности СКМ на биоматериале ССС	96
	Заключение	100
	Выводы	101
	Список сокращений	102
	Список литературы	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Стриктурой уретры является сужение мочеиспускательного канала вследствие ишемического спонгиоза. Это заболевание представляет собой значимую медицинскую проблему, так, его распространенность в развитых странах может достигать 6 случаев на 1000 лиц мужского пола. Выбор хирургического лечения зависит от протяженности и локализации стриктуры, выраженности спонгиоза, предшествующего лечения и других факторов. При хирургическом лечении чаще всего используется анастомотическая или, в случае протяженных стриктур, заместительная уретропластика. При заместительной уретропластике в качестве источника лоскутов и трансплантатов выступают различные ткани пациента — генитальная или экстрагенитальная кожа, влагалищная оболочка яичка, слизистая щеки. Несмотря на то, что уретропластика с использованием аутологичных тканей пациента продемонстрировала достаточно высокую эффективность, существуют по крайней мере две проблемы, которые диктуют поиск альтернативных источников трансплантатов, а именно морбидность в донорской зоне и дефицит тканей при протяженных и рецидивных стриктурах мочеиспускательного канала.

Тканевая инженерия — это направление регенеративной медицины, основной целью которого является создание биоэквивалентов органов и тканей для клинического применения с использованием клеток, материалов и сигнальных молекул. За 30 лет существования инновационного направления был достигнут значительный прогресс в разработке различных подходов создания биоэквивалентов органов, а также проведен ряд клинических исследований продуктов, изготовленных с использованием технологий тканевой инженерии. Тканеинженерная конструкция принципиально представляет из себя биосовместимый материал необходимой формы, называемый скаффолдом, с засеянными на него живыми клетками. Скаффолд несет структурную функцию

конструкции, определяет ее форму, обеспечивает механические свойства, а также представляет субстрат для прикрепления, пролиферации и нормальной жизнедеятельности клеток. В качестве клеток, как правило, используются прогениторные или дифференцированные клетки того органа, для пластики которого планируется использовать тканеинженерную конструкцию. Для того, чтобы исключить иммунный ответ на компоненты конструкции, скаффолд должен быть изготовлен из инертного для иммунной системы материала, а источником клеток должен быть сам пациент, для которого изготавливается конструкция. Для получения клеток, как правило, используется биопсия небольшого участка здоровой ткани пациента, из которой затем с помощью методов клеточной биологии получают культуры клеток. Дальнейшее культивирование клеток в лабораторных условиях производят для получения достаточного количества клеток для заселения скаффолда.

В случае поражения значительного участка уретры восполнить нехватку ткани для заместительной уретропластики можно при помощи методов тканевой инженерии путем создания трансплантата необходимого размера. В тканеинженерном трансплантате необходимо использование эпителиальных клеток для восстановления непроницаемого барьера между просветом мочеиспускательного канала и нижележащими тканями. Дополнительно могут быть использованы фибробласты или гладкомышечные клетки (ГМК) для восстановления подслизистой основы и мышечного слоя, подавления фиброобразования конструкции и поддержания клеточного гомеостаза уретрального эпителия. Слизистая мочеиспускательного канала выстлана уретральным многорядным эпителием, который по своему эмбриональному происхождению и свойствам схож с переходным эпителием мочевого пузыря. За эпителием мочевого пузыря и мочеиспускательного канала следует собственная пластинка, нечетко отделенная от подслизистой основы, за которой следует мышечная оболочка, состоящая из множества пучков ГМК. Поэтому наиболее подходящим источником клеток для тканеинженерного трансплантата для уретропластики является мочевого пузырь, так как гистологическое строение стенки мочевого пузыря во многом

схоже с гистологическим строением мочеиспускательного канала. Однако биопсия мочевого пузыря представляет собой некомфортное для пациента оперативное вмешательство, требующее общей анестезии, и потенциально сопряженно с осложнениями, поэтому наличие более доступного источника клеток для тканевой инженерии трансплантата для уретропластики значительно упростит процесс создания конструкции.

Одним из альтернативных подходов для получения клеток для тканевой инженерии является дифференцировка аутологичных стволовых клеток. Так, целью ряда исследований было получение клеток для тканевой инженерии органов нижних мочевых путей, переходного эпителия и ГМК, через дифференцировку постнатальных стволовых клеток. Между тем постнатальные стволовые клетки имеют ограниченный дифференцировочный потенциал. К примеру, для мезенхимальных стромальных клеток (МСК) была показана возможность дифференцировки в клетки органов мезенхимального происхождения — клетки костной, хрящевой, жировой ткани, ГМК, в то время как попытки дифференцировки МСК в клетки переходного эпителия не показали удовлетворительных результатов. Поэтому данный тип стволовых клеток, получивший широкое распространение в регенеративной медицине, для тканевой инженерии мочеиспускательного канала может быть использован только как источник ГМК.

Недавние исследования показали, что нормальная моча здоровых взрослых людей содержит небольшую популяцию «рисоподобных» клеток с высоким пролиферативным потенциалом, названных стволовыми клетками, выделенными из мочи (СКМ). СКМ коэкспрессируют как маркеры МСК, так и прогениторных эпителиальных клеток, имеют время удвоения популяции 20–30 ч и могут быть культивированы на протяжении 20 пассажей. СКМ имеют широкий дифференцировочный потенциал, а в контексте тканевой инженерии нижних мочевых путей эти клетки могут быть дифференцированы в клетки переходного эпителия и ГМК. Культивирование СКМ в среде с высокой концентрацией эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) на протяжении 14

дней индуцирует экспрессию уроплакинов и цитокератинов. Дополнительным подтверждением дифференцировки в клетки переходного эпителия служит положительный функциональный тест на способность полученных клеток образовывать барьер. Дифференцировка СКМ в ГМК проводится культивированием клеток в среде с тромбоцитарным фактором роста (platelet-derived growth factor, PDGF) и трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- $\beta 1$) на протяжении 14 дней. Полученные клетки экспрессируют специфические маркеры ГМК и становятся способными к сокращению.

В силу того, что СКМ могут быть неинвазивно получены для любого взрослого человека, могут содержаться в культуре, имеют малое время удвоения популяции, а также, по данным литературы, имеют потенциал к дифференцировке в клетки переходного эпителия и ГМК, данный тип клеток послужил предметом данного диссертационного исследования. Для оценки перспектив применения СКМ в регенеративной медицине необходимо уточнить характеристики культуры СКМ, их гистологическую принадлежность, а также степень дифференцировки в клетки переходного эпителия и ГМК.

Цель исследования

Охарактеризовать стволовые клетки, выделенные из мочи, с точки зрения их гистогенетической принадлежности и оценить возможность их применения в тканевой инженерии органов нижних мочевых путей.

Задачи исследования

1. Отработать метод получения стволовых клеток из мочи, определить их иммунофенотипический профиль и особенности роста в культуре.
2. Оценить гистогенетическую принадлежность стволовых клеток, выделенных из мочи, по профилю экспрессии поверхностных маркеров.

3. Выделить первичные культуры клеток переходного эпителия и гладкомышечных клеток мочевого пузыря и охарактеризовать данные культуры по профилю экспрессии внутриклеточных маркеров.
4. Разработать и оптимизировать способ дифференцировки стволовых клеток, выделенных из мочи, в эпителиальные клетки нижних мочевых путей и гладкомышечные клетки. Сравнить профили экспрессии маркеров дифференцировки между первичными культурами клеток переходного эпителия и гладкомышечных клеток и культурами стволовых клеток, выделенных из мочи, после дифференцировки.
5. Произвести оценку пролиферации стволовых клеток, выделенных из мочи, на скаффолде на основе коллагена первого типа.

Научная новизна

В настоящей работе впервые проведена характеристика СКМ с точки зрения их гистологической принадлежности. Показано, что СКМ являются эпителиальными по своей природе. Использование поверхностных маркеров, описанных для камбиальных элементов нефрона, показало практически идентичные профили экспрессии данных маркеров у клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев и у СКМ. Кроме того, по результатам данного исследования впервые описана фенотипическая гетерогенность СКМ.

Также в данной работе получены данные о возможности СКМ дифференцироваться в клетки переходного эпителия и ГМК. Для анализа дифференцировки культур клеток было проведено иммуноцитохимическое окрашивание на наличие экспрессии характеризующих маркеров до и после дифференцировки с последующим компьютерным анализом изображений флуоресцентной микроскопии. Компьютерный анализ изображений позволил получить точные количественные данные внутриклеточного содержания маркеров клеток переходного эпителия и ГМК. Исходя из полученных данных не было

найденно признаков дифференцировки СКМ в клетки переходного эпителия под воздействием высоких концентраций EGF, что ставит под сомнение существовавшие ранее представления о потентности СКМ.

Показана возможность длительного выживанию и пролиферации СКМ на скаффолде для тканевой инженерии.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данной работы позволяют предположить источник СКМ в организме, а также описывают гистогенетическую принадлежность и фенотипическую гетерогенность СКМ. Полученные данные могут послужить фундаментом для дальнейших исследований СКМ как объекта клеточных технологий, а также проливают свет на некоторые вопросы, касающиеся биологии и функции стволовых клеток мочевыделительной системы.

Отсутствие признаков дифференцировки СКМ в клетки переходного эпителия под воздействием высокой концентрации EGF диктует необходимость пересмотреть данный подход при дальнейших исследованиях СКМ как источника клеток переходного эпителия в тканевой инженерии нижних мочевыводящих путей. Между тем данные о гистогенетическом происхождении СКМ и их способность к пролиферации на скаффолде на протяжении длительного времени говорят о перспективности данного типа клеток в тканевой инженерии.

Методология и методы исследования

В работу вошли данные, полученные на культурах клеток, выделенных из мочи шести здоровых добровольцев обоего пола. Было получено 24 образца мочи, из которых были выделены единичные клетки, давшие рост клеточным культурам своих клонов. В общей сложности в работе представлены результаты для 20 культур клонов клеток, выделенных из мочи. В работе были использованы иммуноцитологические методы исследования. Для характеристики получаемых в работе культур с помощью проточной цитометрии были использованы маркеры,

характерные для стволовых клеток, выделенных из мочи: CD73, CD34, CD29, CD90, CD45, CD44, CD105, CD54, SSEA4, а также маркеры, характерные для камбиальных элементов нефрона: CD24, CD133, CD106, PDX. Для оценки дифференцировки СКМ в ГМК и клетки переходного эпителия с помощью флюоресцентной микроскопии в работе были использованы маркеры гладкомышечных клеток (α SMA, кальпонин и десмин) и маркеры клеток переходного эпителия (СК AE1/AE3, CK7 и CK13). Для характеристики пролиферации клеток на матриксе была использована конфокальная микроскопия и анализ Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Работа была выполнена частично в лаборатории передовых клеточных технологий ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и частично в институте регенеративной медицины Уэйк Форест, Уинстон-Салем, США.

Исследование одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол заседания № 30-20 от 21.10.2020.

Положения, выносимые на защиту

1. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, представляют из себя гетерогенную клеточную популяцию, имеют эпителиальную природу и являются прогениторными клетками капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев почки.
2. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, способны к дифференцировке в гладкомышечные клетки *in vitro* под воздействием тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста β 1 на протяжении 10 дней.
3. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, не способны к дифференцировке в клетки переходного эпителия *in vitro* под воздействием высокой концентрации эпидермального фактора роста на протяжении 10 дней.

4. Стволовые клетки, выделяемые из мочи, способны к длительному выживанию и пролиферации на скаффолде на основе коллагена для тканевой инженерии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, адекватных для поставленных задач методов исследования и статистических методов обработки данных.

По теме диссертации опубликовано 5 статей в отечественных журналах из списка ВАК Минобрнауки РФ, а также в специализированных зарубежных журналах «Urologia», «Anticancer Research» и «Biomedical Materials».

Результаты данного исследования были представлены и обсуждены на российской конференции с международным участием 2nd National Congress on Regenerative Medicine (Москва, Россия, 2015).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов, главы «Результаты», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 141 отечественный и зарубежный источник. Полученные данные сведены в 14 таблиц и проиллюстрированы 21 рисунком.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, а именно областям исследований: изучение закономерностей цито- и гистогенеза, строения

и функции клеток и тканей; изучение закономерностей дифференцировки клеток и тканей, их физиологической регенерации и регуляции этих процессов, а также дифференцировки и жизнедеятельности недифференцированных клеток; разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Результаты диссертационной работы были включены в образовательный и научно-исследовательский процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины общая гистология и цитология, раздела, посвященного системе органов мочеобразования и мочевыведения, читаемого студентам по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело (уровень специалитета).

Личный вклад

Автором были проведены отработка протокола выделения СКМ добровольцев, проточная цитометрия, серийное культивирование, выделение первичных культур клеток переходного эпителия и ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря, иммуноцитохимические исследования, флюоресцентная микроскопия, а также оценка жизнеспособности культуры СКМ на скаффолде. Статистический анализ полученных данных, описание и обсуждение результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены автором самостоятельно. Автор принимал непосредственное участие в написании статей и тезисов и их подготовке к публикации в научных изданиях.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Анатомия и гистология мочеиспускательного канала

Слизистая оболочка уретры выстлана разными видами эпителия в различных ее отделах. В предстательном и мембранозном сегментах, как и мочевого пузыря, уретра выстлана многослойным переходным эпителием (в современной российской и зарубежной научной литературе для обозначения переходного эпителия часто используется термин «уротелий», для простоты изложения в некоторых случаях уротелий будет использоваться для обозначения переходного эпителия и в данной работе). От мембранозного сегмента эпителий сменяется на однослойный многорядный эпителий, который выстилает внутреннюю поверхность органа до glandулярного отдела, начиная с которого и до самого конца мочеиспускательного канала эпителий многослойный плоский полуороговевающий (рисунок 1.1) [Ovalle и др., 2008].

За базальной мембраной эпителия следует собственная пластинка, которая нечетко переходит в спонгиозную ткань, образованную рыхлой соединительной тканью и развитой сетью широких венозных сосудов. В составе межклеточного вещества спонгиозной ткани имеется большое количество эластических волокон, а также редкие пучки продольно ориентированных гладких мышц, что делает уретру способной к значительному изменению размеров в продольном направлении. Снаружи спонгиозная ткань окружена плотной соединительной тканью белочной оболочки [Humphrey, 2014].

Анатомически мочеиспускательный канал делят на три сегмента: простатический (предстательный), мембранозный (перепончатый) и спонгиозный (губчатый). В спонгиозном сегменте уретры также выделяют бульбозный, пениальный и glandулярный отделы. На протяжении всех отделов спонгиозного сегмента уретра окружена губчатой тканью спонгиозного тела. Слизистая бульбозного отдела уретры содержит множество парауретральных желез Литтре, секрет которых покрывает поверхность слизистой, делая ее несмачиваемой для

мочи, что уменьшает потери энергии потока мочи и эякулята при прохождении по уретре и защищает слизистую от токсического действия мочи [Singh, Blandy, 1976].

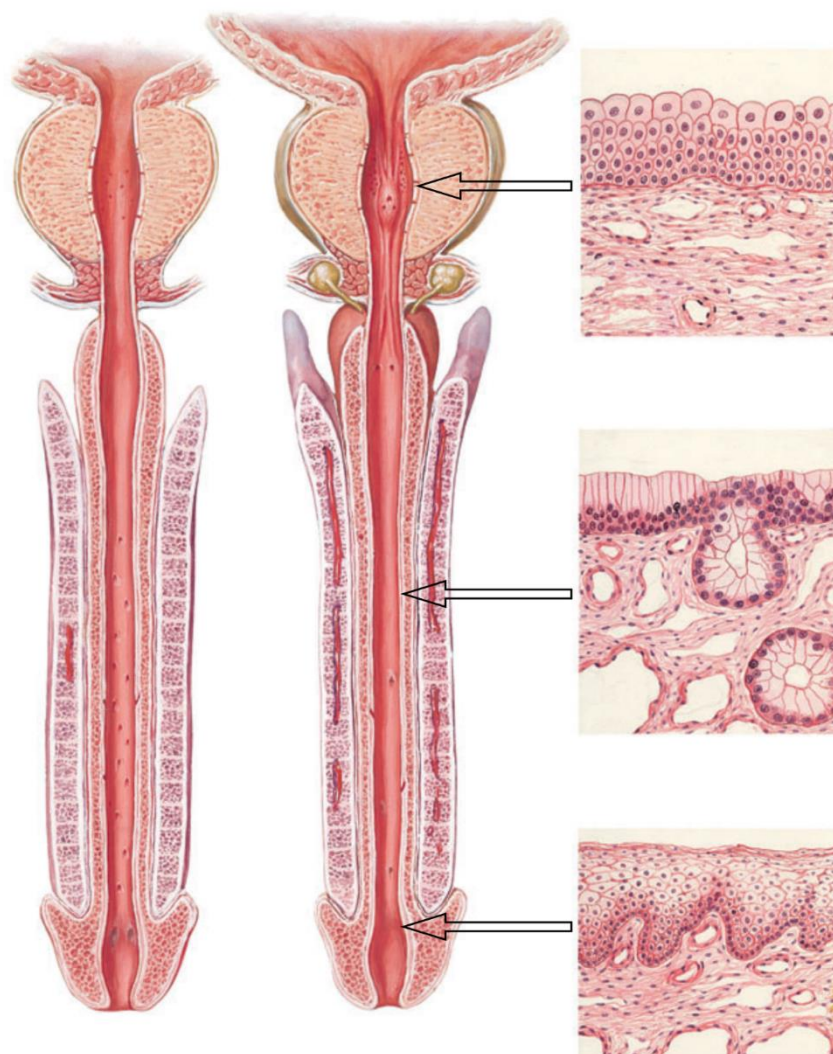


Рисунок 1.1. Виды эпителия в различных отдела мочеиспускательного канала. [Ovalle и др., 2008]

1.1.1 Псевдомногослойный цилиндрический эпителий уретры и многослойный кубический переходный эпителий мочевого пузыря

Уротелий мочевого пузыря и проксимальных сегментов уретры и уретральный эпителий структурно различаются, однако на клеточном и функциональном уровне они имеют много общих черт. Эмбриональное развитие уротелия мочевого пузыря и уретрального эпителия являются частью одного процесса. Развитие эпителия нижних мочевых путей начинается из клеток эпителия

урогенитального синуса, обладающих положительной экспрессией транскрипционного фактора p63. Эпителий уретры также происходит из p63+ клеток, а сам уретральный канал фактически является выростом урогенитального синуса [Pechriggl и др., 2013]. Созревание эпителия мочевого пузыря и уретры является единым процессом, который начинается на 10 неделе эмбриогенеза с развития многослойности эпителия верхушки мочевого пузыря, а заканчивается созреванием эпителия уретры. Следует отметить, что экспрессия p63 сохраняется в базальных клетках уротелия и уретрального эпителия и после рождения [Pechriggl и др., 2013]. Транскрипционный фактор p63 поддерживает стволовость базальных клеток эпителия нижних мочевых путей, которые в свою очередь обеспечивают клеточный гомеостаз эпителиальной ткани. Помимо общности эмбрионального развития, клетки уротелия и уретрального эпителия экспрессируют множество общих маркеров. В дополнение к уже описанному транскрипционному фактору p63, клетки уротелия и уретрального эпителия характеризуются экспрессией цитокератинов (cytokeratin, СК) 5, 7, 8 и 18 [Graaf de и др., 2017]. При этом существуют и некоторые различия. Так, самые поверхностные клетки уротелия, зонтичные клетки, экспрессируют уроплакины, которые участвуют в образовании непроницаемого барьера эпителия мочевого пузыря, в то время как экспрессия уроплакинов в клетках уретрального эпителия отсутствует [Graaf de и др., 2017].

1.1.2 Микроструктура переходного эпителия

Переходный эпителий мочевыводящих путей состоит из 3-7 слоев клеток. Снизу располагается один ряд клеток базального слоя. Клетки базального слоя имеют одно ядро и размер ~10 мкм в диаметре [Khandelwal, Abraham, Apodaca, 2009]. Они прикреплены к базальной мембране посредством полудесмосом, а также связаны с вышележащими клеткам с помощью десмосом [Jones, 2001]. В базальном слое располагаются стволовые клетки переходного эпителия, которые отвечают за самообновление эпителия при потере клеток. Эти клетки характеризуются экспрессией транскрипционного фактора p63 [Pechriggl и др., 2013]. За базальным слоем следует 1-5 промежуточных слоев клеток. Клетки

промежуточных слоев грушевидной формы, имеют одно ядро и размер ~10-15 мкм в диаметре. Клетки связаны друг с другом и с клетками вышележащих слоев с помощью десмосом и щелевых контактов [Jost, Gosling, Dixon, 1989]. Толщина и количество промежуточных слоев зависит от наполненности мочевого пузыря [Hicks, 1975]. Так при пустом мочевом пузыре натяжение его стенок минимально, и количество промежуточных слоев 4-5. При наполненном мочевом пузыре натяжение его стенок увеличивается и количество промежуточных слоев снижается. Клетки промежуточных слоев частично дифференцированы. При потере клеток поверхностного слоя клетки промежуточных слоев как можно скорее проходят окончательную дифференцировку для замещения потерянных клеток [Wu и др., 2009]. Поверхностный слой переходного эпителия составляет один ряд терминально дифференцированных так называемых зонтичных клеток. Это клетки с 1-2 ядрами, имеющие форму многогранника размером от 25 до 250 мкм в диаметре (в зависимости от натяжения стенки мочевого пузыря) [Kreplak и др., 2007]. Апикальная мембрана зонтичных клеток отделена от базолатеральной с помощью плотных контактов, которые скрепляют клетки поверхностного слоя между собой [Acharya и др., 2004; Varley и др., 2006]. Дополнительно к плотным контактам прилегающие друг к другу зонтичные клетки образуют на стыках с помощью интердигтаций цитоплазматической мембраны своеобразную «молнию» шириной в 500 нм [Kreplak и др., 2007]. Эти механические контакты расположены над плотными контактами и вместе с ними позволяют добиться надежного барьера, предотвращающего проникновение мочи между клеток поверхностного слоя. Апикальная мембрана зонтичных клеток покрыта своеобразными мембранными структурами – «уротелиальными бляшками» [Liang и др., 1999]. Эти бляшки образованы четырьмя маннозилированными трансмембранными гликопротеинами – уроплакинами (UP1a, UP1b, UP2, UP3a) [Min и др., 2006; Walz и др., 1995]. Также апикальная поверхность зонтичных клеток имеет слой гликозаминогликанов, обогащенный мукополисахаридами [Hurst и др., 1987]. Уротелиальные бляшки вместе с слоем гликозаминогликанов

препятствуют проникновению мочи и инфекции через клетки переходного эпителия.

Клетки базального, промежуточных и поверхностного слоев переходного эпителия различаются между собой по внутриклеточному составу промежуточных филаментов – цитокератинов [Southgate и др., 1994]. Так, только базальные клетки экспрессируют цитокератины 5, 14 и 17, цитокератин 13 экспрессируется клетками базального слоя и промежуточных слоев, и только зонтичные клетки поверхностного слоя экспрессируют цитокератин 20. При этом клетки всех слоев переходного эпителия экспрессируют цитокератины 7, 8, 18 и 19. Следует также отметить, что только зонтичные клетки и частично клетки, лежащие непосредственно за клетками поверхностного слоя, экспрессируют уроплакины.

1.2 Стриктурная болезнь мочеиспускательного канала

Стриктурой уретры у мужчин называют патологическое сужение мочеиспускательного канала в спонгиозном сегменте вследствие ишемического спонгиофиброза [Latini и др., 2014]. В развитых странах распространенность этого заболевания среди лиц мужского пола достигает 0,6% [Santucci, Joyce, Wise, 2007]. Стриктурная болезнь уретры, как правило, развивается в результате травмы тканей губчатого тела или вследствие бактериального воспаления слизистой уретры. В обоих случаях развивается воспалительная реакция в месте повреждения губчатого тела, которое разрешается образованием фиброзной ткани [Lee, Kim, 2013].

Заместительная уретропластика проводится при протяженных (> 2 см) стриктурах бульбозного отдела уретры или при стриктурах пениального отдела. При заместительной уретропластике пораженный участок уретры частично или полностью замещается другой тканью (рисунок 1.2). В различных хирургических техниках заместительной уретропластики в качестве замещающего материала часто используется лоскут кожи пениса с сохраненной сосудистой ножкой [Коган, 2010]. Альтернативой лоскуту пениальной кожи служат трансплантаты (графты) из экстрагенитальной кожи или слизистой щеки [Barbagli, Sansalome, 2014].

По положению трансплантата относительно уретры различают дорсальную и вентральную виды уретропластики (рисунок 1.2). Дорсальная уретропластика технически сложнее, в то время как при вентральной уретропластике пениального отдела уретры хуже кровоснабжение трансплантата [Barbagli, Sansalome, 2014]. Выбор хирургической техники при заместительной уретропластике зависит от состояния уретрального ложа, т. е. от степени и глубины спонгиозного фиброза и тяжести сопутствующих патологических процессов, а также от локализации и протяженности стриктуры. Следует отметить, что полное удаление стриктурированного участка уретры и замещение его трансплантатом или лоскутом трубчатой формы не проводится из-за высокого процента рецидивов, поэтому при необходимости полного замещения участка уретры дорсальная и вентральная уретропластика проводится в два этапа [Andrich, Greenwell, Mundy, 2003; Kulkarni и др., 2009].

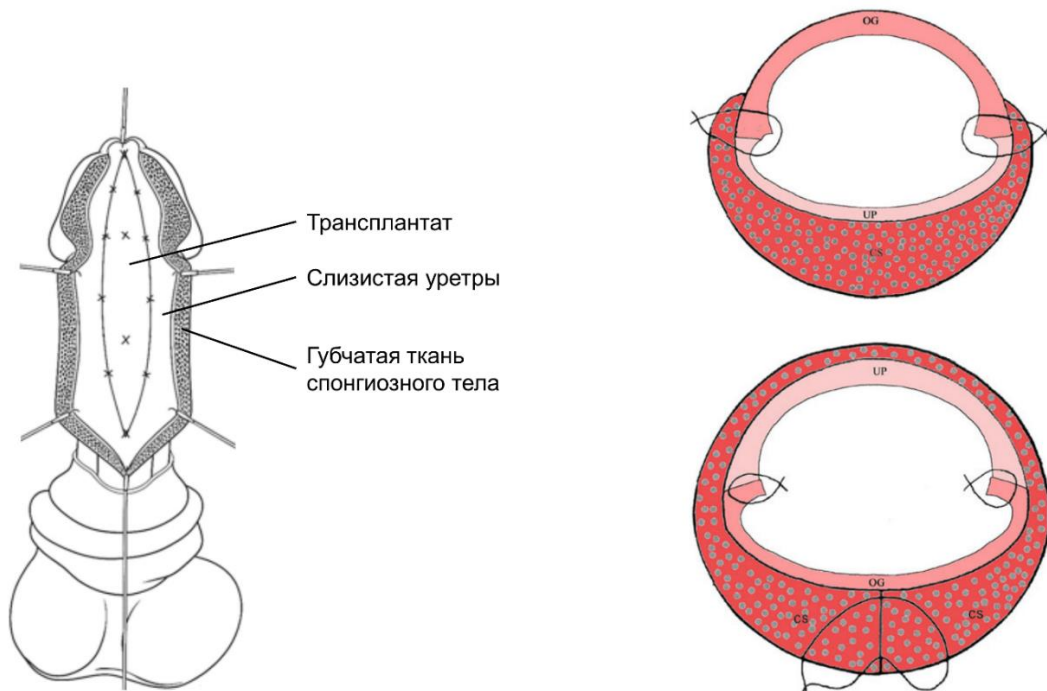


Рисунок 1.2. Слева – дорсальная уретропластика с помощью трансплантата; справа – схематическое изображение дорсальной (сверху) и вентральной (снизу) уретропластики (CS – губчатое тело, UP – слизистая уретры, OG – трансплантат). [Barbagli, Sansalome, 2014]

1.2.1 Трансплантаты для заместительной уретропластики

Для заместительной уретропластики в качестве источника лоскутов и трансплантатов могут выступать различные ткани пациента: генитальная или экстрагенитальная кожа, слизистая оболочка щеки, влагалищная оболочка яичка и др. [Brandes, 2014]. Как было сказано выше, лоскут от трансплантата отличается наличием сосудистой ножки, которая обеспечивает хорошее кровоснабжение. Однако, несмотря на теоретические предпосылки, лоскуты пениальной кожи не обеспечивают более низкий процент рецидивов стриктур в сравнении с трансплантатами. Так в проведенном мета-анализе частота рецидивов стриктур после уретропластики с использованием лоскутов и трансплантатов составила 14,5% и 15,7%, соответственно [Wessells, McAninch, 1998].

Качества, требуемые от трансплантата для заместительной уретропластики, следующие: толстый слизистый слой, тонкая подслизистая пластина, постоянство формы и размера, эластичность, отсутствие абсорбции воды, отсутствие роста волос, простота и доступность в получении, минимум осложнений в донорской зоне [Barbagli, Lazzeri, 2007]. В настоящее время наиболее популярным трансплантатом для заместительной уретропластики является слизистая щеки, которая обладает всеми вышеописанными свойствами. Техника буккальной уретропластики (уретропластика с использованием слизистой щеки) четко описана и может быть освоена достаточно эффективно, в то время как пересадка лоскута с сохранением его кровотока – сложная микрохирургическая операция, требующая высокой точности и большого опыта [Barbagli, Lazzeri, 2007]. Многочисленные исследования показывают, что данный метод уретропластики оказывается эффективным без возникновения рецидива стриктуры в отдаленные сроки после операции в 80-90% случаев [Barbagli и др., 2005].

Забор слизистой оболочки щеки из ротовой полости является отдельным операционным вмешательством, который ведет к возникновению морбидности и риску послеоперационного осложнения в донорской зоне [Коган, 2010]. С другой стороны, при стриктурах уретры значительной протяженности из-за нехватки

донорского материала заместительная уретропластика может проводиться несколько раз, каждый раз с дополнительным забором донорской ткани в ротовой полости [Andrich, Greenwell, Mundy, 2003; Kulkarni и др., 2009]. Таким образом, несмотря на высокую эффективность существующих хирургических техник заместительной уретропластики с использованием слизистой щеки, продолжают поиски альтернативных трансплантатов для заместительной уретропластики, для которых нет необходимости в заборе донорской ткани или этот забор является минимальным.

1.3 Тканевая инженерия мочеиспускательного канала

Тканевая инженерия – это область регенеративной медицины, направленная на создание живых тканей *de novo* в лабораторных условиях с использованием клеток, биополимеров и биоактивных молекул. В дальнейшем такие ткани используются в хирургии для замены пораженных или нефункционирующих органов. Для создания тканеинженерных тканей необходим забор биопсийного материала пациента с целью получения культур аутологичных клеток. Использование аутологичных клеток пациента и безопасных биополимеров позволяет исключить иммунный ответ на компоненты тканеинженерной конструкции (ТИК). За более чем 30 лет существования этой области был достигнут значительный прогресс и было проведено множество клинических исследований ТИК в реконструктивной хирургии [Atala, Kasper, Mikos, 2012]. В контексте заместительной уретропластики было предложено множество различных вариантов ТИК [Kemp de и др., 2015]. ТИК графта для уретропластики по своей гистоархитектонике схожа с гистологическим строением стенки уретры (рисунок 1.3). ТИК состоит из пористого полимера, выполняющего роль матрикса, несущего эпителиальные и клетки нижележащих тканей. Эпителиальные клетки выстилают внутреннюю поверхность ТИК и выполняют барьерную функцию. Из-за трудоемкости получения аутологичных клеток эпителия уретры, при создании различных вариантов ТИК для заместительной уретропластики были

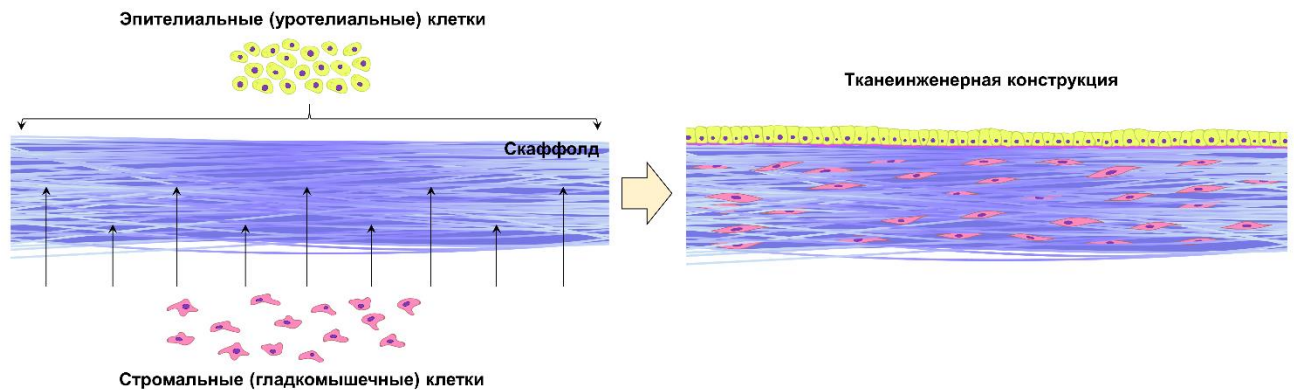


Рисунок 1.3. Схема изготовления тканеинженерной конструкции графта для уретропластики.

использованы эпителий кожи [Rogovaуа и др., 2015], слизистой щеки [Barbagli и др., 2018] и мочевого пузыря [De Filirro и др., 2015]. Клетки нижележащих тканей в ТИК препятствуют ее фиброзированию и выполняют важную функцию в поддержании целостности эпителиального слоя. При создании ТИК уретры в качестве дополнительных клеток были использованы различные клетки мезенхимального происхождения, такие как фибробласты кожи [Rogovaуа и др., 2015] и слизистой щеки [Guo и др., 2016], гладкомышечные клетки (ГМК) мочевого пузыря [Sayeg и др., 2013] и мезенхимальные стромальные клетки (МСК) жировой ткани [Wang и др., 2015]. Механические функции ТИК выполняет биоразлагаемый матрикс.

В зависимости от типа заместительной уретропластики ТИК графта может быть изготовлена плоской формы – для выполнения дорсальной или вентральной уретропластики техникой «накладки» или в форме трубки – для полной замены пораженного участка уретры.

1.4 Источники клеток для ТИК графта для заместительной уретропластики мочеиспускательного канала

1.4.1 Мочевой пузырь и слизистая ротовой полости

Существует несколько органов и тканей, которые используются в качестве источника клеток для изготовления ТИК графта для заместительной уретропластики: мочевой пузырь, кожа, слизистая щёки [Васютин и др., 2017]. Стенка мочевого пузыря считается оптимальным источником клеток. Из биопсийного материала стенки мочевого пузыря можно выделить клетки переходного эпителия и ГМК. ГМК используются в качестве клеток мышечного слоя ТИК. На примере многих эпителиальных тканей было показано, что слизистая может восстанавливаться спонтанно без значительного фиброзирования в случае, если нижележащие ткани не повреждены или повреждение неглубокое [Yannas, 2013]. Восстановление здоровой слизистой после глубоких повреждений возможно только после восстановления нижележащих тканей. Поэтому для предотвращения фиброзирования в конструкцию включают ГМК, которые предотвращают разрастание фиброзной ткани и способствуют нормальной регенерации слизистой уретры. Кроме этого, ГМК мочевого пузыря играют важную роль в поддержании гомеостаза переходного эпителия [Shin и др., 2011]. При повреждении слизистой CK5+p63+ базальные клетки переходного эпителия начинают экспрессировать Shh фактор. Паракринное действие Shh фактора на клетки подслизистой приводит к активации фактора транскрипции Gli1, под воздействием которого увеличивается экспрессия факторов Wnt2, Wnt4 и FGF16. Эти факторы вызывают пролиферацию клеток подслизистой и пролиферацию и дифференцировку базальных клеток переходного эпителия и, таким образом, ускоряют регенерацию слизистой мочевого пузыря (рисунок 1.4). Было показано, что регенерация переходного эпителия у мышей с нокаутом гена GLI1 происходит значительно медленнее в сравнении с диким типом [Shin и др., 2011]. Интересно, что только ГМК мочевого пузыря ускоряют нормальную регенерацию переходного эпителия, в то время как дермальные фибробласты не оказывают такого эффекта. Когда базальные клетки

переходного эпителия культивировали на матрице, содержащей ГМК мочевого пузыря, они организовывали зрелый переходный эпителий с нормальной клеточной полярностью, в то время как при культивировании базальных клеток переходного эпителия на матрице, содержащей дермальные фибробласты, образовавшаяся эпителиальная ткань была дезорганизована [Bouhout, Chabaud, Bolduc, 2016].

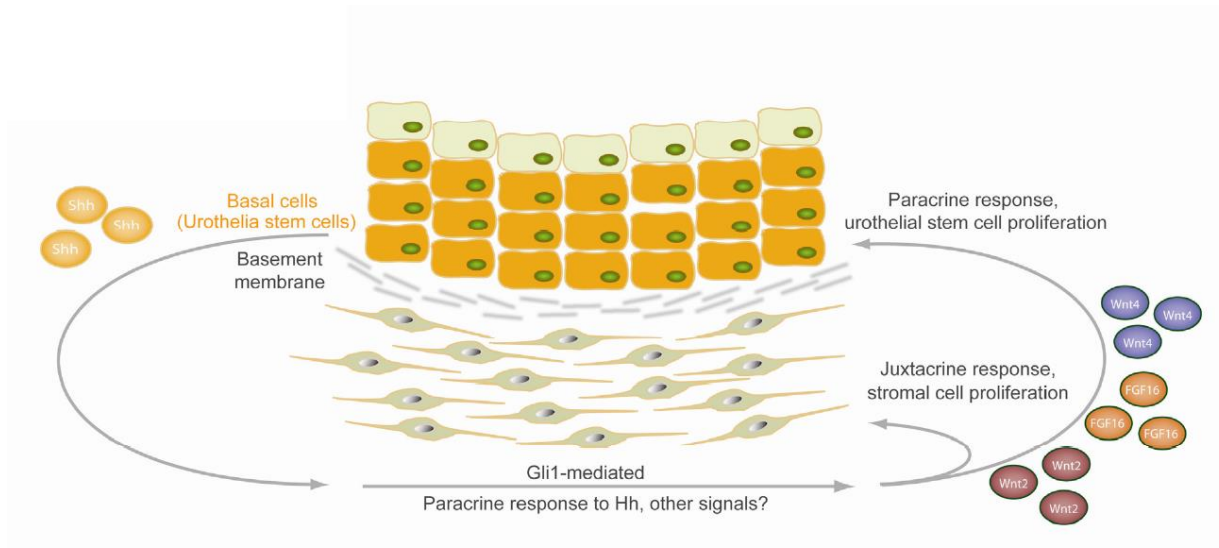


Рисунок 1.4. Схематическое изображение взаимодействия клеток уротелия и клеток подслизистой мочевого пузыря [Shin и др., 2011].

Несмотря на то, что из биопсийного материала мочевого пузыря можно выделить эпителиальные клетки и ГМК, которые максимально близки по своим характеристикам к клеткам мочеиспускательного канала, из-за сложной процедуры забора ткани мочевого пузыря исследователи рассматривают альтернативные источники клеток для ТИК графта для заместительной уретропластики. Одним из таких источников является слизистая оболочка щеки. Как упоминалось выше, слизистая щеки уже многие годы успешно применяется в заместительной уретропластике мочеиспускательного канала. Гистологические исследования показали, что при имплантации в стенку мочевого пузыря фрагмента слизистой щеки у последней не происходит метаплазии эпителия [Filipas и др., 1999; Souza и др., 2008]. Было проведено множество доклинических и клинических исследований ТИК с использованием эпителиальных клеток и фибробластов слизистой щеки в

заместительной уретропластики. В самом крупном клиническом исследовании ТИК, изготовленной с использованием эпителиальных клеток слизистой щеки, эффективность уретропластики составила 84,2% [Barbagli и др., 2018].

1.4.2 Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Клетки переходного эпителия и ГМК для тканевой инженерии могут быть получены с помощью дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). ЭСК получают из эмбрионов на ранних сроках развития. Предполагается, что ЭСК могут дифференцироваться в любые клетки тканей взрослого организма [Itskovitz-Eldor и др., 2000]. В контексте тканевой инженерии органов нижних мочевых путей ЭСК были исследованы на способность дифференцироваться *in vitro* в клетки переходного эпителия [Osborn и др., 2014]. Основываясь на эмбриональном развитии слизистой мочевого пузыря, Osborn и соавт. разработали протокол для дифференцировки *in vitro* ЭСК в клетки переходного эпителия. Изначально ЭСК дифференцировали в клетки эндодермы по протоколу D'Amour [D'Amour и др., 2005]. Затем, полученные клетки содержали в среде для клеток уротелия в течение трех недель. В последние дни дифференцировки в среду добавляли активатор PPAR γ . PPAR γ – это транскрипционный фактор, активация которого приводит к индукции экспрессии уроплакинов [Varley и др., 2006]. Для полученных в результате дифференцировки клеток был показан высокий уровень экспрессии маркеров клеток переходного эпителия. Для дифференцировки в ГМК ЭСК сначала дифференцировали в клетки эмбриональной мезодермы с помощью содержания их в среде с BMP4, фактором, контролирующим формирование мезодермы во время эмбрионального развития. Дальнейшая дифференцировка в ГМК осуществлялась содержанием клеток в среде с фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактором роста фибробластов 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2) для получения CD31+/CD34+ прогениторных клеток сосудов, после чего полученные клетки переносились в среду содержащую тромбоцитарный фактор роста BB (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB) и

трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) для терминальной дифференцировки в ГМК [Marchand и др., 2014; Wang и др., 2016].

Несмотря на возможность получения клеток переходного эпителия и ГМК из ЭСК, данные клетки не могут быть использованы для изготовления аутологичных тканеинженерных трансплантатов для заместительной уретропластики, так как ЭСК могут быть получены только у эмбрионов на ранних сроках развития и не доступны для взрослого человека. Однако клетки с таким же потенциалом дифференцировки могут быть получены трансдукцией транскрипционных факторов, контролирующих плюрипотентность (Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Мyc), в соматические клетки взрослого организма. Впервые данный метод получения плюрипотентных клеток был описан Takashi и Yamanaka, а полученные клетки были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК) [Takahashi, Yamanaka, 2006]. иПСК имеют схожие с ЭСК морфологию и профиль экспрессии генов. Описанные выше протоколы дифференцировки ЭСК в клетки переходного эпителия и ГМК также применимы к иПСК. В то же время, необходимость трансдукции генов для получения иПСК вызывает дополнительные вопросы безопасности использования этих клеток в клинике из-за онкогенного потенциала трансдуцируемых генов.

1.4.3 Мезенхимальные стромальные клетки

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) изначально были найдены в костном мозге, но позже были выделены из многих других тканей [Brighton и др., 1992; Caplan, 2011; Krampner и др., 2007; Salingsarnboriboon и др., 2003]. Для этих клеток была показана возможность дифференцировки в клетки различных типов соединительных тканей: адипоциты, хондроциты, остециты. В контексте тканевой инженерии мочеиспускательного канала, для МСК была показана экспрессия специфических внутриклеточных маркеров, характерных для ГМК (гладкомышечный актин, смузелин, трансгелин, кальпонин), а также сравнимая с ГМК способность к сокращению. Кроме того, во многих исследованиях было показано, что МСК выделяют различные цитокины, которые обладают

противовоспалительным эффектом, и их присутствие в зоне поражения слизистой останавливает фиброзирование и способствует нормальной регенерации ткани [Crisan и др., 2008; Hirschi, D'Amore, 1996; Le Blanc и др., 2003; Maitra и др., 2004]. Это свойство МСК может иметь особое значение для хирургического лечения стриктурной болезни мочеиспускательного канала, так как фиброз после операции и, как следствие, последующий рецидив стриктуры – наиболее частое осложнение заместительной уретропластики. Таким образом, МСК в ТИК трансплантата для уретропластики, с одной стороны, обладают свойством ГМК, а, с другой стороны, ингибируют послеоперационное воспаление в зоне имплантации. ТИК с включением МСК была использована для регенерации мочевого пузыря с обнадеживающими результатами. Sharma и соавт. использовали конструкции на основе синтетических полимеров с включением МСК для регенерации мочевого пузыря у крыс. Гистологические исследования мочевого пузыря в месте имплантации показали, что у животных, которым были имплантированы конструкции с МСК, отношение гладких мышц к коллагену составило 1:1, в то время, как у животных, которым были имплантированы конструкции с ГМК или бесклеточный матрикс, данное отношение составило 3:7 и 2:8, соответственно [Sharma и др., 2010].

1.4.4 Стволовые клетки из амниотической жидкости

Из небольшого объема амниотической жидкости, полученной на втором триместре беременности, можно выделить клетки с высокими пролиферативным и дифференцировочным потенциалом [De Coppi и др., 2007]. Эти клетки были названы стволовыми клетками из амниотической жидкости (АСК). АСК могут содержаться в культуре до 250 удвоений популяции без возникновения генных аномалий. Они экспрессируют высокий уровень Oct4 и NANOG – факторы, поддерживающие плюрипотентность в ЭСК. Также АСК могут образовывать эмбриональные тельца в культуре, которые содержат производные клетки всех трех зародышевых листков. При этом, в отличие от ЭСК и иПСК, АСК не образуют тератомы после имплантации. Было показано, что АСК могут дифференцироваться

во многие клетки, включая клетки скелетных и сердечной мышц, хондроциты, остециты, адипоциты, клетки почки, клетки легких и даже клетки гематопоезического ряда [Cananzi, Atala, Corpi, 2011]. В целом АСК имеют более благоприятный профиль безопасности, нежели ЭСК или иПСК, а их получение является безопасным для эмбриона. В литературе доступно ограниченное количество информации по использованию АСК в регенеративной медицине органов нижних мочевых путей. Kang и соавт. использовали среду, кондиционированную культурой клеток переходного эпителия, для дифференцировки АСК в клетки уротелия. В результате, полученная таким образом культура экспрессировала маркеры клеток уротелия – уроплакин II и СК 8 [Kang и др., 2014].

1.5 Обзор биоматериалов, используемых в ТИК для заместительной уретропластики

Межклеточное вещество в тканях состоит из множества различных белков и полисахаридов. Оно формирует среду, в которой клетки могут жить и функционировать, а также обеспечивает ткань механическими и структурными свойствами. Межклеточное вещество состоит из трех классов биомолекул. Гликозамионгликаны формируют гель, который позволяет ткани противостоять компрессионным силам и обеспечивает быструю диффузию питательных веществ, метаболитов и гормонов. Волокнистые белки, такие как коллаген, определяют структуру межклеточного вещества и обеспечивают механическую прочность ткани. Гликопротеины опосредуют клеточную миграцию и жизнедеятельность, а также взаимодействие клеток с межклеточным веществом. Для множества видов клеток было показано, что для пролиферации клетки должны быть прикреплены к межклеточному веществу. Более того, клетки эпителия, эндотелиальные клетки и клетки поперечнополосатых мышц быстро уходят в апоптоз, если теряют контакт с межклеточным веществом. Этот феномен известен как «зависимость от прикрепления». Он опосредован клеточными интегринами, которые распознают

специальные домены на компонентах межклеточного вещества. Одним из таких доменов является специфическая аминокислотная последовательность (Арг-Гли-Асп или RGD), которая была найдена на поверхности множества белков и гликопротеинов межклеточного вещества. Дополнительно к уже перечисленным структурным элементам межклеточное вещество имеет в своем составе большое количество матрикс ассоциированных биоактивных белков и ферментов.

В тканевой инженерии функции межклеточного вещества выполняет экзогенный нетоксичный биоматериал, называемый «скаффолд» [Tomlins, 2016]. Скаффолд задает форму и механические свойства ТИК и является субстратом для прикрепления клеток, их пролиферации и дифференцировки. Кроме того, скаффолд участвует в формировании окружения клеток и доставки к ним биоактивных сигналов.

Для выбора подходящего биоматериала скаффолда для ТИК органов мочевыводящей системы, таких как мочевой пузырь и мочеиспускательный канал, необходимо определить следующие его характеристики:

- 1) Клеточная совместимость. Биоматериал должен нести клетки и способствовать нормальной клеточной жизнедеятельности, пролиферации и дифференцировке. Составляющие биоматериала должны обладать нулевой клеточной токсичностью.
- 2) Механические свойства. Так как биоматериал определяет механические свойства всей ТИК, его прочность и эластичность должны быть достаточными для хирургических манипуляций и после имплантации ТИК. Оптимально, механические свойства биоматериала должны быть аналогичными таковым нативной ткани.
- 3) Структурные свойства. Биоматериал должен быть пористым и позволять свободную миграцию клеток и веществ через все слои биоматериала. Поверхность биоматериала должны позволять клеткам прикрепляться.
- 4) Биосовместимость. Биоматериал и продукты его деградации должны быть биосовместимыми, т. е. быть нетоксичными для реципиента и вызывать минимальный иммунный ответ после имплантации.

- 5) Деградация. Скорость деградации биоматериала должна быть эквивалентна скорости прорастания новой здоровой ткани, а продукты деградации должны быть резорбируемыми и метаболизироваться через стандартные метаболические пути.

Биоматериалы, используемые в тканевой инженерии, можно разделить на три категории: децеллюляризированные ткани, натуральные полимеры и синтетические полимеры.

1.5.1 Децеллюляризированные ткани

Децеллюляризированные ткани часто используются в качестве биоматериала в тканевой инженерии и для регенерации тканей. Большинство из используемых вариантов децеллюляризированных тканей имеют животное происхождение. К примеру, децеллюляризированные ткани свиньи часто используются для тканевой инженерии человеческих тканей из-за их размера, формы, анатомической структуры и молекулярного состава, которые сходны с таковыми у тканей человека [Aufderklamm и др., 2017; Dehoux, Gianello, 2007]. Процесс децеллюляризации удаляет все ксеногенные клетки и клеточные компоненты, оставляя межклеточный матрикс на основе коллагена с гликозаминогликанами и биоактивными молекулами, такими как фибриноген и факторы роста [Keane, Saldin, Badylak, 2016]. Эти биоактивные соединения облегчают прикрепление клеток к скаффолду, поэтому децеллюляризированные ткани обладают высокой клеточной совместимостью. В то время, как недостаточная децеллюляризация приводит к иммунному ответу на оставшиеся ксеногенные клеточные компоненты, избыточная децеллюляризация удаляет биоактивные соединения в составе биоматериала и приводит к ухудшению клеточной совместимости [Crapo, Gilbert, Badylak, 2011; Keane и др., 2015]. Эффективность децеллюляризации оценивается по количеству остаточной ДНК. В недавнем исследовании Crapo и соавт. предложили 3 минимальных критерия достаточной децеллюляризации: 1) количество оставшейся ДНК меньше 50 нг на 1 мг сухого веса матрикса; 2) оставшиеся фрагменты ДНК короче 200 пар оснований; 3) отсутствие следов ядер

при гистологическом исследовании [Crapo, Gilbert, Badylak, 2011]. Для децеллюляризированных тканей, удовлетворяющих перечисленным условиям, было показано отсутствие иммунного ответа после имплантации лабораторным животным.

Для тканевой инженерии мочеиспускательного канала использовались следующие децеллюляризированные ткани: стенка тонкого кишечника свиньи, губчатое тело, дерма кожи, стенка мочевого пузыря. Эти ткани могут быть полностью децеллюляризированы с помощью 0,1% раствора надуксусной кислоты в течение 2-3 часов [Reing и др., 2010; Zamiri и др., 2010]. Децеллюляризированный матрикс губчатого тела и стенки мочевого пузыря являются наиболее подходящими децеллюляризированными тканями в тканевой инженерии мочеиспускательного канала, так как они обладают схожими механическими и структурными характеристиками, а также схожим молекулярным составом, что и нативная ткань мочеиспускательного канала. В исследовании Davis и соавт. проводилась оценка клеточной совместимости клеток переходного эпителия с различными децеллюляризированными тканями и было показано, что выживание и пролиферативная активность клеток переходного эпителия была выше на скаффолде из децеллюляризированного губчатого тела, чем на скаффолде из децеллюляризированного тонкого кишечника свиньи [Davis и др., 2011].

Наряду с перечисленными преимуществами децеллюляризированные ткани обладают и рядом существенных недостатков. Так сложность получения децеллюляризированных тканей ограничивает их доступность для исследований и клинической практики, а животное происхождение и комплексность химического состава значительно усложняет стандартизацию процесса получения.

1.5.2 Натуральные полимеры

Множество полимеров животного происхождения были исследованы для применения в тканевой инженерии. За счет RGD-последовательностей и других специфических доменов клеточной адгезии натуральные полимеры обладают высокой клеточной совместимостью, а их крайне консервативный

аминокислотный состав среди животных разных видов позволяет использовать их в клинической практике без опасения иммунного ответа на компоненты биоматериала. Коллаген I типа является наиболее широко представленным белком в тканях млекопитающих [Ricard-Blum, 2011]. Он может быть легко получен из тканей для создания геля, губки или волокнистого скаффолда. При необходимости в скаффолдах на основе коллагена можно создать поры желаемого размера и распределения, а дополнительную прочность скаффолду можно придать с помощью образования поперечных межмолекулярных связей [Mastropasqua, 2015]. Другим натуральным полимером, который может быть использован в тканевой инженерии, является фибриноген [Andrianova, Fedorova, 1975]. Большое количество фибриногена находится в крови млекопитающих, из которой его можно легко выделить. Каждая молекула фибриногена содержит два интегрин-связывающих домена и имеет дополнительные центры аффинности к различным факторам роста и цитокинам, поэтому включение фибриногена положительно влияет на клеточную совместимость скаффолда [Catelas, Dwyer, Helgerson, 2008; Martino и др., 2013]. При этом сам по себе фибриноген обладает низкой прочностью, поэтому скаффолды на основе исключительно фибриногена в тканевой инженерии не используются. Фибриноген дополнительно добавляют для улучшения биологических свойства биоматериала.

1.5.3 Синтетические полимеры

Синтетические полимеры, такие как полигликолиевая кислота (PGA), полимолочная кислота (PLA), поликапролактон (PCL) и другие, используются в хирургии в качестве шовного материала и для изготовления искусственных имплантов уже многие годы. Они дешевые, прочные и не вызывают иммунного ответа. Из-за своих свойств эти синтетические полимеры привлекли внимание исследователей для использования в тканевой инженерии. Синтетические полимеры позволяют изготавливать скаффолды желаемых формы, пористости и механических характеристик [Tomlins, 2016]. Хотя синтетические полимеры не имеют в своем составе специфические домены для клеточной адгезии, их

поверхность позволяет клеткам прикрепляться и пролиферировать. В исследовании Kundu и соавт. было показано, что скаффолды на основе PCL и PLA не уступают по своим способностям поддерживать культуру клеток уротелия децеллюляризированной ткани тонкого кишечника [Kundu, Gelman, Tyson, 2011]. Комбинирование различных синтетических полимеров позволяет создать скаффолд с заданной скоростью деградации. К примеру, известно, что деградация PGA происходит значительно быстрее, чем деградация PLA. Смешивание этих двух полимеров в различных пропорциях позволяет получить биоматериал с временем полудегradации, варьируемым от нескольких недель до нескольких лет [Rezwan и др., 2006]. Другими управляемыми свойствами биоматериала, влияющими на время его деградации, являются толщина волокон, пористость и отношение площади поверхности к объему [Samami, 2016].

Для использования синтетических полимеров в тканевой инженерии органов мочевыводящих путей биodeградация полимеров должна быть безопасна и осуществляться через канонические метаболические пути. PLA и PGA деградируют посредством гидролиза, финальными продуктами которого являются молочная и гликолиевая кислоты, которые могут быть элиминированы с помощью почек, респираторного тракта или метаболизированы в цикле Кребса до диоксида углерода и воды [Samami, 2016].

Биологические свойства скаффолдов на основе синтетических полимеров могут быть улучшены добавлением в скаффолд натуральных полимеров, таких как коллаген и фибрин. Добавление этих белков в структуру скаффолда возможно несколькими путями. Так, Chen и соавт. создали PLGA-коллагеновую губку погружением PLGA губки в раствор коллагена с последующей сублимационной сушкой для придания коллагену микропористой структуры [Chen, Ushida, Tateishi, 2000]. Salem и соавт. показали, что клеточная совместимость PLGA-коллагеновых гибридных скаффолдов, выше чем у PLGA скаффолдов [Salem и др., 2013]. PLGA-коллагеновые скаффолды также использовались для создания тканеинженерной конструкции с использованием клеток переходного эпителия и ГМК и показали обнадеживающие результаты [Nakanishi и др., 2003]. Фибриноген и фибрин также

использовались для улучшения биологических свойств скаффолдов на основе синтетических полимеров. В исследовании He и соавт. было показано, что P(LLA-CL)-фибриногеновый гибридный скаффолд значительно улучшал клеточную пролиферацию в сравнении со скаффолдом на основе просто P(LLA-CL) [He и др., 2011].

Magnan и соавт. применили принципиально другой подход к созданию ТИК мочеиспускательного канала [Magnan и др., 2009]. Этот подход не предполагает использование экзогенного скаффолда, а использует способность клеток производить межклеточное вещество. Фибробласты культивировались в среде, содержащей 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, на протяжении 27 дней. Аскорбиновая кислота индуцировала фибробласты секретировать коллаген I типа. По прошествии 27 дней, культура фибробластов оказалась погружена в толстый слой коллагена. Позже пласт коллагена с фибробластами был взят и использован для изготовления трубки. На внутреннюю поверхность трубки были засеяны клетки переходного эпителия.

1.6 Обзор некоторых доклинических исследований ТИК в заместительной уретропластике мочеиспускательного канала

Было проведено множество доклинических исследований для оценки эффективности заместительной уретропластики с использованием тканеинженерного трансплантата. Тканеинженерные трансплантаты в этих исследованиях изготавливались на основе матриц из различных синтетических и натуральных материалов с включением множества различных типов клеток [Atala и др., 2017]. Типы биоматериалов и клеток для изготовления ТИК представлены в таблице 1.1. В данном параграфе хотелось бы остановиться на нескольких вариантах ТИК, использованных в заместительной уретропластике.

Dorin и соавт. проводили заместительную уретропластику у кроликов с использованием тубуляризированных графтов различной длины без клеток на основе децеллюляризированной слизистой мочевого пузыря [Dorin и др., 2008].

Целью данного исследования была оценка максимальной длины бесклеточного графта, при которой может происходить регенерация ткани уретры без фиброзирования и последующего образования стриктуры. В исследовании проводилось удаление участка уретры и замещение его тубуляризированным графтом длиной 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 см без клеток. Прорастание здоровой уретральной ткани с прилегающих к бесклеточному матриксу краев уретры приводило к формированию здоровой ткани на месте графта только в случае, когда длина замещенного сегмента была 0,5 см. При более протяженных размерах замещенного сегмента на месте графта образовывался фиброз, в конечном итоге ведущий к стриктуре канала. Таким образом, исследователи сделали заключение, что при необходимости замещения участка мочеиспускательного канала длиной от 1,0 см необходимо использование тканеинженерных графтов с клеточным компонентом.

В исследовании Orabi и соавт. оценивали эффективность тканеинженерного графта на основе децеллюляризованного фрагмента мочевого пузыря, засеянного аутологичными клетками уротелия и ГМК мочевого пузыря, в заместительной уретропластике [Orabi и др., 2013]. Исследование проводилось на 21 собаках породы бигль, которые были разделены на 2 группы – 6 собак в контрольной группе и 15 собак в экспериментальной группе. У каждого из подопытных животных были иссечены шестисантиметровый сегмент уретры дистальнее мембранозной уретры. После чего скаффолд с засеянными на него клетками был вставлен на место иссеченного фрагмента уретры и соединен с двух сторон с уретрой с помощью швов из викрила 6-0. У шести контрольных животных была проведена такая же операция за исключением того, что в качестве замещающего сегмента использовался скаффолд без клеток. Животные в экспериментальной группе, которым был пересажен скаффолд с клетками, были разделены на 4 группы: 3 животных были умерщвлены через 1 месяц после операции и по 4 животных было умерщвлено через 3, 6 и 12 месяцев после операции. Животные контрольной группы были умерщвлены после возникновения у них стриктуры уретры, вызвавших значительные трудности при мочеиспускании.

Для изготовления тканеинженерных графтов семисантиметровый сегмент децеллюляризированного фрагмента мочевого пузыря свиньи после стерилизации был обвит вокруг стерильного уретрального катетера 14Fr. Края фрагмента были сшиты хирургической нитью из викрила для формирования трубки. На подготовленный таким образом скаффолд трубчатой формы насеивались ГМК на внешнюю поверхность трубки в концентрации 10×10^6 клеток на квадратный сантиметр. Для равномерного распределения клеток скаффолд, все еще насаженный на катетер, закреплялся в культуральном цилиндре, который вращался со скоростью 75 оборотов в минуту на протяжении 48 часов в среде DMEM + 10% FBS. По истечении 48 часов вращение цилиндра останавливалось, среда в цилиндре заменялась на DMEM + 10% FBS/KSFM (50%/50%), и скаффолд с клетками оставлялся в статичном положении на дополнительные 48 часов для лучшего прикрепления клеток. После истечения этого периода катетер извлекался, и на внутреннюю поверхность скаффолда наносились клетки уротелия в концентрации 10×10^5 клеток на квадратный сантиметр. Далее матрица с клетками оставлялась в статических условиях на дополнительные 48 часов, после чего на внешнюю поверхность скаффолда снова насеивались ГМК, и скаффолд оставлялся для созревания в статических условиях на финальные 48 часов.

У всех животных контрольной группы наблюдалось раннее подтекание мочи после извлечения уретрального стента в связи с образованием фистулы на месте контакта бесклеточной матрицы с тканью натуральной уретры. По данным компьютерной томографии через 3 месяца после имплантации у всех животных контрольной группы образовались стриктуры, после чего животные были умерщвлены. Визуальное анатомическое и гистологическое исследование показало образование стриктуры и фиброз всей имплантированной конструкции. В экспериментальной группе у всех животных уретра имела нормальный вид с нормальным диаметром просвета во всех временных точках после имплантации. Гистологический анализ ТИК показал наличие многослойного уротелия и гладкомышечной ткани уже через 1 месяц после имплантации. Степень образования нормальной ткани уретры зависела от времени, прошедшего после

операции, и выражалась в увеличении содержания пучков гладких миоцитов. В свою очередь, гистологические исследования уретры животных контрольной группы показали наличие выраженного фиброза и небольшое количество гладкомышечной ткани.

В исследовании Mikami и соавт. для замещения сегмента мочеиспускательного канала у собак использовалась ТИК графта на основе скаффолда из коллагена и аутологичных клеток слизистой полости рта [Mikami и др., 2012]. Для изготовления ТИК у собак забирался фрагмент слизистой щеки вместе с эпителиальной и нижележащей мышечной тканями. Из забранного материала выделялись клетки эпителия и мышечные клетки с последующим культивированием каждого типа клеток до получения необходимого для ТИК количества. Мышечные клетки высевались на многослойную сетку из коллагена I типа и полученный мышечный листок содержали в среде DMEM/F12 с 10% сыворотки в течение 2 недель. Затем на одну сторону мышечного листка ТИК наносили слой эпителиальных клеток, после чего всю полученную конструкцию скручивали в трубку и использовали для заместительной уретропластики. В исследовании было 2 группы. В обеих группах проводилось полное иссечение участка пениальной уретры длиной в 2 см вместе с нижележащей губчатой тканью, при этом в экспериментальной группе после иссечения участка уретры проводилась уретропластика с использованием тканеинженерного графта, тогда как в контрольной группе после иссечения участка уретры никакой пластики не проводилось. В обеих группах послеоперационная рана закрывалась стандартным способом.

Через 12 недель после операции у животных экспериментальной группы на месте замещенного сегмента образовался многослойный эпителий, а подслизистая была хорошо васкуляризирована и содержала мышечные клетки. Уретрограмма показала отсутствие стриктур, фистул или дилатации уретры. В контрольной группе гистологическое исследование показало отсутствие слизистой на месте иссеченного фрагмента, а просвет уретры был практически полностью облитерирован.

Таблица 1.1. Виды животных моделей и типа тканеинженерных конструкций для уретропластики.

Животное	Скаффолд	Форма ТИК	Типы клеток	Год	Ссылка
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря свиньи	Трубка	Клетки уротелия и ГМК мочевого пузыря	2002	[De Filippo, Yoo, Atala, 2002]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Трубка	Кожные кератиноциты	2007	[Fu и др., 2007]
Белые японские кролики, самцы	P(LA/CL)–коллагеновая губка	Трубка	-	2007	[Kanatani и др., 2007]
Голые мыши (nude)	Децеллюляризированный матрикс артерии кролика	Заплатка	Клетки уротелия мочевого пузыря	2007	[Guan и др., 2008]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря свиньи	Трубка	-	2008	[Dorin и др., 2008]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Заплатка	Оральные кератиноциты	2008	[Li и др., 2008]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс губчатого тела свиньи	Заплатка	Оральные кератиноциты и кавернозные ГМК	2011	[Feng и др., 2011]
Собаки породы бигль, самцы	Объединенные клеточные листки из эпителиальных и ГМК в коллагеновом матриксе	Трубка	Оральные кератиноциты и ГМК	2012	[Mikami и др., 2012]
Белые новозеландские кролики, самцы	Скаффолд на основе плотного коллагенового геля	Трубка	ГМК мочевого пузыря	2012	[Micol и др., 2012]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Трубка	Клетки мезотелия	2012	[Gu и др., 2012]
Собаки породы бигль, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря свиньи	Трубка	Клетки уротелия и ГМК мочевого пузыря	2012	[Orabi и др., 2013]

Животное	Скаффолд	Форма ТИК	Типы клеток	Год	Ссылка
Собки, самки	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря собаки	Трубка	ГМК мочевого пузыря	2012	[El-Tabey и др., 2012]
Собаки породы бигль, самки	Фиброиновый матрикс	Заплатка	Клетки уротелия	2013	[Xie и др., 2013]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря свиньи	Заплатка	ГМК мочевого пузыря	2013	[Sayeg и др., 2013]
Собаки породы бигль, самцы	PGA сетка	Трубка	Оральные кератиноциты и стволовые клетки из жировой ткани	2013	[Fu и др., 2014]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Заплатка	Стволовые клетки из жировой ткани, дифференцированные в эпителий	2014	[Li и др., 2014]
Собаки породы бигль, самки	Матрикс на основе шелка	Заплатка	Оральные кератиноциты и фибробласты	2014	[Xie и др., 2014]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс дермы человека	Заплатка	-	2014	[Kajbafzadeh и др., 2014]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Заплатка	-	2014	[Huang и др., 2014]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс амниотической мембраны человека	Заплатка	Клетки эпителия уретры	2014	[Wang и др., 2014]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Заплатка	Клетки эпителия уретры и клетки эндотелия	2015	[Chun и др., 2015]
Белые новозеландские кролики, самцы	PLA мембрана	Заплатка	Стволовые клетки из жировой ткани	2015	[Wang и др., 2015]

Животное	Скаффолд	Форма ТИК	Типы клеток	Год	Ссылка
Белые новозеландские кролики, самцы	3D пористый матрикс на основе бактериальной целлюлозы	Заплата	Оральные кератиноциты	2015	[Huang и др., 2015]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс тонкого кишечника свиньи	Заплата	Оральные кератиноциты и фибробласты	2015	[Guo и др., 2016]
Белые новозеландские кролики, самцы	P(LLA-CL)-коллагеновый матрикс	Трубка	Клетки уротелия	2015	[Zhang и др., 2015]
Крысы Wistar	Амниотическая мембрана, покрытая PLL/PCL с обеих сторон	Заплата	-	2016	[Adamowicz и др., 2016]
Белые новозеландские кролики, самцы	Пленка на основе шелка/кератина	Заплата	-	2016	[Lv и др., 2016a]
Белые новозеландские кролики, самцы	Матрикс на основе коллагена	Трубка	-	2016	[Pinnagoda и др., 2016]
Белые новозеландские кролики, самцы	PLLA/PEG сетка	Заплата	Амниотические стволовые клетки человека	2016	[Lv и др., 2016b]
Гёттингенские мини-пиги, самцы	Матрикс на основе коллагена	Заплата	Клетки уротелия человека	2016	[Aufderklamm и др., 2017]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс тонкого кишечника свиньи	Трубка	Стволовые клетки, выделенные из мочи	2017	[Liu и др., 2017]
Белые новозеландские кролики, самцы	Грануляционная ткань	Трубка	Грануляционная ткань + клетки мезотелия	2017	[Jiang и др., 2017]
Sprague Dawley крысы, самцы	Децеллюляризированный матрикс губчатого тела человека	Заплата	-	2017	[Kajbafzadeh и др., 2017a]
Белые новозеландские кролики, самцы	Мембраны на основе P(LL/CL) и мембраны на основе PTC (Poly(trimethylene carbonate))	Заплата	-	2017	[Sartoneva и др., 2018]

Животное	Скаффолд	Форма ТИК	Типы клеток	Год	Ссылка
Sprague Dawley крысы, самцы	Децеллюляризированный матрикс губчатого тела человека	Заплата	-	2017	[Kajbafzadeh и др., 2017b]
Белые новозеландские кролики, самцы	Децеллюляризированный матрикс мочевого пузыря кролика	Трубка	Клетки уротелия, ГМК мочевого пузыря, прогениторные эндотелиальные клетки	2017	[Li и др., 2017]
Собаки породы бигль, самцы	Объединенные клеточные листки из эпителиальных клеток, фибробластов и стволовые клетки из жировой ткани в коллагеновом матриксе	Трубка	Оральные кератиноциты, фибробласты и стволовые клетки из жировой ткани	2017	[Zhou и др., 2017]
Собаки породы бигль, самки	Двуслойный матрикс на основе шелка и бактериальной целлюлозы	Трубка	Оральные кератиноциты и мышечные клетки	2018	[Lv и др., 2018]
Крысы	Матрикс на основе коллагена	Заплата	-	2018	[Chapin и др., 2018]
Белые новозеландские кролики, самцы	Матрикс на основе шелка	Заплата	-	2018	[Algarrahi и др., 2018]
Белые новозеландские кролики, самцы	Матрикс на основе коллагена	Трубка	-	2018	[Larsson и др., 2018]

1.7 Стволовые клетки в моче

1.7.1 Характеристика стволовых клеток в моче

Стволовые клетки, выделенные из мочи человека, впервые были описаны в работе Zhang и соавт. [Zhang и др., 2008]. Авторы использовали двукратное центрифугирование для выделения клеточной фракции из образцов мочи здоровых добровольцев. Полученная клеточная фракция была суспендирована в среде, обогащённой различными индукторами пролиферации, и посеяна на культуральную посуду. По прошествии 5 дней незначительная часть клеток клеточной фракции ($<1,0\%$) дала рост стабильным клеточным колониям. Клеточные колонии показали высокий пролиферативный потенциал, могли содержаться в культуре до 10 пассажей, что составляло в среднем $35,9 \pm 5,3$ удвоений популяции. Время удвоения популяции на третьем пассаже составило $21,7 \pm 2,3$ часов. Исследование экспрессии поверхностных маркеров колониобразующих клеток, выделенных из мочи, показало отрицательную экспрессию маркеров клеток гематopoэтического ряда и положительную экспрессию различных маркеров, описанных для тканевых стволовых клеток (таблица 1.2) [Bharadwaj и др., 2013]. В дополнение к полученным данным, для выделенных из мочи клеток была показана возможность дифференцировки в различные клетки мезенхимального, эктодермального и эндодермального происхождения. Таким образом, выделенные из мочи клетки обладали свойствами стволовых клеток, а именно, экспрессией маркеров соматических стволовых клеток, способностью дифференцироваться в клетки различного происхождения, а также способностью образовывать колонии из одной клетки.

Дальнейшие исследования стволовых клеток, выделенных из мочи, (СКМ) были направлены на оценку возможности этих клеток дифференцироваться в клетки органов нижних мочевых путей – клетки уротелия и ГМК [Bharadwaj и др., 2011]. Для дифференцировки в клетки уротелия СКМ содержали в течение двух недель в среде с низким содержанием сыворотки (2%) и высокой концентрацией

эпидермального фактора роста (EGF). В конце периода дифференцировки по данным проведенного

Таблица 1.2. Поверхностные маркеры стволовых клеток, выделенных из мочи.

Маркеры тканевых стволовых клеток		Маркеры клеток гематопозитического ряда	
CD29	99,80%	CD11b	<1,0%
CD44	>99,9%	CD14	<1,0%
CD54	89,50%	CD19	<1,0%
Маркеры МСК		CD31	<1,0%
CD73	99,70%	CD34	<1,0%
CD90	69,20%	CD45	<1,0%
CD105	70,20%	Маркеры клеток эндотелия	
CD166	87,60%	CD146	98,30%
STRO-1	1,30%	PDGF- α	8,90%
Маркеры плюрипотентных стволовых клеток		NG2	1,50%
SSEA4	99,00%		
TRA-1-81	24,60%		
TRA-1-60	1,70%		

иммуноцитохимического окрашивания и Western blot полученные клетки экспрессировали маркеры клеток уротелия, а именно уроплакин Ia, СК 7, СК 13, СК 20. Для дифференцировки в ГМК СКМ содержали в течение двух недель в среде, содержащей факторы роста PDGF-BB и TGF- β . Эти факторы роста были описаны ранее как индукторы гладкомышечной дифференцировки для различных типов стволовых клеток, включая МСК. Было показано, что содержание культуры СКМ в среде с PDGF-BB и TGF- β достоверно увеличило экспрессию маркеров ГМК: α SMA, кальпонины, миозина, десмина, смузелина. Таким образом, на основании полученных данных, СКМ могут дифференцироваться в клетки уротелия и ГМК в культуре, и поэтому могут быть использованы для тканевой инженерии мочеиспускательного канала.

1.7.2 Стволовые клетки из мочи в тканевой инженерии мочеиспускательного канала

Bodin и соавт. использовали СКМ для создания ТИК мочеиспускательного канала на основе скаффолда из бактериальной целлюлозы [Bodin и др., 2010]. Клетки для данной конструкции готовились на основе описанных выше протоколов

по дифференцировке СКМ в клетки уротелия и ГМК. Полученные клетки высевались на пористую поверхность скаффолда из бактериальной целлюлозы с плотностью посева 10^6 клеток на 1 см^2 поверхности скаффолда. Сначала высевались СКМ, прошедшие дифференцировку в ГМК, а через 12-24 часа поверх них высевались СКМ, прошедшие дифференцировку в клетки уротелия. После посева обоих видов клеток скаффолд вместе с клетками содержали в статичных условиях на протяжении 24 часов, после чего всю конструкцию в посуде с питательной средой переносили на роторный шейкер, где конструкцию держали на протяжении 7 дней при скорости вращения шейкера 10 оборотов в минуту. Гистологическое исследование полученных ТИК показало образование многоклеточного слоя из СКМ на одной поверхности целлюлозного матрикса. Несмотря на динамические условия, в которых происходило созревание ТИК, наблюдалось слабое проникновение клеток вглубь матрикса.

В другом исследовании Wu и соавт. использовали аналогичный метод для создания ТИК мочеиспускательного канала на основе матрикса из децеллюляризированной стенки тонкого кишечника свиньи, обработанной 5% раствором надуксусной кислоты [Wu и др., 2011]. Надуксусная кислота, с одной стороны, позволяет добиться максимальной децеллюризации матрикса, а с другой – выступает в качестве порогена, т. е. увеличивает пористость матрикса. Как и в исследовании Bodin и соавт., СКМ, прошедшие дифференцировку в ГМК и клетки уротелия, высевались по очереди на поверхность матрикса с последующим содержанием матрикса в динамических условиях на роторном шейкере в течение 7 дней при скорости вращения шейкера 10 оборотов в минуту. Полученные в результате ТИК характеризовались значительным проникновением клеток вглубь матрикса.

1.7.3 Происхождение стволовых клеток в моче

Изначально предполагалось, что клетки с высоким пролиферативным потенциалом и свойствами стволовых клеток в моче являются базальными клетками переходного эпителия мочевого пузыря [Zhang и др., 2008]. Для проверки

этой гипотезы была получена моча из верхних мочевыводящих путей у пациентов с обструкцией лоханочно-мочеточникового сегмента [Chun и др., 2012]. Из полученной мочи были выделены клетки с такими же характеристиками, как и СКМ. Эти данные опровергли первоначальное предположение и показали, что СКМ имеют почечное происхождение. В ходе дальнейших исследований данная гипотеза нашла свое подтверждение [Bharadwaj и др., 2013]. Так, в СКМ, которые были получены у женщины с пересаженной почкой от мужского донора, присутствовала Y хромосома. Для идентификации конкретного источника СКМ в системе канальцев почек была проведена оценка экспрессии СКМ специфических почечных маркеров. СКМ экспрессировали маркеры эпителиальных клеток париетального и висцерального листков капсулы Шумлянскоо-Боумана: синаптоподин, подоцин и CD146 [Bharadwaj и др., 2013].

1.8 Стволовые клетки в почках

В поисках стволовых клеток, ответственных за регенерацию клеток нефрона, Sagrinati и соавт. описали небольшую субпопуляцию клеток в капсуле Шумлянскоо-Боумана [Sagrinati и др., 2006]. Эти клетки представляли из себя субпопуляцию эпителия париетального листка капсулы Шумлянскоо-Боумана и находились в непосредственной близости от того полюса капсулы, от которого начинается проксимальный каналец нефрона. Клетки экспрессировали маркеры взрослых тканевых стволовых клеток CD24 и CD133. Другими маркерами этих клеток были CD106, маркер клеток капсулы Шумлянскоо-Боумана, CD105, CD54 и CD44. CD133+CD24+ клетки были выделены из капсулы Шумлянскоо-Боумана для исследования в культуре. Они показали высокий пролиферативный потенциал – до 60 удвоений популяции, а также способность к колонеобразованию. Клетки не экспрессировали маркеры эндотелиальных клеток CD31 и CD34. В культуре CD133+CD24+ клетки показали широкий дифференцировочный потенциал. Под воздействием различных факторов CD133+CD24+ клетки капсулы Шумлянскоо-Боумана способны к остеогенной, адипогенной, нейрогенной дифференцировке.

Кроме этого, CD133+CD24+ клетки после 30 дней в культуре, содержащей 50 нг/мл гепатоцитарного фактора роста, приобретали фенотип эпителия канальцев нефрона. В конце периода дифференцировки клетки экспрессировали специфические маркеры эпителия канальцев: щелочную фосфатазу, аквапорин 1 и 3, Na⁺/Cl⁻-транспортер.

1.8.1 Дифферон CD133+CD24+ клеток париетального листка капсулы

Шумлянско-Боумана

Для анализа роли CD133+CD24+ клеток в капсуле Шумлянско-Боумана было проведено иммуногистохимическое исследование коркового вещества почек с использованием флюоресцентных антител против CD133, CD24, а также против маркеров клеток париетального и висцерального листков капсулы Шумлянско-Боумана – подокаликсина (PDX) и нестина [Ronconi и др., 2009]. Клетки висцерального листка капсулы (подоциты) – высокоспециализированные клетки, которые участвуют в образовании фильтрационного барьера. Подоциты – клетки, у которых уже произошел митотический арест, поэтому они не способны к поддержанию своей популяции. По результатам проведенного иммуногистохимического анализа в капсуле Шумлянско-Боумана было обнаружено несколько субпопуляций клеток, распределённых иерархично. CD133+CD24+PDX- клетки находились у мочевого полюса капсулы. Следующие за CD133+CD24+PDX- клетками клетки париетального листка капсулы имели фенотип CD133+CD24+PDX+, и у самого сосудистого полюса капсулы клетки теряли экспрессию маркеров тканевых стволовых клеток CD133 и CD24 и экспрессировали подокаликсин (CD133-CD24-PDX+). Дифференцированные подоциты экспрессировали подокаликсин и нестин. Выделение каждой из этих популяций клеток в культуру также показало, что CD133+CD24+PDX- клетки обладают свойствами стволовых клеток и экспрессируют низкие уровни специализированных маркеров подоцитов, тогда как с потерей экспрессии CD133 и CD24 культуры клеток характеризовались повышением экспрессии маркеров подоцитов – нефрина, WT-1, подоцина. Также между субпопуляциями клеток

различался пролиферативный потенциал. CD133+CD24+PDX- могли содержаться в культуре на протяжении 60 удвоений популяции, тогда как культура CD133-CD24-PDX+ клеток едва могла пережить два пассирования. На основе полученных данных был предположен дифферон CD133+CD24+PDX- клеток в капсуле Шумлянско-Боумана. CD133+CD24+PDX- клетки, расположенные у мочевого полюса, являются стволовыми клетками и ответственны за поддержание клеточного гомеостаза в капсуле Шумлянско-Боумана. По мере продвижения по париетальному листку капсулы к сосудистому полюсу стволовые клетки дифференцируются и теряют свойства стволовых клеток. При потере высокоспециализированных подоцитов для поддержания фильтрационного барьера висцерального листка капсулы предифференцированные клетки сосудистого полюса париетального листка окончательно дифференцируются и замещают потерянные подоциты (рисунок 1.5). Примечательно, что культуры CD133+CD24+PDX- клеток и CD133+CD24+PDX+ клеток под воздействием 100 нМ витамина D3 и 100 мкМ ретиноевой кислоты дифференцировались в подоциты, тогда как только CD133+CD24+PDX- могли дифференцироваться в клетки канальцев нефрона по описанному ранее способу. Таким образом, CD133+CD24+PDX- клетки мочевого полюса капсулы Шумлянско-Боумана являются мультипотентными стволовыми клетками, ответственными за поддержание клеточного гомеостаза клеток париетального и висцерального листков капсулы, а также клеток проксимального канальца нефрона.

1.8.2 Прогениторные клетки канальцев почки

Стволовые клетки париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана с фенотипом CD133+CD24+ ответственны за поддержание клеточной популяции капсулы и предположительно эпителия проксимальных канальцев нефрона [Ronconi и др., 2009]. Однако клетки с похожим фенотипом выделены непосредственно из канальцев нефрона [Angelotti и др., 2012]. Как и стволовые клетки париетального листка они экспрессируют CD133 и CD24, однако, в отличие от клеток капсулы, CD133+CD24+ клетки канальцев нефрона не экспрессируют

CD106. Этот маркер экспрессируется всеми клетками капсулы Шумлянско-Боумана и никогда клетками канальцев почки, поэтому он может быть использован для разделения CD133+CD24+ клеток по их гистологической принадлежности в нефроне. CD133+CD24+ клетки канальцев

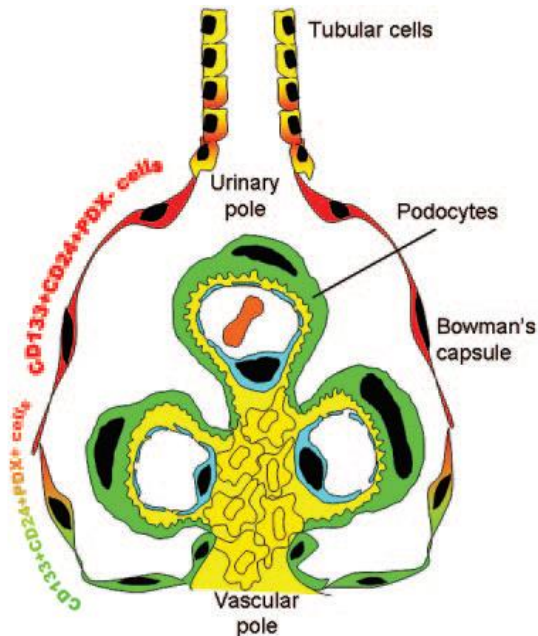


Рисунок 1.5. Схематическое изображение расположения различных клеточных типов в капсуле Шумлянско-Боумана [Ronconi и др., 2009].

почки могут быть выделены для создания культуры клеток, однако их пролиферативный потенциал значительно уступает таковому CD133+CD24+CD106+PDX- клеток. Интересно, как уже было отмечено выше, CD133+CD24+CD106+PDX- клетки капсулы Шумлянско-Боумана могут дифференцироваться как в подоциты, так и в клетки канальцев почки в культуре, то есть являются мультипотентными. Тогда как CD133+CD24+CD106- клетки канальцев могут дифференцироваться только в клетки канальцев почки. Гистологические исследования показали, что CD133+CD24+CD106- клетки располагаются редко среди других клеток эпителия канальцев. CD133+CD24+CD106- клетки были названы прогениторными клетками канальцев почки. Считается, что они ответственны за поддержание целостности эпителия

канальцев. Учитывая эти данные, была предложена следующая система прогениторных клеточных типов нефрона. CD133+CD24+CD106+PDX- клетки у мочевого полюса капсулы Шумлянско-Боумана ответственны за поддержание клеточной популяции капсулы и эпителия проксимальных канальцев, тогда как CD133+CD24+CD106- клетки канальцев поддерживают целостность эпителия канальцев на всем его протяжении (рисунок 1.6).

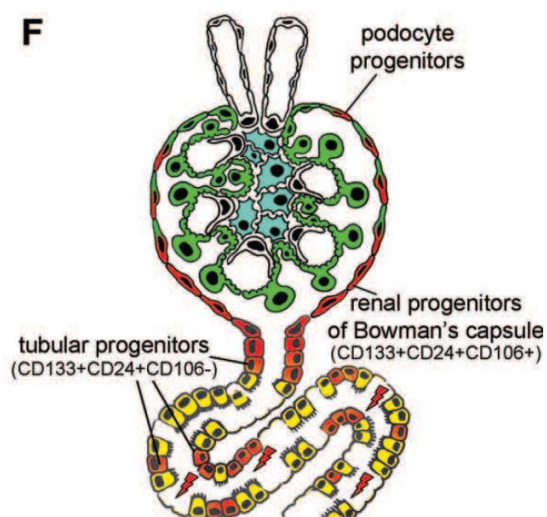


Рисунок 1.6. Схематическое изображение расположения прогениторных клеток в различных отделах нефрона [Angelotti и др., 2012].

1.8.3 Стволовые клетки капсулы Шумлянско-Боумана в моче

Наличие стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана было описано в моче детей с различными нефропатиями [Lazzeri и др., 2015]. Интересно, что в моче здоровых детей стволовых клеток капсулы обнаружено не было. Частота встречаемости пролиферирующих стволовых клеток в моче была 33% среди всех детей с нефропатиями и 51% среди детей, у которых наблюдалась протеинурия. 28%-70% всех выделенных пролиферирующих клеток составили CD133+CD24+ клетки. Анализ 472 РНК и 168 микроРНК CD133+CD24+ клеток, выделенных из мочи и стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана показали практически идентичные транскриптомы двух типов клеток. Кроме этого, CD133+CD24+

клетки, выделенные из мочи, экспрессировали CD106, который также является обязательным маркером стволовых клеток париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана. Под воздействием дифференцировочных факторов для столовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана CD133+CD24+ клетки из мочи дифференцировались в подоциты, что было подтверждено экспрессией маркеров подоцитов (синаптоподин, нефрин и подоцин), а также фенотипическими изменениями, аналогичными для дифференцировки стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии в моче детей с нефропатиями стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение и культивирование стволовых клеток из мочи

Выделение и культивирование СКМ производилось по протоколу, описанному ранее [Zhang и др., 2008], с некоторыми модификациями. Так из состава среды для культивирования СКМ был исключен холерный токсин. Также, в данном разделе процесс выделения и культивирования клеток описан значительно более детально в сравнении с опубликованными протоколами, так как, по результатам множества попыток выделения СКМ, оказалось, что некоторые неописанные в статьях шаги при выделении клеток оказались принципиальными для получения культур СКМ.

Состав среды для культивирования СКМ

Среда для культивирования СКМ состояла из бессывороточной среды для кератиноцитов с добавками (10 нг/мл эпидермальный фактор роста [EGF] и 50 мкг/мл экстракт бычьего гипофиза [BPX], Gibco™, арт. 17005042) и среды для прогениторных клеток в отношении 1:1. Среду для прогениторных клеток изготавливали на основе среды DMEM/F12 (Gibco™, арт. 31331093) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone™, арт. SH30071.03), 0,4 мкг/мл гидрокортизона (Sigma-Aldrich, арт. H0888), 1% добавки инсулин-трансферрин селен (Gibco™, арт. 41400045), 24,3 мкг/мл аденина (Sigma-Aldrich, арт. A8626) и $1,35 \cdot 10^{-3}$ нг/мл 3,3',5-трийодо-L-тиронины (Sigma-Aldrich, арт. T6397). Бессывороточную среду для кератиноцитов и среду для прогениторных клеток смешивали в стерильной бутылке в отношении 1:1. В целях профилактики контаминации культур клеток в среду для культивирования СКМ добавляли 1% раствора пенициллина-стрептомицина (Sigma-Aldrich, арт. P4333).

Выделение стволовых клеток из мочи

Выделение СКМ было произведено из мочи 6 здоровых добровольцев в возрасте от 21 до 57 лет. Для выделения клеток от каждого добровольца было получено $250 \pm 45,6$ мл мочи (таблица 2.1). Перед сдачей мочи для выделения

стволовых клеток каждый доброволец дал информированное согласие на возможность использования его/ее мочи для выделения из клеток и проведения, запланированных в рамках данной диссертационной работы, экспериментов с выделенными клетками. Выделение клеток из мочи производили не позднее, чем через 2 часа после сбора образцов мочи.

Таблица 2.1. Характеристика здоровых добровольцев, моча которых использовалась для выделения СКМ.

Донор	Пол	Возраст	Объем мочи в образце, мл	Количество живых клеток на 1 мл мочи	Количество клонов СКМ на 100 мл мочи
Доброволец 1	М	27	300	$7,0 \times 10^3$	10
Доброволец 2	М	33	250	$1,6 \times 10^4$	7
Доброволец 3	М	57	220	$2,7 \times 10^4$	20
Доброволец 4	М	21	310	$1,0 \times 10^3$	0
Доброволец 5	Ж	21	200	$0,7 \times 10^3$	0
Доброволец 6	М	52	220	$1,5 \times 10^4$	12

Протокол выделения стволовых клеток из мочи

Для выделения клеток мочу из контейнера в стерильных условиях переносили в 50 мл пробирки для центрифугирования при 500g в течение 5 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость собирали аспиратором, до 1-2 мл остатка вместе с осадком из клеток. К оставшейся части жидкости с осадком добавляли ~5мл натрий-фосфатного буфера Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) и перемешивали все содержимое пробирки. Если на образец мочи приходилось более одной 50 мл пробирки, содержимое всех пробирок после забора надосадочной жидкости переносили в одну, а затем с помощью DPBS доводили объем жидкости в пробирке до 50 мл. Пробирку с DPBS и содержимым всех осадков от образца мочи центрифугировали при 500g в течение 5 минут, после чего надосадочную жидкость отбирали аспиратором. Оставшийся в пробирке осадок суспендировали в 1 мл среды для культивирования СКМ, производили измерение количества клеток в образце, после чего доводили объем в пробирке с

клетками до 24 мл и переносили содержимое пробирки в 24-х луночный культуральный планшет по 1 мл в лунку. Культивирование клеток производили в инкубаторе с влажной атмосферой, 5% CO₂ и температурой 37 °С. Общее количество живых клеток в моче варьировало от $0,7 \times 10^3$ до $2,7 \times 10^4$ клеток на 1 мл мочи (таблица 2.1).

Культивирование СКМ

Первую смену среды проводили через 3 дня после выделения клеток. В каждой лунке 24-х луночного культурального планшета меняли 2/3 объема среды. Затем среду меняли каждые 2 дня в полном объеме (1 мл на лунку). Культуральные планшеты инспектировали каждый день с помощью светового инвертированного микроскопа на предмет наличия делящихся клеток. После того, как колония делящихся клеток заполняла от ~20% поверхности лунки, клетки пересевали в 6-ти луночные культуральные планшеты. Клетки с одной лунки 24-х луночного планшета пересевали в одну лунку 6-ти луночного планшета. В дальнейшем культуры клеток велись отдельно в соответствии с лунками 24-х луночного планшета. Количество СКМ в образцах составило от 0 до 20 колониеобразующих единиц на 100 мл мочи (таблица 2.1). Так как, как правило, при выделении клеток из мочи в одну лунку попадало не более одной клетки, способной к пролиферации, разделение клеток по исходным лункам 24-х луночного планшета позволяло вести культуры СКМ как клоны клеток. После достижения ~70% конфлюентности в лунке 6-ти луночного планшета культуры клеток пересевали в культуральные чашки 100 мм в диаметре. Дальнейшее культивирование проводили в следующем режиме: смена среды каждые два дня, пересев при достижении ~70% конфлюентности в чашке (рисунок 2.1). Для пересева культур использовался 0,05% раствора трипсина с EDTA.

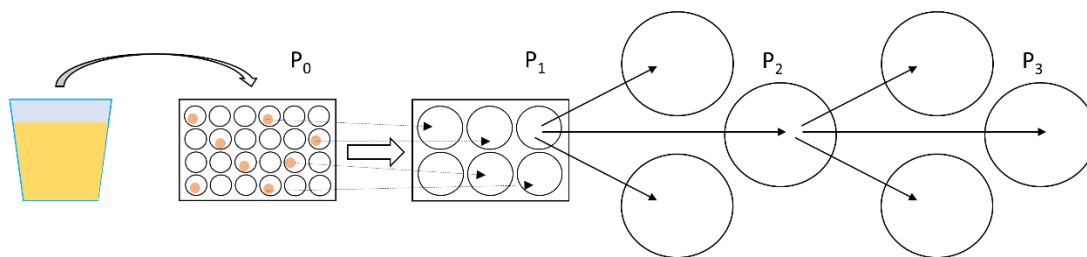


Рисунок 2.1. Схема выделения СКМ из мочи и последующее культивирование.

2.2 Характеристика СКМ

2.2.1 Определение свойств культуры СКМ

Определение пролиферативной активности СКМ

Определение пролиферативной активности СКМ проводили через оценку количества удвоений популяции культуры СКМ и времени удвоения популяции. Для определения количества удвоений популяции культуру клеток СКМ первого пассажа при достижении ~90% конфлюентности лунки 6-ти луночного культурального планшета собирали с поверхности лунки с помощью раствора трипсина с EDTA и считали количество клеток с помощью автоматического клеточного счетчика Countess™, затем клетки пересевали в культуральные чашки для дальнейшего культивирования. При достижении ~90% конфлюентности в 100 мм чашках клетки пересевались в соотношении 1/3, каждый раз считая количество клеток после снятия с культуральных чашек. Клетки по описанному выше методу культивировали до вырождения культуры, т. е. до остановки ее роста. После этого клетки собирали с культуральной чашки для подсчета их количества и проводили вычисление количества удвоений популяции и времени удвоения популяции для каждого клона.

Количество удвоений популяции (population doublings – PD)

$$= \log_2(\text{общее число клеток на время остановки роста культуры})$$

Среднее время удвоения популяции (doubling time – DT)

$$= \frac{PD}{\text{время от выделения СКМ из мочи до вырождения культуры}}$$

2.2.2 Оценка экспрессии поверхностных маркеров СКМ

Для оценки профилей экспрессии СКМ поверхностных маркеров были использованы проточный цитофлуориметр BD Accuri™ C6, BD Biosciences и клеточный сортер MoFlo™ XDP, Beckman Coulter. Было проведено стандартное флюоресцентное окрашивание с использованием антител к специфическим поверхностным маркерам, конъюгированных с флюоресцентными метками. Список антител приведен в таблице 2.2. Для проточной цитометрии были использованы СКМ 1 пассажа в количестве 3 – 5 x 10⁵ клеток.

Таблица 2.2. Антитела, использованные для оценки профилей экспрессии СКМ поверхностных маркеров.

Антитела	Производитель
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против CD73	BD Pharmingen™ (арт. 550257)
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против CD90	BD Pharmingen™ (арт. 555596)
Мышиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD105	BD Pharmingen™ (арт. 561443)
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против CD29	eBioscience™ (арт. 12-0291-82)
Мышиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD34	eBioscience™ (арт. 11-0349-41)
Крысиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD44	eBioscience™ (арт. 11-0441-82)
Мышиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD45	eBioscience™ (арт. 11-0459-42)
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против CD54	eBioscience™ (арт. BMS108FI)
Мышиные моноклональные Alexa-конъюгированные против SSEA4	eBioscience™ (арт. 53-8843-41)
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против CD106	BD Pharmingen™ (арт. 561679)
Мышиные моноклональные APC-конъюгированные против CD133	BD Pharmingen™ (арт. 566597)
Мышиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD44	BD Pharmingen™ (арт. 560977)
Мышиные моноклональные FITC-конъюгированные против CD24	BD Pharmingen™ (арт. 560977)
Мышиные моноклональные PE-конъюгированные против подокаликсина	eBioscience™ (арт. 12-8873-41)

2.3 Выделение клеток уротелия и ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря

Для выделения клеток уротелия и ГМК был использован стандартизованный протокол института регенеративной медицины Уэйк-Форест, Уинстон-Салем,

США. Так как данный протокол не был опубликован ранее, в данной работе он приводится в деталях.

Список материалов и оборудования

- 1) Кадаверный материал мочевого пузыря размером не менее 1x1 см;
- 2) Чашки Петри диаметром 150 мм и 100 мм, Corning®;
- 3) Стерильные хирургические ножницы, пинцет, скальпель;
- 4) Раствор OptiPrep™ (60% йодиксанол в воде), Sigma-Aldrich (арт. D1556);
- 5) Бессывороточная среда для кератиноцитов с добавками (10 нг/мл эпидермального фактора роста и 50 мкг/мл экстракта бычьего гипофиза), Gibco™ (арт. 17005042);
- 6) Бессывороточная среда для кератиноцитов без добавок, Gibco™ (арт. 17005042);
- 7) Среда DMEM с добавкой GlutaMAX™ и высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л, Gibco™ (арт. 61965026);
- 8) Фетальная телячья сыворотка (FBS), Hyclone™ (арт. SH30071.03) / Gibco™ (арт. 16000044) / Sigma-Aldrich (арт. F2442);
- 9) Раствор гентамицина (50 мг/мл), Gibco™ (арт. 15750037);
- 10) Фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (DPBS), Hyclone™ (арт. SH30028.02);
- 11) Культральный матрас Falcon® площадью 25 см²;
- 12) Культуральные чашки диаметром 100 мм, Corning® (арт. 430167);
- 13) Раствор поли-L-лизина (10 мг/мл), ScienceCell™ (арт. 0413).

Кадаверный материал мочевого пузыря был получен от клинического центра регенеративной медицины института регенеративной медицины Уэйк-Форест, Уинстон-Салем, США.

2.3.1 Выделение клеток уротелия из биопсийного материала мочевого пузыря

Подготовка к работе

Перед началом работы необходимо приготовить следующие растворы:

- 1) Раствор для отмывания образца 1 – DPBS с 50 мкг/мл гентамицина;

- 2) Раствор для отмывания образца 2 – DPBS с 5 мкг/мл гентамицина;
- 3) 50% раствор OptiPrep™ в бессывороточной среде для кератиноцитов без добавок (конечная концентрация йодиксанола – 30%);

Обработать культральный матрас с помощью 5 мл 10 мкг/мл раствором поли-L-лизина в стерильной воде в течение часа, после чего трижды отмыть раствор с помощью DPBS (продолжительность каждой отмывки – 5 минут).

Протокол выделения клеток уротелия из биопсийного материала мочевого пузыря

- 1) Проинспектировать кадаверный материал мочевого пузыря, с помощью ножниц удалить остатки жировой ткани;
- 2) Поместить материал в пробирку для центрифугирования объемом 50 мл;
- 3) Добавить раствор для отмывания образца 1, инкубировать при комнатной температуре в течение 20 минут;
- 4) Переместить материал в новую пробирку для центрифугирования объемом 50 мл;
- 5) Добавить раствор для отмывания образца 2, инкубировать при комнатной температуре в течение 20 минут;
- 6) С помощью пинцета поместить материал в чистую чашку Петри диаметром 150 мм;
- 7) Отделить слой уротелия от биопсийного материала с помощью ножниц и пинцета, переместить слой оставшейся гладкомышечной ткани к краю чашки Петри;
- 8) Переместить отделенный слой уротелия в новую чашку Петри диаметром 100 мм;
- 9) Добавить 3,5 мл бессывороточную среду для кератиноцитов без добавок в чашку Петри с уротелием;
- 10) Отделить клетки уротелия с помощью осторожного их соскребания с помощью лезвия скальпеля, держа слой уротелия пинцетом. Продолжать

соскребать клетки, пока ткань не побледнеет, а среда не станет мутной из-за суспендированных в ней клеток;

- 11) Поместить использованный слой уротелия на край чашки Петри;
- 12) Тщательно перемешать клетки в 3,5 мл среды в чашке с помощью серологической пипетки;
- 13) Переместить среду с клетками в пробирку для центрифугирования объемом 15 мл, добавить бессывороточную среду для кератиноцитов без добавок до общего объема в пробирке 5 мл;
- 14) В новую пробирку для центрифугирования добавить 5 мл 50% раствора OptiPrep™;
- 15) В пробирку с 50% раствора OptiPrep™ переместить 5 мл суспензии клеток уротелия, закрыть, перемешать жидкости инвертированием пробирки;
- 16) Сверху осторожно добавить 1 мл бессывороточную среду для кератиноцитов без добавок так, чтобы была видна интерфаза между жидкостями;
- 17) Не перемешивая содержимое, закрыть пробирку и осторожно поместить ее в центрифугу;
- 18) Центрифугировать в течение 15 минут при 800g с минимальной скоростью остановки центрифуги;
- 19) Осторожно изъять пробирку из центрифуги, клетки уротелия должны находиться между слоями жидкостей;
- 20) Осторожно собрать клетки уротелия, находящиеся между слоями жидкости, с помощью микропипетки и поместить их в новую пробирку для центрифугирования объемом 50 мл;
- 21) Добавить не менее 10 мл бессывороточной среды для кератиноцитов без добавок, закрыть пробирку, хорошо перемешать содержимое;
- 22) Центрифугировать пробирку в течение 5 минут при 300g;

- 23) Отобрать супернатант, добавить 5 мл бессывороточной среды для кератиноцитов с добавками, перемешать;
- 24) Перенести суспензию клеток в культуральный матрас площадью 25 см², покрытый поли-L-лизинном, поместить матрас с клетками в инкубатор;
- 25) Первая смена среды через 1-2 дня, в дальнейшем смена среды должна осуществляться каждые 2-4 дня, пересев клеток при достижении ~70% конфлюентности.

2.3.2 Выделение ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря

Протокол выделения ГМК из кадаверного материала мочевого пузыря

- 1) Протокол выделения клеток уротелия из кадаверного материала мочевого пузыря пункты 1) – 7) (п. 2.3.1.);
- 2) Переместить слой гладкомышечной ткани в чистую чашку Петри диаметром 100 мм;
- 3) С помощью ножниц и скальпеля размельчить слой гладкомышечной ткани до фрагментов 1-2 мм².
- 4) С помощью пинцета поместить 15 – 20 фрагментов гладкомышечной ткани в чистую культуральную чашку диаметром 100 мм, равномерно разместив фрагменты по культуральной поверхности;
- 5) Накрыть чашки крышкой и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре, чтобы фрагменты прикрепились к культуральной поверхности чашки;
- 6) По истечению времени инкубации добавить в чашку среду DMEM с 10% содержанием FBS в объеме 10 мл, поместить культуральный матрас в инкубатор;
- 7) Первая смена среды через 1-2 дня, в дальнейшем смена среды должна осуществляться каждые 2-4 дня, пересев клеток при достижении ~90% конфлюентности. Открепившиеся от поверхности фрагменты ткани необходимо удалять из чашки.

2.4 Иммуноцитохимическое окрашивание клеток уротелия и ГМК

Для оценки экспрессии внутриклеточных маркеров было проведено стандартное не прямое иммуноцитохимическое окрашивание клеток уротелия и ГМК с использованием первичных антител против внутриклеточных маркеров и вторичных антител, конъюгированных с флюоресцентной меткой. Список антител приведен в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Антитела, использованные для оценки экспрессии внутриклеточных маркеров клеток уротелия и ГМК.

Антитела	Производитель
Первичные антитела	
Мышиные моноклональные против цитокератина CK AE1/AE3	Invitrogen™ (арт. MA5-13156)
Мышиные моноклональные против CK 7	Invitrogen™ (арт. MA1-06316)
Мышиные моноклональные против CK 13	Invitrogen™ (MA5-12135)
Кроличьи поликлональные против CK 20	Invitrogen™ (арт. PA5-22125)
Кроличьи поликлональные против уроплакина III (uroplakin III, Upk III)	abcam (арт. ab187299)
Мышиные моноклональные против α -SMA	eBioscience™ (арт. 14-9760-80)
Кроличьи моноклональные против десмина	abcam (арт. ab32362)
Мышиные моноклональные против кальпонины	Invitrogen™ (арт. MA5-11620)
Вторичные антитела	
Лошадиные FITC-конъюгированные против мышиных антител	Vector Laboratories (арт. FI-2000)
Лошадиные FITC-конъюгированные против кроличьих антител	Vector Laboratories (арт. FI-1000)
Лошадиные TR-конъюгированные против кроличьих антител	Vector Laboratories (арт. TI-1000)

2.5 Дифференцировка СКМ в ГМК

2.5.1 Изготовление среды для дифференцировки СКМ в ГМК

Состав среды для дифференцировки СКМ в ГМК

Среда для дифференцировки СКМ в ГМК состояла из среды для прогениторных клеток (п.2.1) и среды DMEM (Gibco™, арт. 61965026) в отношении 1:1 с общим содержанием сыворотки 5% и с добавлением 5 нг/мл рекомбинантного человеческого тромбоцитарного фактора роста ВВ (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB, Gibco™, арт. PHG0045) и 2,5 нг/мл рекомбинантного человеческого

трансформирующего фактора роста β -1 (transforming growth factor β -1, TGF β -1, Gibco[™], арт. PHG9204).

2.5.2 Протокол дифференцировки СКМ в ГМК

Для дифференцировки в ГМК использовались СКМ второго пассажа. СКМ суспендировали в среде для дифференцировки в ГМК, суспензию клеток переносили в культуральную посуду в количестве 500-1500 клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки содержали в среде для дифференцировки в ГМК в течение 10 дней без пассирования с заменой среды каждые два дня. Для поддержания активности факторов роста PDGF-BB и TGF β -1 добавляли непосредственно перед использованием среды.

2.5.3 Изготовление среды для дифференцировки СКМ в клетки уротелия

Состав среды для дифференцировки СКМ в клетки уротелия

Среда для дифференцировки СКМ в клетки уротелия состояла из среды для прогениторных клеток (п.2.1) и среды KSFM (Gibco[™], арт. 17005042) в отношении 1:4 с общим содержанием сыворотки 2% и с добавлением рекомбинантного человеческого эпидермального фактора роста (epithelial growth factor, EGF, Gibco[™], арт. PHG0311L) концентрации 30 нг/мл.

2.5.4 Протокол дифференцировки СКМ в клетки уротелия

Для дифференцировки в клетки уротелия использовались СКМ второго пассажа. СКМ суспендировали в среде для дифференцировки в клетки уротелия, суспензию клеток переносили в культуральную посуду в количестве 1000-3000 клеток на 1 см² культуральной поверхности. Клетки содержали в среде для дифференцировки в клетки уротелия в течение 10 дней без пассирования с заменой среды каждые два дня. Для поддержания активности фактора роста EGF добавляли непосредственно перед использованием среды.

2.5.5 Оценка результатов дифференцировки СКМ в ГМК и клетки уротелия с помощью иммуноцитохимического окрашивания

Для оценки эффективности дифференцировки проводили оценку экспрессии маркеров ГМК и клеток уротелия с помощью иммуноцитохимического окрашивания. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили как описано в п. 2.4., с использованием первичных антител против СК AE1/AE3, СК 7 и СК 13 для оценки дифференцировки в клетки уротелия и антител к α -SMA, десмину и кальпонию для оценки дифференцировки в ГМК. В качестве отрицательного контроля экспрессии маркеров дифференцировки использовались СКМ второго пассажа, не прошедшие протокол дифференцировки. СКМ второго пассажа высевались на лунки 24-х луночного планшета в концентрации 5000-15000 клеток на 1 см² культуральной поверхности в среде для культивирования СКМ. На следующей день в лунках планшета проводили иммуноцитохимическое окрашивание. В качестве положительного контроля экспрессии маркеров дифференцировки использовались культуры ГМК и клеток уротелия. Дифференцировка СКМ и последующее иммуноцитохимическое окрашивание проводилось также в 24-х луночных планшетах. Для учета фенотипических различий между разными клонами СКМ в дифференцировке использовались те же клоны СКМ, что и для отрицательного контроля. Для статистического анализа результаты экспрессии маркеров дифференцировки агрегировались на уровне клонов.

2.6 Оценка уровня экспрессии маркеров дифференцировки с помощью компьютерного анализа изображений флуоресцентной микроскопии

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия культур клеток после иммуноцитохимического окрашивания проводилась на микроскопе высокой пропускной способности IN Cell Analyzer 2000 (General Electric). 24-х луночные планшеты с культурами клеток после иммуноцитохимического окрашивания

переносили в микроскоп IN Cell Analyzer 2000, и каждая лунка с культурой клеток автоматически фотографировалась микроскопом в нескольких полях при одних значениях интенсивности лазера, экспозиции и увеличении. В дальнейшем с помощью специального программного обеспечения изображения автоматически анализировались на уровень интенсивности флюоресценции маркера в каждой клетке изображения. Уровень интенсивности флюоресценции каждого маркера рассчитывали, как средний уровень интенсивности флюоресценции в клетках в лунке.

Статистический анализ

Для оценки экспрессии каждого маркера использовались 5 различных клонов СКМ. Количественные данные интенсивности флуоресценции, полученные после анализа изображений, были обработаны с помощью программного пакета для обработки данных R ver. 3.3.2 для получения средних значений интенсивности флюоресценции в клетках в лунке для каждого маркера и для каждого клона СКМ и культур положительного контроля. Затем рассчитывали относительный средний уровень интенсивности флюоресценции для каждого маркера и для каждого клона СКМ с помощью следующей формулы:

$$E_i = \frac{I_i - I_{NC}}{I_{PC} - I_{NC}} * 100\%,$$

где I_i — среднее значение интенсивности флюоресценции для клона i СКМ, I_{NC} — среднее значение интенсивности флюоресценции отрицательного контроля (в качестве отрицательного контроля использовалось значение флюоресценции клеток, инкубированных только со вторичными антителами), I_{PC} — среднее значение флюоресценции положительного контроля (для маркеров клеток уротелия, в качестве положительного контроля использовалась культура клеток уротелия, для гладкомышечных маркеров использовалась культура ГМК).

После расчета относительных средних значений интенсивности флюоресценции производили расчет относительного изменения интенсивности флюоресценции после дифференцировки по следующей формуле:

$$\Delta E_i = \left(\frac{E_i \text{ после дифференцировки}}{E_i \text{ до дифференцировки}} - 1 \right) * 100\%$$

Относительные средние значения интенсивности флюоресценции для каждого маркера и каждого клона СКМ, а также относительные изменения интенсивности флюоресценции после дифференцировки представлены с помощью гистограмм. Описательная статистика относительной интенсивности флюоресценции для каждого маркера и для каждого клона СКМ, а также относительные изменения интенсивности флюоресценции после дифференцировки приведены с использованием медианы и минимального–максимального значений (Me [мин.–макс.]). Статистическое сравнение уровней экспрессии каждого маркера до и после дифференцировки проводили с использованием значений относительных изменений интенсивности флюоресценции в клонах СКМ с помощью парного теста Стьюдента. В качестве программного обеспечения для статистического анализа и построения гистограмм использовались R ver. 3.3.2 и Microsoft Excel 16.0.

2.7 Оценка жизнеспособности СКМ в составе ТИК

2.7.1 Заселение скаффолда на основе коллагена СКМ человека

Протокол заселения биоматериала ССС

20 мкл среды для культивирования СКМ, содержащей СКМ второго пассажа в количестве 5×10^3 клеток, или 20 мкл DMEM с 10% FBS, содержащей 5×10^3 человеческих фибробластов кожи (линия человеческих фибробластов кожи была предоставлена лабораторией передовых клеточных технологий Научно-технологического парка биомедицина Первого МГМУ им. И.М. Сеченова), равномерно наносили на образцы пленки толщиной 20 мкм и площадью $1,96 \text{ см}^2$ на основе коллагена I типа, полученного из коровьей кожи (collagen cell carrier, ССС, Viscofan Bioengineering), находящийся в лунках 24-х луночного культурального планшета, после чего пленку с клетками оставляли на 1 час для адгезии клеток. По

истечении 1 часа добавляли 1 мл среды для культивирования СКМ / DMEM с 10% FBS. Замену среды проводили каждые 2 суток.

2.7.2 Оценка жизнеспособности СКМ в составе ТИК

Протокол оценки жизнеспособности СКМ

Оценку жизнеспособности СКМ и фибробластов в составе тканеинженерной конструкции проводили на 5, 10 сутки культивирования СКМ на образцах пленки из коллагена ССС в 24-х луночных планшетах (п. 2.7.1). Для оценки жизнеспособности клеток проводили смену питательной среды на раствор Хэнкса с Ca^{2+} , Mg^{2+} (Thermo Fisher Scientific, США) в количестве 900 мкл/лунка с добавлением 100 мкл/лунка реагента PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 30 мин в CO_2 -инкубаторе. Измерение поглощения проводили при длине волны 540 нм с референсом 630 нм на планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Фоновое значение учитывали добавлением раствора Хэнкса с Ca^{2+} , Mg^{2+} . На каждой временной точке проводили 3 повтора оценки жизнеспособности.

Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность (\%)} = \left[\frac{A(540 - 630)_{\text{образец}} - A(540 - 630)_{\text{ср. знач. фон среды}}}{A(540 - 630)_{\text{ср. знач. контроль}} - A(540 - 630)_{\text{ср. знач. фон среды}}} \right] \times 100\%$$

В качестве значения контроля использовалось значение поглощения культуры клеток соответствующего типа, достигшего монослоя в лунке.

2.7.3 Оценка жизнеспособности СКМ в составе тканеинженерной конструкции с помощью Live/Dead системы

Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием набором красителей Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы клеток помещали в раствор 80% глицерина в PBS, накрывали покровным стеклом и визуализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выделение и культивирование СКМ

Первые клоны делящихся клеток были выявлены через 4-5 дней после выделения клеток из мочи (рисунок 3.1А). Динамика роста колоний СКМ значительно варьировала от клона к клону. К третьему пассажу (после 20-22 удвоений популяции) время удвоения популяции для культур СКМ составило $1,44 \pm 0,528$ суток ($n=4$). Регрессионный анализ для кривых роста четырех колоний СКМ показал степенную зависимость роста культуры СКМ с функцией зависимости количества клеток от времени $f(t) = 2^{0,7409t}$, таким образом, время удвоения популяции на основании нелинейной регрессии составило $1/0,7409 = 1,350$ суток (рисунок 3.1Б). Для оценки общего возможного времени содержания в культуре четыре клон СКМ третьего пассажа в количестве 45000 клеток были взяты для культивирования до вырождения культуры с заменой среды каждые два дня и пассированием культуры при достижении ~90% монослоя (таблица 3.1, рисунок 3.1В). Общее количество удвоений популяции для клонов СКМ с момента выделения клеток до вырождения культуры составило $32,4 \pm 5,50$. По мере нахождения клонов СКМ в культуре было отмечено заметное увеличение времени удвоения популяции после 4-5-го пассажа. К моменту вырождения культуры СКМ заметно изменяли свою морфологию: отмечалось значительное увеличение размеров клеток (рисунок 3.2).

Таблица 3.1. Время удвоения популяции в зависимости от пассажа для 4 клонов СКМ

	Время удвоения популяции на пассаже 3 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 4 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 5 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 6 (дни)	Время удвоения популяции на пассаже 7 (дни)	Количество удвоений популяции (с нулевого пассажа)
Клон 2I243-104-D2	0,92	1,32	0,95	1,69	3,31	40,5
Клон I243-114-A3	1,57	2,71	7,50			30,4
Клон I273-124-C1	1,71	3,44				28,3
Клон I313-173-B3	2,43	1,92	9,21			30,3
Среднее $\pm$ СО	$1,66 \pm 0,619$	$2,35 \pm 0,924$	$5,89 \pm 4,360$			$32,4 \pm 5,50$

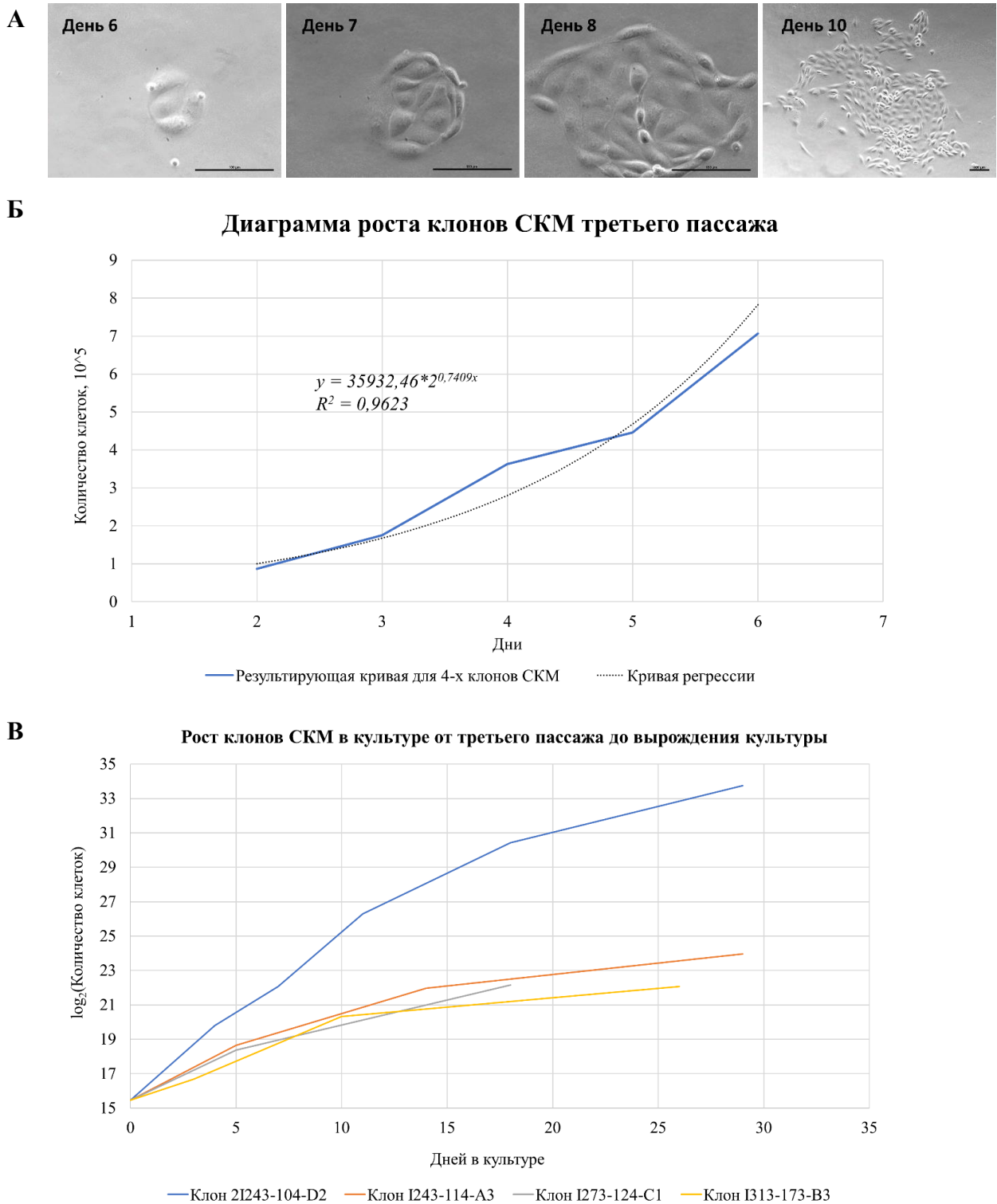


Рисунок 3.1. А. Рост клона СКМ в культуре, световая микроскопия; Б. результирующая кривая роста четырех клонов третьего пассажа в культуре на протяжении 6 дней и уравнение регрессии, определяющее динамику роста культуры; В. график роста четырех клонов СКМ в культуре начиная с 3-го пассажа (после ~22 удвоений популяции клона).

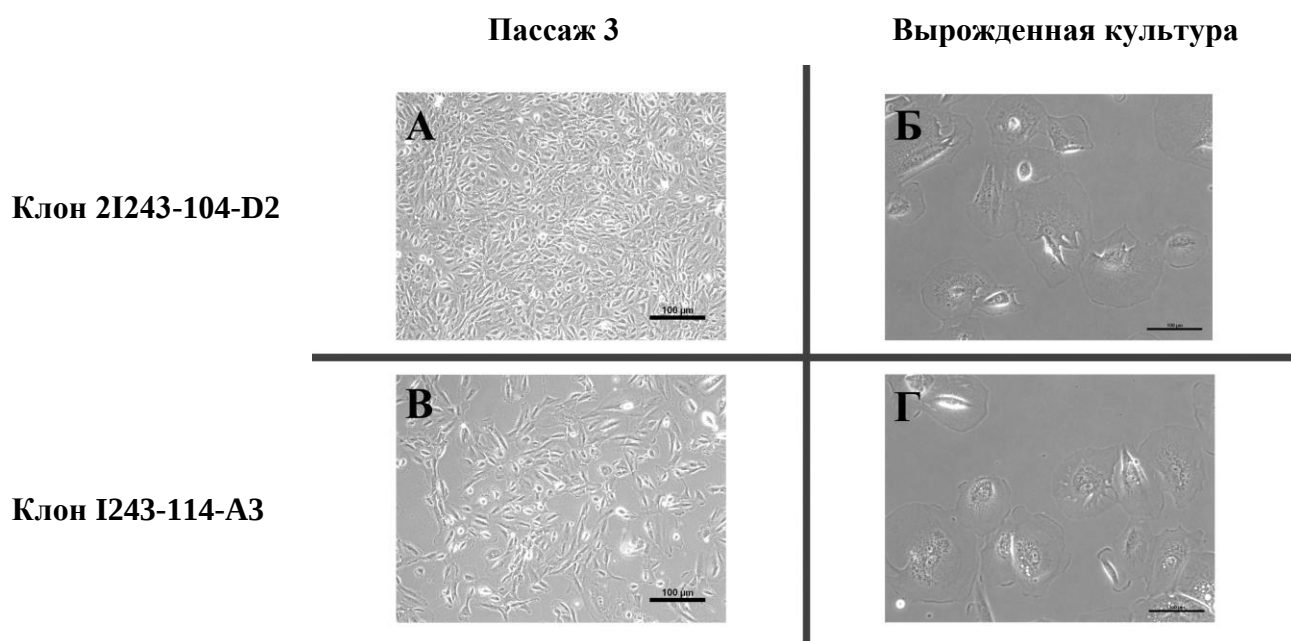


Рисунок 3.2. Микрофотографии культуры клонов СКМ на пассаже 3 (А, В) и после вырождения культуры (Б, Г).

Обсуждение

СКМ обладают хоть и вариабельным, но в целом быстрым ростом в культуре. С учетом полученных в настоящей работе данных о скорости роста культуры можно рассчитать, что в среднем один клон СКМ достигает 4 000 000 клеток к 18 дню со дня выделения клеток из мочи, что соответствует концу второго пассажа и 22 удвоениям популяции. Учитывая, что в среднем на 100 мл мочи приходится 8 клонов СКМ, получается, что к 18 дню после выделения клеток из 100 мл мочи можно получить ~32 000 000 СКМ, способных еще к 10 удвоениям популяции. Таким образом, несмотря на то, что количество клонов СКМ в моче крайне мало, методы культивирования позволяют получить с одного образца мочи достаточное количество клеток СКМ для использования в различных целях, в том числе в тканевой инженерии.

3.2 Проточная цитометрия и иммуноцитохимическое окрашивание для первичной оценки фенотипа СКМ

Для оценки фенотипа выделенных клеток как СКМ были использованы маркеры различных тканеспецифичных стволовых клеток взрослого организма,

экспрессия которых СКМ была описана в литературе: маркеры МСК CD73, CD90, CD105, маркеры гематопозитических стволовых клеток CD34 и CD45, а также другие поверхностные маркеры CD29, CD44 и CD54 и описанный для эмбриональных стволовых клеток маркер SSEA4. Для данного анализа были использованы четыре различных клона СКМ. СКМ показали средний уровень экспрессии маркеров МСК (Ме [мин - макс]): CD73 — 79,8% [67,5% – 99,2%], CD90 — 56,6% [10,2% – 99,6%], CD105 — 40,7% [25,7% – 74,2%] (рисунок 3.3А–В). Экспрессия маркеров гематопозитических стволовых клеток отсутствовала: CD34 <1,0% и CD45 <2,0% (рисунок 3.3Г, Д). СКМ показали высокий уровень экспрессии маркеров CD29 (>99,0%), CD44 (>99,0%), CD54 — (97,7% [95,5% – 99,0%]) (рисунок 3.3Е–З). Также была показана положительная экспрессия СКМ маркера эмбриональных столовых клеток SSEA4 (рисунок 3.3И). Результаты проточной цитометрии СКМ представлены в таблице 3.2.

Для оценки эпителиальной природы СКМ было проведено иммуноцитохимическое окрашивание культуры клеток СКМ для оценки экспрессии внутриклеточных маркеров, характерных для эпителиальных клеток – цитокератинов и протеина плотных контактов ZO-1. Окрашивание показало наличие обоих этих маркеров эпителиальных клеток в культуре СКМ, таким образом, подтвердив эпителиальное происхождение СКМ (рисунок 3.4).

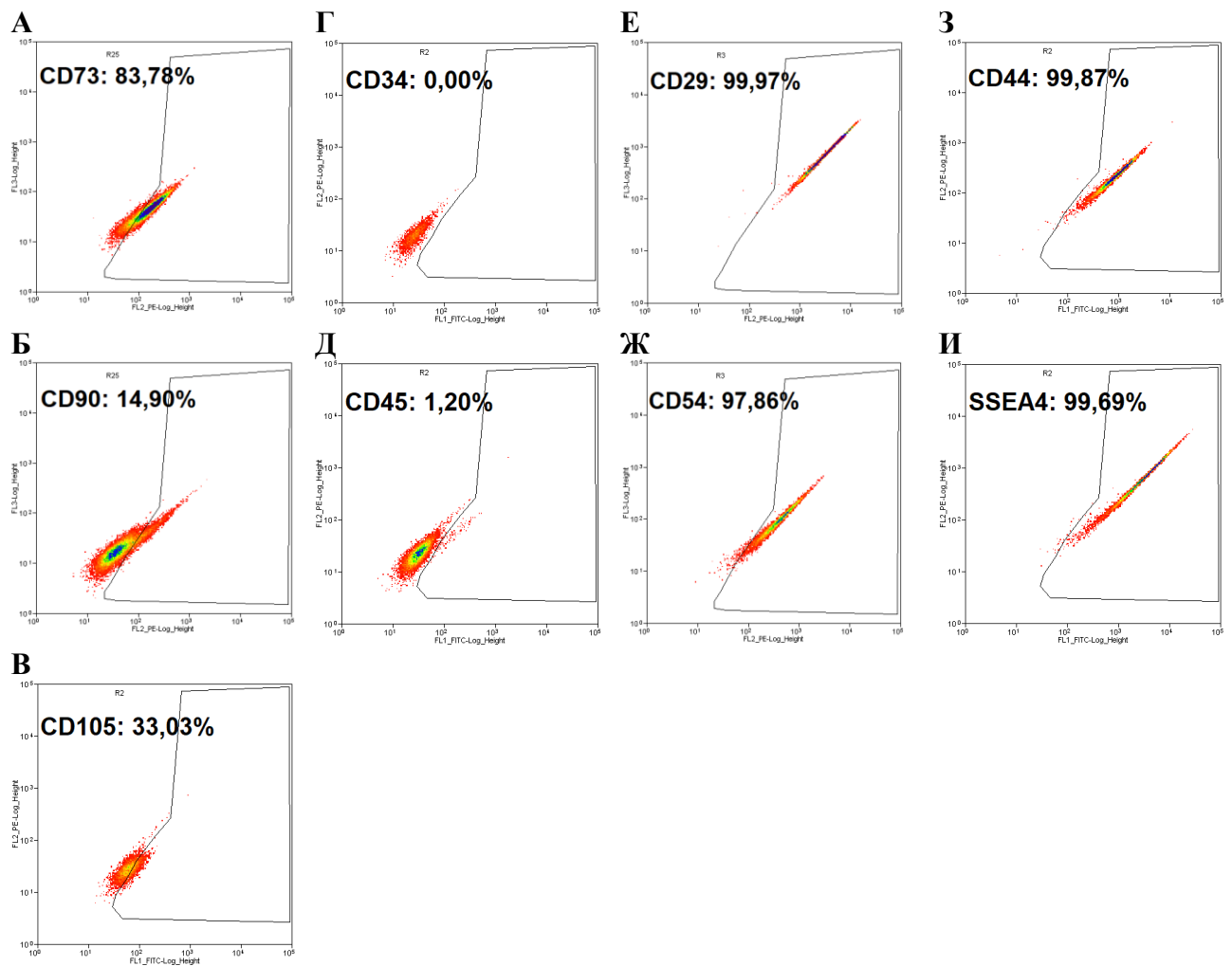


Рисунок 3.3. Проточная цитометрия для одного клона СКМ на поверхностные маркеры МСК (А-В), поверхностные маркеры гемопоэтических стволовых клеток (Г, Д), поверхностные маркеры характерные для других типов стволовых клеток (Е-И).

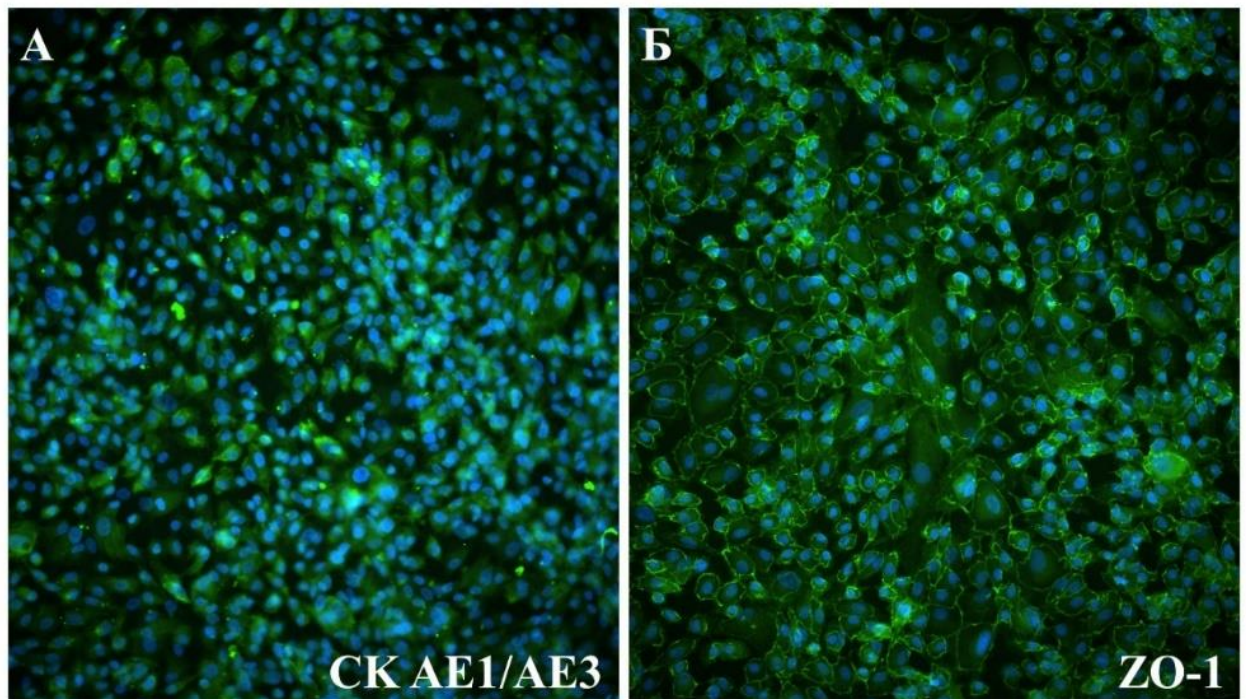


Рисунок 3.4. Экспрессия маркеров эпителиальных клеток СКМ в культуре (флуоресцентная микроскопия). А: экспрессия цитокератина СК AE1/AE3, Б: экспрессия ZO-1. Синий – DAPI.

Таблица 3.2. Данные экспрессии маркеров стволовых клеток СКМ по четырем клонам

Экспрессия маркеров МСК Маркер: Ме (мин – макс)	Экспрессия маркеров гемопозитических стволовых клеток Маркер: Ме (мин – макс)	Экспрессия маркеров других типов стволовых клеток Маркер: Ме (мин – макс)
CD73: 79,8% (67,5% – 99,2%)	CD34: <1,0%	CD29: >99,0%
CD90: 56,6% (10,2% – 99,6%)	CD45: <2,0%	CD44: >99,0%
CD105: 40,7% (25,7% – 74,2%)		CD54: 97,7% (95,5% – 99,0%)
		SSEA4: >99,0%

Обсуждение

Определение профиля экспрессии поверхностных маркеров использовалось для подтверждения того, что выделяемые клетки соответствуют СКМ, описанным в литературе. Несмотря на то, что проточная цитометрия показала определенную гетерогенность в профилях экспрессии маркеров у разных клонов выделенных

клеток, в целом полученные данные совпадали с профилями экспрессии поверхностных маркеров СКМ, опубликованными в литературе [Bharadwaj и др., 2013] (таблица 3.3). Таким образом, выделенные нами клетки соответствовали СКМ.

Таблица 3.3. Сравнение экспрессии поверхностных маркеров СКМ с данными литературы.

Поверхностный маркер	Экспрессия в настоящем исследовании, % Среднее (Минимум – Максимум)	Экспрессия по данным литературы [Bharadwaj и др., 2013], %
CD73	79,8 (67,5 – 99,2)	99,7
CD90	56,6 (10,2 – 99,6)	69,2
CD105	40,7 (25,7 – 74,2)	70,2
CD34	<1,0	≤1,0
CD45	<2,0	≤1,0
CD29	>99,0	99,8
CD44	>99,0	100,0
CD54	97,7 (95,5 – 99,0)	89,5
SSEA4	>99,0	99,0

Следует отметить, что описанные профили экспрессии не позволяют определить гистогенетическую принадлежность СКМ. В соответствии с минимальными критериями определения МСК СКМ экспрессируют слишком низкие уровни CD73, CD90 и CD105 для того, чтобы их можно было отнести к МСК. Также СКМ не экспрессируют маркеры гематопозитических стволовых клеток. Экспрессия маркеров CD29 (β 1 цепь интегрина), CD54 (ICAM-1), CD44 (рецептор клеточной адгезии) описана для многих различных типов клеток, а сами маркеры являются молекулами межклеточного взаимодействия или взаимодействия клеток с межклеточным веществом.

Дополнительная характеристика свойств СКМ с помощью иммуноцитохимического окрашивания показала, что цитоскелет СКМ включает в себя промежуточные филаменты – цитокератины, а при контакте СКМ друг с

другом в культуре в месте стыка образуются плотные контакты. Оба этих свойства характерны для эпителиальных клеток. Форма клеток в культуре также позволяет предположить эпителиальное происхождение СКМ. Интересно, что по данным литературы необработанная культура СКМ не экспрессирует или экспрессирует низкие уровни цитокератинов и компонентов плотных контактов [Bharadwaj и др., 2013], однако в данной работе отчетливо показано наличие этих клеточных элементов для всех исследованных клонов СКМ. Таким образом, даже несмотря на гетерогенность в экспрессии поверхностных маркеров, а также значительную гетерогенность в профиле роста культуры (коэффициент вариации для времени удвоения популяции клонов третьего пассажа $\sim 37\%$), все клоны СКМ имеют признаки эпителиальных клеток.

3.3 Определение гистогенетической принадлежности СКМ по профилю экспрессии поверхностных маркеров

Для установления отношения СКМ к эпителию канальцевой системы почек была проведена проточная цитометрия с использованием антител к специфическим поверхностным маркерам прогениторных клеток проксимальных канальцев и клеток париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана. В качестве маркеров были взяты CD133 и CD24 – маркеры прогениторных клеток эпителия проксимальных канальцев и капсулы Шумлянско-Боумана, CD106 – маркер клеток капсулы Шумлянско-Боумана и подокаликсин (PDX) – маркер подоцитов. В качестве отрицательного контроля иммуноцитохимии были использованы антитела против CD31.

Из мочи одного здорового добровольца были выделены 13 клонов СКМ. Каждый клон был доведен в культуре до второго пассажа ($\sim 1\,000\,000$ клеток), после чего была проведена проточная цитометрия. Клетки каждого клона были окрашены совместно с помощью FITC-конъюгированных антител против CD31 и PE-конъюгированных антител против CD106 для установления принадлежности клона к эпителию капсулы Шумлянско-Боумана и совместно с помощью FITC-

конъюгированных антител против CD24, PE-конъюгированных антител против PDX и APC-конъюгированных антител против CD133 для установления локализации источника клона в капсуле Шумлянско-Боумана.

У 2 из 13 клонов отсутствовала экспрессия маркера эпителия капсулы Шумлянско-Боумана CD106. Одновременно с этим у этих CD106⁻ клонов СКМ наблюдалась высокая экспрессия маркеров прогениторных клеток CD24 и CD133, а также отсутствовала экспрессия PDX. Таким образом, 2 из 13 клонов обладали фенотипом CD24⁺CD133⁺CD106⁻PDX⁻ (Таблица 3.4, рисунок 3.5А, В). Данный фенотип соответствует прогениторным клеткам проксимальных канальцев. Остальные 11 из 13 клонов обладали положительной экспрессией CD106, и поэтому были отнесены к клеткам капсулы Шумлянско-Боумана.

У 4 из 11 CD106⁺ клонов СКМ наблюдалась высокая (>30%) или умеренная (10-30%) экспрессия маркера прогениторных клеток CD133, а также высокая экспрессия другого маркера прогениторных клеток CD24 и отсутствие экспрессии маркера подоцитов PDX. Данные клоны СКМ имели фенотип CD24⁺CD133⁺/±CD106⁺PDX⁻, соответствующий стволовым клеткам мочевого полюса париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана.

У двух клонов наблюдалась положительная экспрессия маркера клеток капсулы Шумлянско-Боумана CD106 и маркера прогениторных клеток CD24, но отрицательная экспрессия CD133 и PDX. Таким образом, фенотип двух клонов соответствовал CD24⁺CD133⁻CD106⁺PDX⁻.

У оставшихся 5 из 11 CD106⁺ клонов СКМ наблюдалась положительная экспрессия PDX. У всех PDX⁺ клонов отсутствовала экспрессия CD133 и в одном из 5 случаев наблюдалось отсутствие экспрессии другого маркера прогениторных клеток CD24. Таким образом, у 5 из 13 клонов выделенных СКМ фенотип, CD24⁻/±/CD133⁻CD106⁺PDX⁺, соответствовал клеткам сосудистого полюса париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана, которые являются непосредственными предшественниками подоцитов.

Анализ микрофотографий культур СКМ, полученных посредством световой микроскопии, не выявил заметных паттернов в морфологии культур СКМ различных фенотипов. Однако для клона СКМ с фенотипом CD24–CD133–CD106+PDX+ клетки в культуре были заметно больше с различимыми выпячиваниями клеточной мембраны (рисунок 3.5Б, Г, Е, З, К).

Для дополнительной характеристики PDX+ клонов СКМ два клона с фенотипом CD24–CD133–CD106+PDX+ и CD24±CD133–CD106+PDX+ были окрашены иммуноцитохимическим методом на экспрессию внутриядерного маркера, транскрипционного фактора подоцитов, WT-1 и маркера эпителиальных клеток ZO-1. Для обоих маркеров обоих клонов СКМ была показана положительная экспрессия (рисунок 3.6).

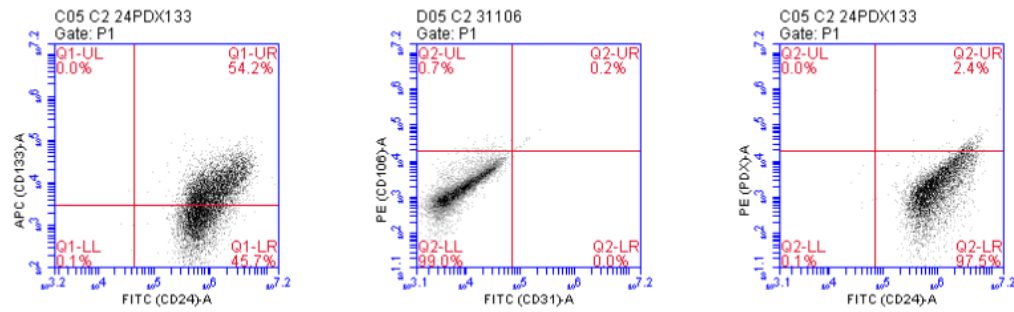
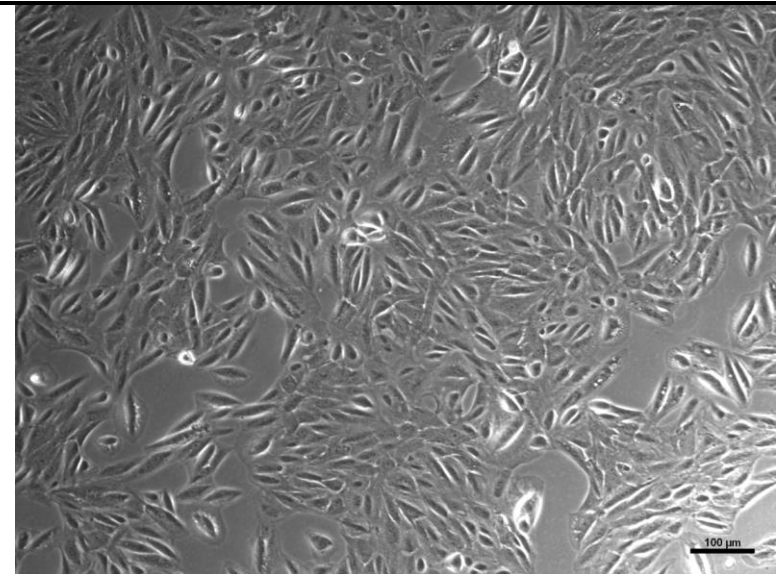
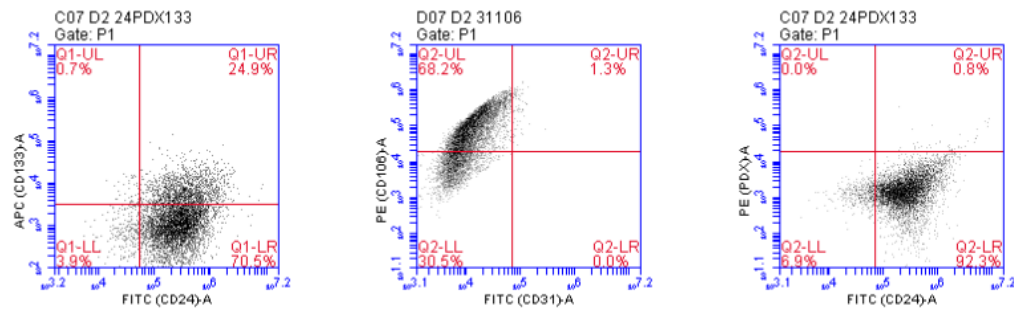
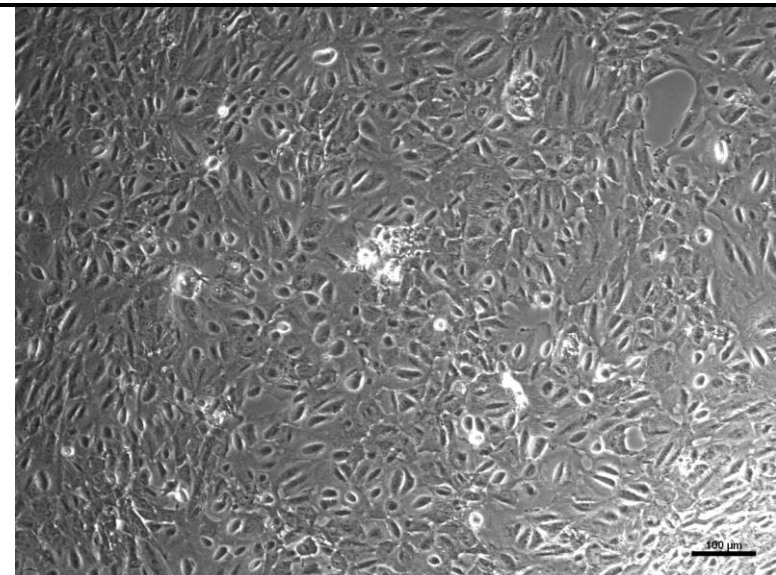
Таблица 3.4. Экспрессия клонами СКМ поверхностных маркеров стволовых клеток эпителия проксимальных канальцев почки и париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана.

Клон	Экспрессия поверхностных маркеров	Фенотип (– – <10%, ± – 10-30%, + – >30%)
Клоны СКМ с фенотипом прогениторных клеток проксимальных канальцев		
Клон I312-1912-C2	CD24 – 99.9%, CD133 – 54.2%, CD106 – 0.9%, PDX – 2.4%	CD24+CD133+CD106–PDX–
Клон I312-1912-C5	CD24 – 99.9%, CD133 – 43.4%, CD106 – 0.3%, PDX – 0.2%	CD24+CD133+CD106–PDX–
Клоны СКМ с фенотипом стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана		
Клон I312-1912-A2	CD24 – 84.0%, CD133 – 96.6%, CD106 – 60.6%, PDX – 1.8%	CD24+CD133+CD106+PDX–
Клон I312-1912-D2	CD24 – 93.1%, CD133 – 25.6%, CD106 – 69.5%, PDX – 0.8%	CD24+CD133±CD106+PDX–
Клон I312-1912-D5	CD24 – 72.1%, CD133 – 21.1%, CD106 – 24.3%, PDX – 0.7%	CD24+CD133±CD106±PDX–
Клон I312-1912-A1	CD24 – 78.0%, CD133 – 18.1%, CD106 – 72.8%, PDX – 0.9%	CD24+CD133±CD106+PDX–
Клон I312-1912-C1	CD24 – 99.6%, CD133 – 1.2%, CD106 – 82.0%, PDX – 5.5%	CD24+CD133–CD106+PDX–
Клон I312-1912-A6	CD24 – 47.7%, CD133 – 0.9%, CD106 – 34.4%, PDX – 0.2%	CD24+CD133–CD106+PDX–
Клоны СКМ с фенотипом предшественников подоцитов		
Клон I312-1912-B3	CD24 – 29.8%, CD133 – 9.3%, CD106 – 82.0%, PDX – 53.9%	CD24±CD133–CD106+PDX+
Клон I312-1912-D1	CD24 – 8.3%, CD133 – 7.4%, CD106 – 68.5%, PDX – 71.2%	CD24–CD133–CD106+PDX+
Клон I312-1912-A3	CD24 – 99.8%, CD133 – 5.4%, CD106 – 31.5%, PDX – 16.7%	CD24+CD133–CD106+PDX±
Клон I312-1912-B6	CD24 – 99.2%, CD133 – 1.5%, CD106 – 44.5%, PDX – 65.5%	CD24+CD133–CD106+PDX+
Клон I312-1912-C6	CD24 – 99.8%, CD133 – 0.9%, CD106 – 22.1%, PDX – 45.6%	CD24+CD133–CD106±PDX+

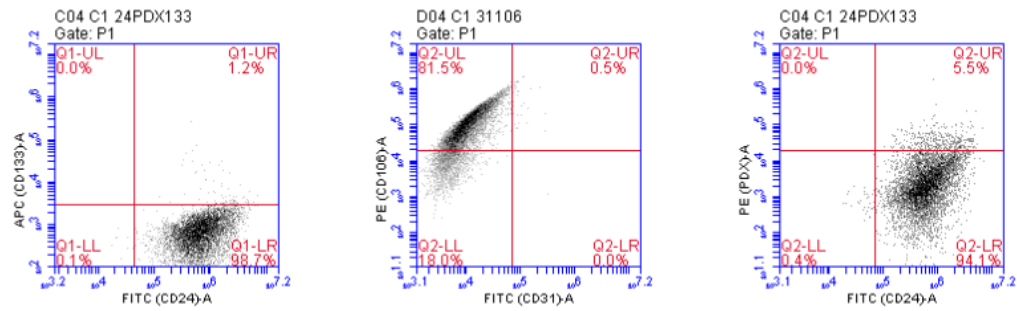
* жирным шрифтом отмечены клоны, данные проточной цитометрии и световые микрофотографии которых представлены на рисунке 3.11.

Таблица 3.5. Частота встречаемости различных типов прогениторных клеток эпителия проксимальных канальцев почки и париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана среди клонов СКМ, выделенных от одного донора.

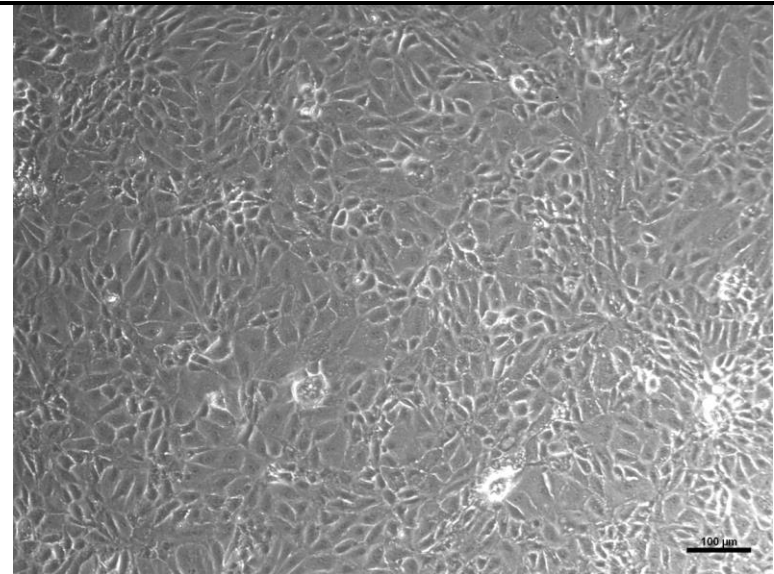
Тип клона СКМ	Частота встречаемости в образце мочи
Клоны СКМ с фенотипом прогениторных клеток проксимальных канальцев	15,4%
Клоны СКМ с фенотипом стволовых клеток капсулы Шумлянско-Боумана	46,2%
Клоны СКМ с фенотипом предшественников подоцитов	38,5%

A**Б****B****Г**

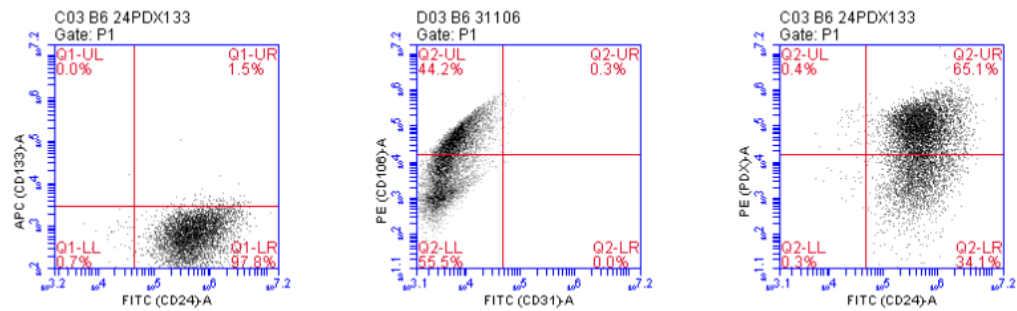
D



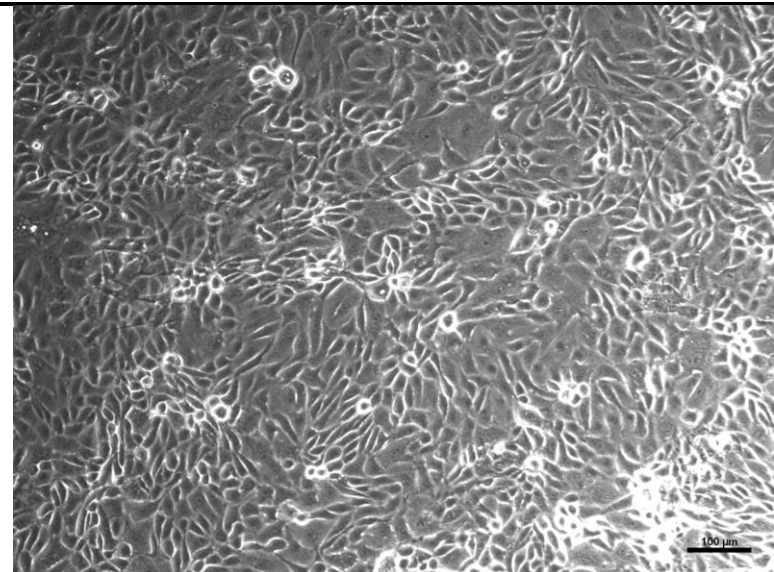
E



Ж



3



И

К

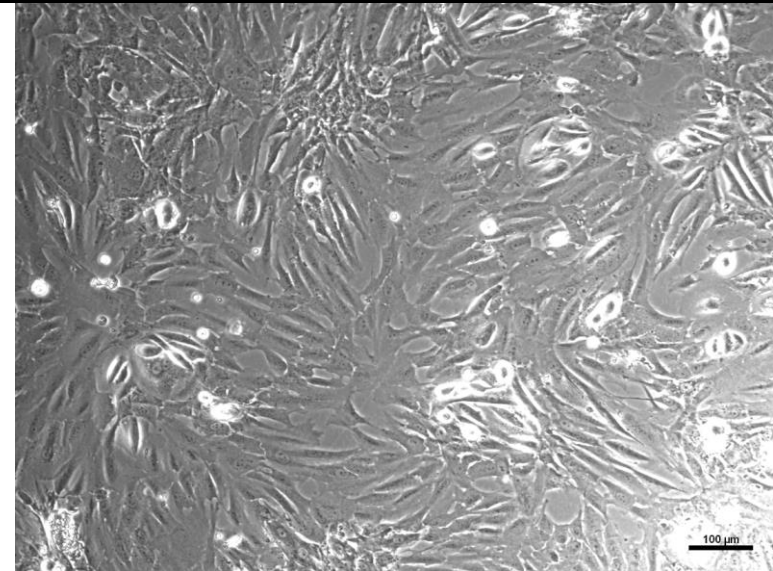
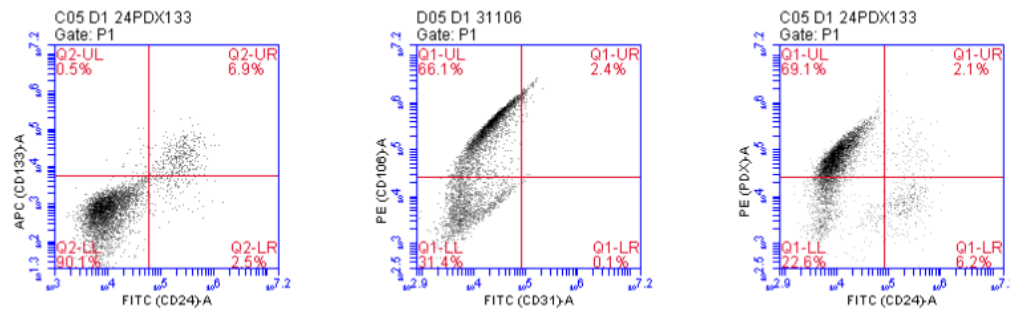


Рисунок 3.5. Проточная цитометрия для оценки экспрессии поверхностных маркеров стволовых клеток CD24, CD133, клеток париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана CD106, предшественников подоцитов PDX и клеток гемтопозитического ряда CD31 у различных клонов СКМ и микрофотографии культуры клонов СКМ различного фенотипа. А, Б: клон I312-1912-C2; В, Г: клон I312-1912-D2; Д, Е: клон I312-1912-C1; Ж, З: клон I312-1912-B6; И, К: клон I312-1912-D1.

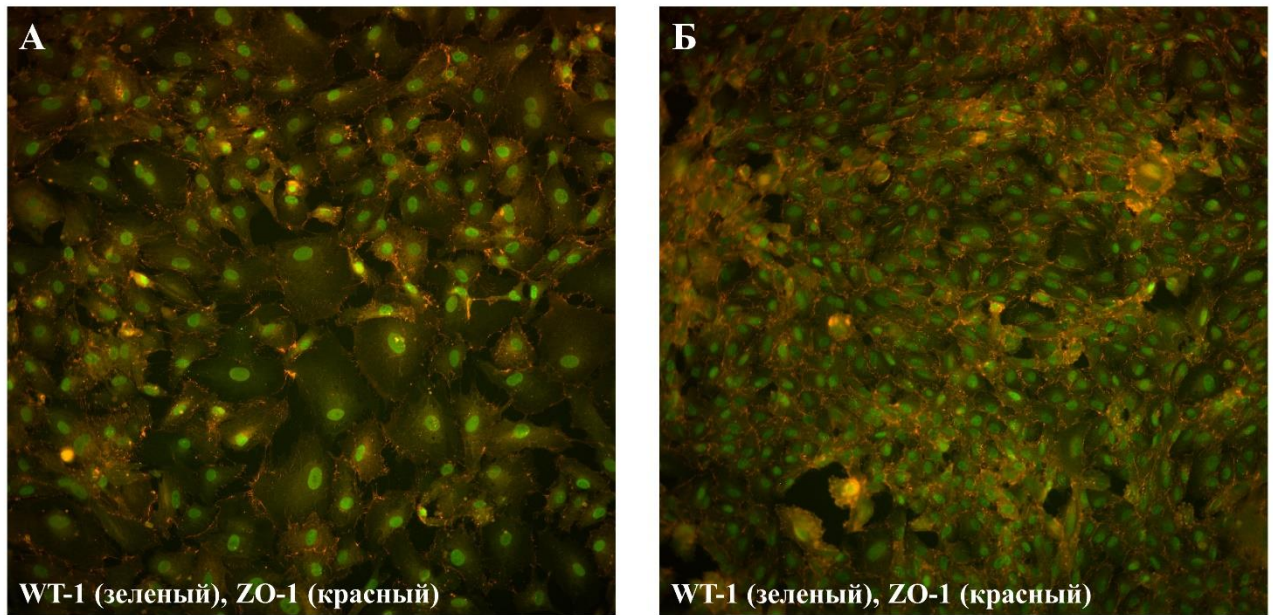


Рисунок 3.6. Экспрессия транскрипционного фактора WT-1 (зеленый) и эпителиального маркера ZO-1 (красный) PDX+ клонами СКМ: А: I312-1912-D1 (фенотип CD24-CD133-CD106+PDX+); Б: I312-1912-B3 (фенотип CD24±CD133-CD106+PDX+).

Обсуждение

Установить источник СКМ напрямую проблематично, так как путь мочи от капсулы Шумлянско-Боумана до уретры длинный, на протяжении которого эпителий сменяется несколько раз, этот факт, а также то, что общая длина всех канальцев почек человека составляет в среднем ~120 км [Иллек и др., 2012], делает практически невозможной непосредственную локализацию источника СКМ с учетом того, что у здорового взрослого человека в среднем приходится не более 20 СКМ на 100 мл мочи. Поэтому установление гистогенетической принадлежности СКМ возможно только косвенным путем. В данной работе была использована проточная цитометрия для оценки экспрессии маркеров клеток париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана и клеток эпителия проксимальных канальцев почки. Анализ экспрессии показал высокую корреляцию фенотипа СКМ с фенотипом клеток почечного эпителия, что говорит о правомерности гипотезы о

происхождении СКМ из эпителия проксимальной части нефрона. За эту гипотезу говорит и тот факт, что СКМ имеют эпителиальный фенотип в культуре, а также значительное увеличение количества СКМ в моче у пациентов с почечной недостаточностью. В дополнение к приведенным данным существуют и другие описанные в литературе факты, подтверждающие происхождение СКМ из эпителия проксимальных канальцев и капсулы Шумлянско-Боумана. Так, прогениторные клетки канальцевой системы почек были обнаружены в моче у детей с нефротическим синдромом [Lazzeri и др., 2015]. Описан случай, когда прогениторные клетки париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана были выделены из мочи 17-летней пациентки, страдающей рефрактерным волчаночным нефритом [Romagnani и др., 2016]. В данном исследовании выделенные прогениторные клетки дифференцировали в культуре в подоциты для выявления фенотипических характеристик подоцитов у пациентов с волчаночным нефритом. Также прогениторные клетки капсулы Шумлянско-Боумана были выделены из мочи мышей после индукции у них нефропатии при помощи доксорубина [Lazzeri и др., 2015].

Мы не можем с полной уверенностью утверждать, что на момент сдачи мочи у добровольцев в нашем исследовании не было болезней почек, так как добровольцы не проходили оценки функции почек до сдачи мочи. Однако наличие в моче здоровых взрослых людей фракции прогениторных клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев может быть объяснено очень редким случайным шелушиванием эпителия капсулы, так как почка человека содержит до 1,2-1,3 млн нефронов, а количество СКМ в моче крайне мало. Также следует отметить, что в настоящем исследовании показано наличие нескольких типов прогениторных клеток, описанных для канальцевой системы почек: мультипотентные стволовые клетки париетального эпителия капсулы Шумлянско-Боумана и прогениторные клетки эпителия проксимальных канальцев, коммитированные предшественники подоцитов с фенотипом CD24–CD133–CD106+PDX+. При условии правомерности гипотезы происхождения СКМ из эпителия проксимальных отделов нефрона наличие среди

клонов СКМ всего спектра прогениторных клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев позволяет утверждать, что клоны СКМ представляют из себя «отпечаток» дифферона эпителия проксимальных элементов нефрона.

3.4 Фенотип ГМК и клеток уротелия мочевого пузыря в культуре

Для определения характеризующих признаков ГМК мочевого пузыря и клеток уротелия было проведено иммуноцитохимическое окрашивание ГМК и клеток уротелия в культуре на различные внутриклеточные маркеры. Для ГМК были взяты антитела к белкам мышечных филаментов α SMA и тяжелой цепи миозина, компонентам цитоскелета мышечных клеток смузелину и десмину и ассоциированному с мышечными филаментами белку кальпониу. Иммуноцитохимическое окрашивание показало высокую экспрессию в культуре ГМК α SMA, кальпонины и десмина и умеренную экспрессию тяжелой цепи миозина (рисунок 3.7). В культуре ГМК отсутствовала экспрессия смузелина (рисунок 3.7B).

В качестве характеризующих маркеров клеток уротелия были использованы антитела к различным жестким промежуточным филаментам цитоскелета – СК AE1/AE3, СК 7, СК 13, СК20, а также к специализированному белку мембраны поверхностных клеток уротелия уроплакину III. Результаты иммуноцитохимического окрашивания показали наличие высокого уровня экспрессии цитокератинов в клетках уротелия (3.6A). В частности, обнаружено высокое содержание СК 7 и 13 в то время, как СК 20 не экспрессируется в клетках уротелия в культуре (рисунок 3.8Г). Также в клетках уротелия в культуре отсутствует экспрессия уроплакина III (рисунок 3.8Д).

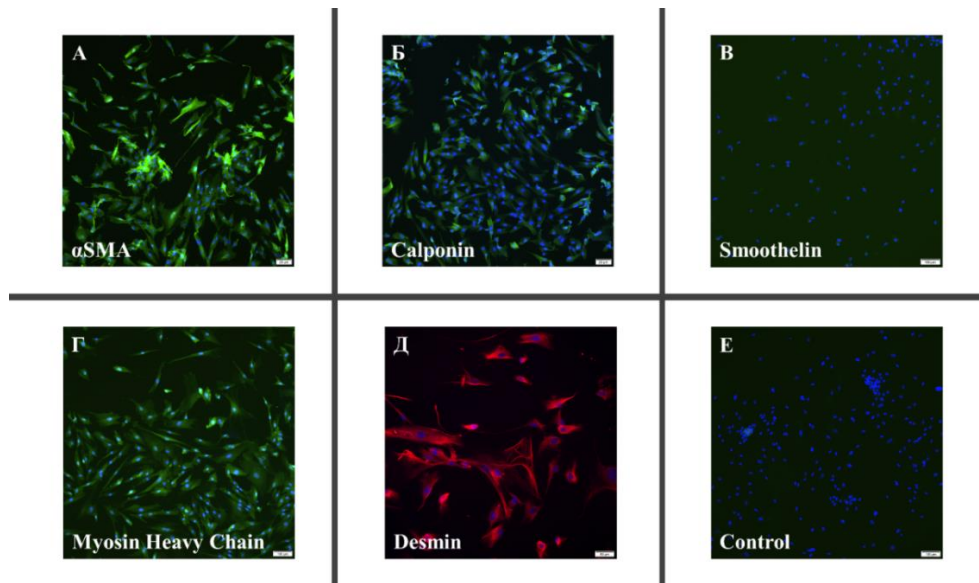


Рисунок 3.7. Экспрессия маркеров ГМК в культуре (флуоресцентная микроскопия). А: экспрессия α SMA; Б: экспрессия кальпонины; В: экспрессия смузелина; Г: экспрессия тяжелой цепи миозина; Д: экспрессия десмина; Е: отрицательный контроль – окрашивание клеток без первичных антител. Синий – DAPI.

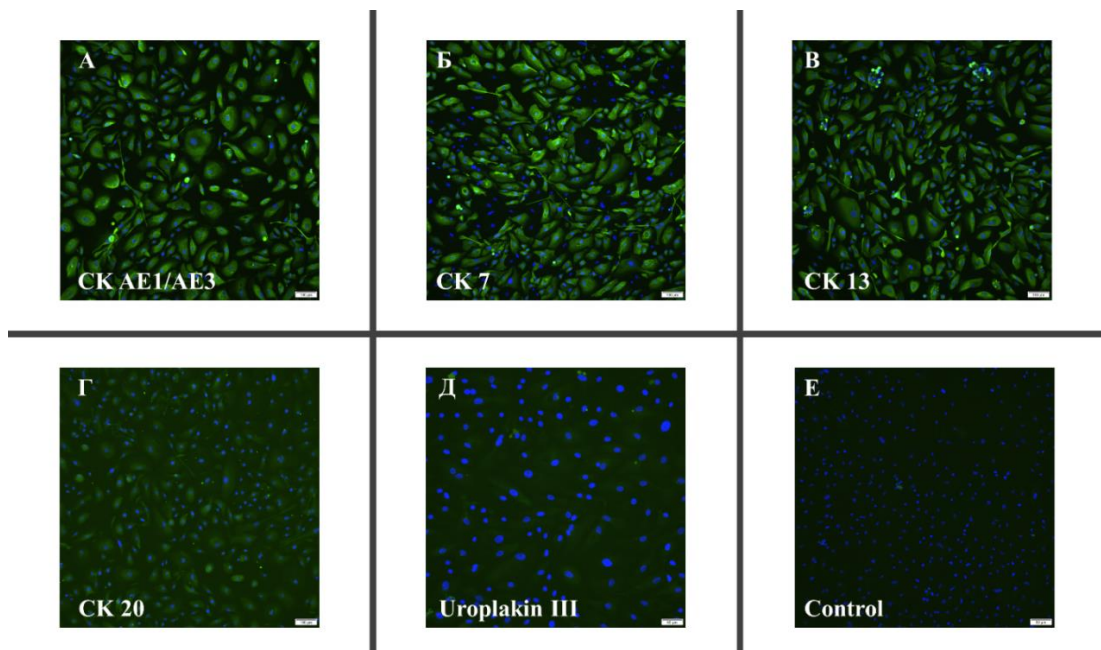


Рисунок 3.8. Экспрессия цитокератинов и уроплакина клетками уротелия в культуре (флуоресцентная микроскопия). А: экспрессия СК AE1/AE3; Б: экспрессия СК 7; В: экспрессия СК 13; Г: экспрессия СК 20; Д: экспрессия уроплакина III; отрицательный контроль – окрашивание клеток без первичных антител. Синий – DAPI.

Обсуждение

В данной работе мы определили набор внутриклеточных элементов цитоскелета как признак, характеризующий клетки уротелия и ГМК. Для клеток уротелия характеризующими элементами цитоскелета были выбраны цитокератины – жесткие промежуточные филаменты, характерные для эпителиальных клеток, обеспечивающие механическую прочность и поддержание формы клеток. В работе были использованы антитела против участка молекулы цитокератинов, встречающегося у большинства типов цитокератинов (СК AE1/AE3), для оценки общего уровня содержания цитокератинов в клетках, а также антитела против СК7 и СК13 для оценки экспрессии цитокератинов, характерных для клеток уротелия. Экспрессия СК7 и СК13 клетками уротелия в культуре была показана с помощью иммуноцитохимического окрашивания, что согласуется с данными литературы (таблица 3.6) [Southgate и др., 1994]. В свою очередь, для ГМК характеризующими элементами цитоскелета были выбраны структурные составляющие гладкомышечных филаментов α SMA, компонент цитоскелета мышечных клеток десмин и ассоциированный с мышечными филаментами белок кальпонин.

Таблица 3.6. Сравнение экспрессии маркеров уротелия с данными литературы.

Маркер	Экспрессия в настоящем исследовании	Экспрессия по данным литературы [Southgate и др., 1994]
СК AE1/AE3	+++	++
СК 7	+++	++
СК 13	++	+
СК 20	-	-
Уроплакин III	-	-

3.5 Оценка дифференцировки СКМ в ГМК

Дифференцировка СКМ в ГМК проводилась содержанием СКМ на протяжении 10 дней в среде, содержащей факторы роста PDGF-BB (5 нг/мл) и TGF-

$\beta 1$ (2,5 нг/мл). В качестве маркеров дифференцировки были взяты компоненты α SMA, кальпонин и десмин. Для данных маркеров была показана высокая экспрессия на основании иммуноцитохимического окрашивания культуры ГМК мочевого пузыря (п. 3.4). Оценка эффективности дифференцировки проводилась с помощью иммуноцитохимического окрашивания культур клонов СКМ до и после дифференцировки. В качестве положительного контроля была взята культура ГМК. Оценка уровня экспрессии проводилась с помощью измерения интенсивности флуоресценции на основании полученных снимков флуоресцентной микроскопии. Интенсивность флуоресценции имеет прямую корреляцию с количеством соответствующего маркера в клетке, поэтому при одинаковой интенсивности излучения лазера и времени экспозиции интенсивность флуоресценции, измеренная с помощью анализа изображений, позволяет оценить относительное количество маркера в клетках. Для маркера ГМК десмина количественного анализа изображений не проводилось, так как его внутриклеточная локализация крайне неоднородна. До дифференцировки культуры СКМ экспрессировали маркеры ГМК, однако экспрессия была значительно меньше, чем для культуры ГМК: экспрессия α SMA была на уровне 46,8% [27,7% – 65,9%] относительно культуры ГМК, экспрессия кальпонины на уровне 37,6% [21,2% – 55,4%] относительно культуры ГМК (рисунок 3.9, 3.10, таблица 3.7). Также иммуноцитохимическое окрашивание показало отдельные внутриклеточные островки десмина в культуре СКМ до дифференцировки (рисунок 3.9А). После 10 дней содержания СКМ в среде с факторами PDGF-BB и TGF- $\beta 1$ экспрессия маркеров ГМК в СКМ значительно увеличилась и составила 79,0% [57,0% – 86,7%] относительно культуры ГМК для α SMA и 66,8% [51,8% – 131,1%] относительно культуры ГМК для кальпонины (рисунок 3.9, 3.10, таблица 3.7). Относительный уровень экспрессии маркеров ГМК в клонах СКМ изменился на 79,6% [21,3% – 119,2%] ($p=0,0115$) для α SMA и на 97,6% [-6,4% – 248,8%] ($p=0,0379$) для кальпонины (рисунок 3.10В, таблица 3.7). Следует отметить, что не было отмечено изменений в паттерне экспрессии десмина внутри клеток СКМ по окончании периода дифференцировки (рисунок 3.9Б). Кроме изменения в профиле

экспрессии маркеров ГМК СКМ в культуре значительно изменили свою морфологию (рисунок 3.9Ж-З). Так СКМ увеличились в размерах и приобрели вытянутую форму, близкую к веретенообразной форме ГМК (рисунок 3.9И).

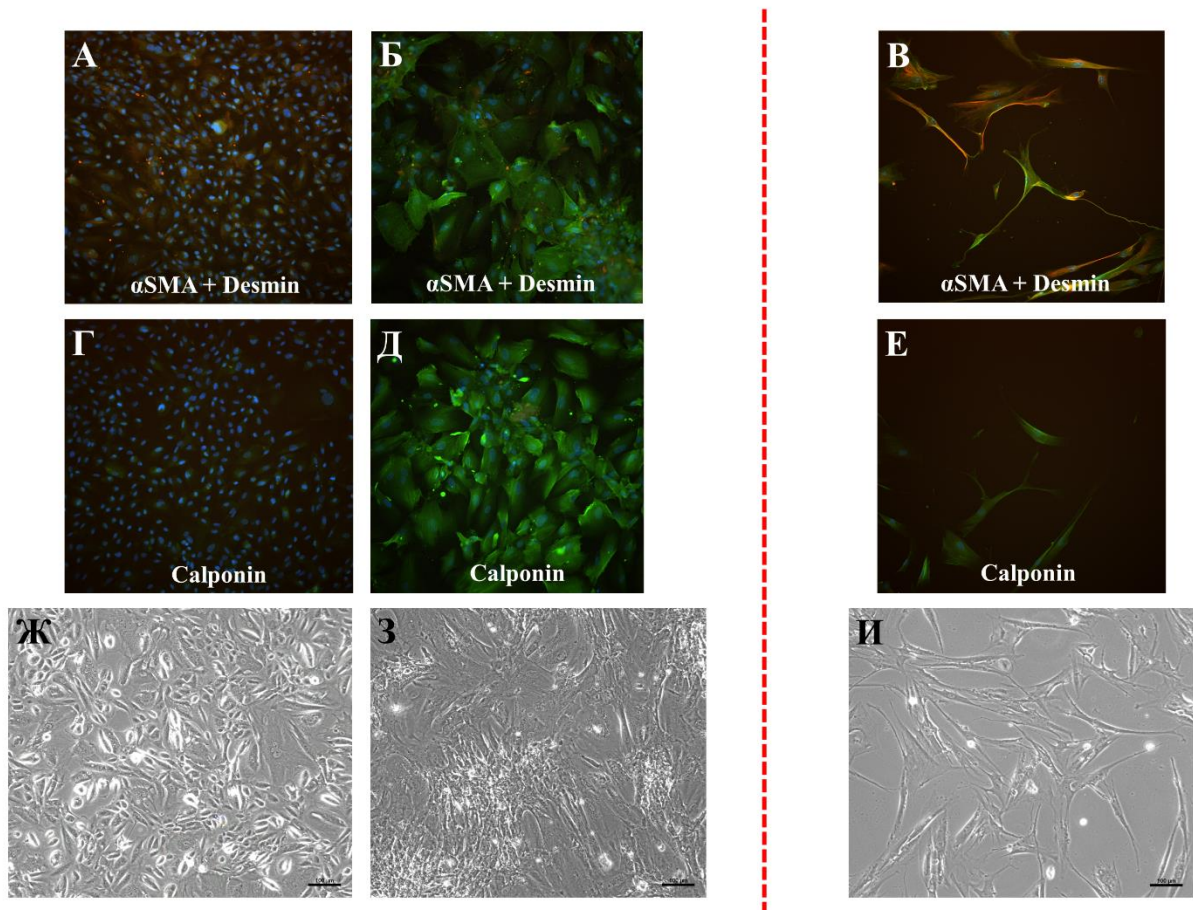
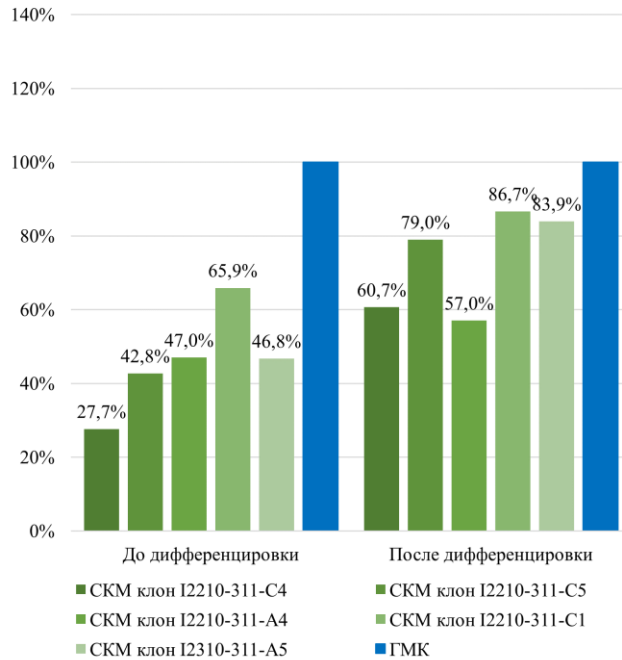
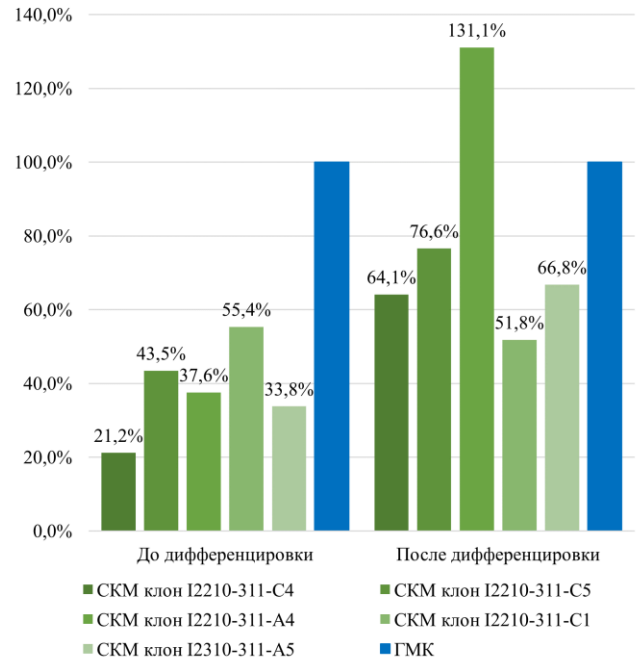


Рисунок 3.9. А, Г: экспрессия маркеров ГМК в СКМ до дифференцировки (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); Б, Д: экспрессия маркеров ГМК в СКМ после дифференцировки в ГМК (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); Ж: световая микроскопия культуры СКМ до дифференцировки; З: световая микроскопия культуры СКМ после дифференцировки в ГМК; В, Е: экспрессия маркеров ГМК в культуре ГМК (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); И: световая микроскопия культуры ГМК.

А Относительная экспрессия α SMA СКМ до и после дифференцировки в гладкомышечные клетки



Б Относительная экспрессия Calponin СКМ до и после дифференцировки в гладкомышечные клетки



В Относительное изменение уровня экспрессии гладкомышечных маркеров СКМ после дифференцировки в гладкомышечные клетки

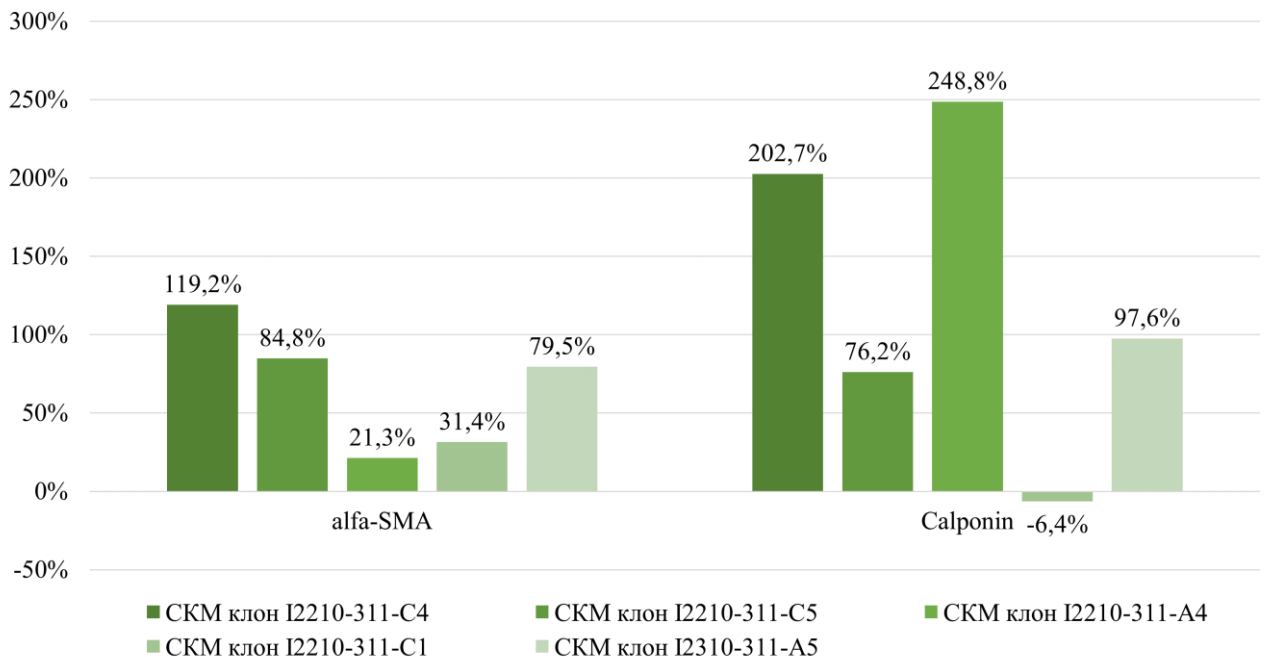


Рисунок 3.10. А: относительный уровень экспрессии α SMA в различных клонах СКМ до и после дифференцировки в ГМК; **Б:** относительный уровень экспрессии кальпонины в различных клонах СКМ до и после дифференцировки в ГМК; **В:** относительное изменение уровня экспрессии α SMA и кальпонины после гладкомышечной дифференцировки.

Таблица 3.7. Относительные значения экспрессии маркеров ГМК до и после дифференцировки

Маркер дифференцировки	Относительный уровень экспрессии маркеров		Относительное изменение экспрессии маркера после дифференцировки Me [мин.–макс.]
	До дифференцировки Me [мин.–макс.]	После дифференцировки Me [мин.–макс.]	
α -SMA	46,8% [27,7% – 65,9%]	79,0% [57,0% – 86,7%]	79,6% [21,3% – 119,2%] $p=0,0115$
Кальпонин	37,6% [21,2% – 55,4%]	66,8% [51,8% – 131,1%]	97,6% [-6,4% – 248,8%] $p=0,0379$

Обсуждение

Дифференцировка СКМ в ГМК осуществлялась по протоколу, описанному ранее [Bodin и др., 2010]. В соответствии с данным протоколом культура СКМ содержится в среде, содержащей факторы роста TGF- β 1 и PDGF-BB на протяжении 14 дней. Следует отметить, что после нескольких попыток применения в настоящей работе описанного протокола для дифференцировки к 14 дню получался переросший монослой, клетки которого были едва жизнеспособны. Поэтому была проведена оптимизация данного протокола, а именно снижение концентрации сыворотки в 2 раза, снижение исходной плотности посадки клеток до 500 – 1500 клеток/см² и уменьшение общего времени дифференцировки с 14 дней до 10 дней. Использование такого оптимизированного протокола позволило получить здоровую культуру клеток к концу дифференцировки без промежуточного пассирования культуры. При этом концентрация ключевых факторов дифференцировки TGF- β 1 и PDGF-BB в оптимизированном протоколе не была изменена.

Действие TGF- β 1 и PDGF на клетки было подробно изучено для различных типов клеток, в том числе для МСК. TGF- β 1 известен прежде всего как фактор, играющий важную роль в индукции эпителиально-мезенхимального перехода.

Взаимодействие TGF- β 1 с рецептором к TGF приводит к активации внутриклеточных каскадов реакций с участием Smad белков. Smad белки напрямую передают сигнал от рецептора в ядро, где через транскрипционные изменения вызывают снижение экспрессии белков, характерных для эпителиальных клеток, таких как E-кадгерин, цитокератины, окклюдин, и увеличение экспрессии белков, характерных для мезенхимальных клеток – N-кадгерин, коллаген, металлпротеиназы [Xu, Lamouille, Derynck, 2009]. TGF- β 1 увеличивает экспрессию маркеров дифференцировки ГМК в стволовых клетках нервного гребня [Shah, Groves, Anderson, 1996]. Экспрессия маркеров ГМК под воздействием TGF- β 1 опосредована активацией транскрипционного фактора ZEB1, который в свою очередь активирует промотеры α SMA и миозина [Nishimura и др., 2006]. В экспериментах на культуре МСК было показано, что TGF- β 1 не только увеличивает экспрессию α SMA, но и увеличивает полимеризацию актиновых филаментов внутри клетки через ингибирование протеинов, препятствующих сборке актиновых филаментов, таких как гелзолин [Kurpinski и др., 2009].

PDGF-BB через рецептор PDGFR α вызывает увеличение полимеризации α SMA. PDGF, связываясь с PDGFR α , активирует внутриклеточный путь RhoA/ROCK, который приводит к активированию LIMK (LIM киназа) и фосфорилированию MLC АТФазы. LIMK и MLC АТФаза ингибируют активность фактора деполимеризации актина кофилина. Кроме этого, было обнаружено, что при взаимодействии PDGF с PDGFR α рецептором происходит увеличение как транскрипции mRNA α SMA, так и трансляции α SMA [Ball, Shuttleworth, Kielty, 2007]. Следует отметить, что описанный выше путь ингибирования активности кофилина также был показан и для TGF- β 1 [Vardouli, Moustakas, Stournaras, 2005].

Таким образом, TGF- β 1 и PDGF-BB имеют схожие эффекты на клетки по активации экспрессии генов ГМК, при этом задействуют различные молекулярные механизмы. Поэтому совместное применение факторов в культуре стволовых клеток эффективно приводит к дифференцировке клеток в ГМК.

В предыдущих исследованиях с использованием СКМ был показан эффект TGF- β 1 и PDGF-BB, под воздействием которых было обнаружено увеличение

содержания α SMA в МСК, а также внутриклеточная перестройка цитоскелета и поляризация актина. В настоящей работе был показан аналогичный эффект длительного воздействия факторов роста TGF- β 1 и PDGF-BB, а именно значительное увеличение внутриклеточного содержания α SMA и кальпона и удлинение клеток.

3.6 Оценка дифференцировки СКМ в клетки уротелия

Дифференцировка СКМ в клетки уротелия производилась содержанием СКМ на протяжении 10 дней в среде, содержащей высокую концентрацию фактора роста EGF (30 нг/мл). В качестве маркеров дифференцировки были взяты жесткие промежуточные филаменты цитоскелета клеток уротелия цитокератины СК AE1/AE3, СК 7 и СК13. Для данных маркеров была показана высокая экспрессия на основании иммуноцитохимического окрашивания культуры клеток уротелия (п. 3.4). Оценка уровня экспрессии проводилась с помощью измерения интенсивности флюоресценции на основании полученных снимков флюоресцентной микроскопии также, как это проводилось для оценки экспрессии ГМК. В качестве положительного контроля экспрессии маркеров уротелия была использована культура клеток уротелия. Несмотря на положительную экспрессию цитокератинов клонами СКМ до дифференцировки, уровень экспрессии был значительно меньше в сравнении с клетками уротелия, составляя лишь 10,4% [7,1% – 13,7%] относительно положительного контроля (рисунок 3.11, 3.12, таблица 3.8). Анализ по отдельным видам цитокератинов показал, что уровень экспрессии СК 7 в клетках СКМ до дифференцировки составлял 8,0% [6,0% – 26,7%] относительно положительного контроля (рисунок 3.11, 3.12, таблица 3.8). Также в клонах СКМ отсутствовала экспрессия СК13 – 0,7% [0,4% – 1,5%] относительно положительного контроля (рисунок 3.11, 3.12, таблица 3.8). После содержания клонов СКМ в среде с высокой концентрацией EGF на протяжении 10 дней не наблюдалось заметного изменения в уровне экспрессии цитокератинов. Так к концу дифференцировки экспрессия СК AE1/AE3 составила 11,0% [8,1% – 22,8%]

относительно положительного контроля, а экспрессия СК 7 – 8,6% [4,3% – 33,3%] (рисунок 3.11, 3.12, таблица 3.8). Относительные изменения экспрессии цитокератинов в клетках СКМ составили 24,9% [-14,6% – 66,7%] ($p=0,2598$) для СК АЕ1/АЕ3 и 7,6% [-28,9% – 24,6%] ($p=0,9512$) для СК 7 (рисунок 3.12Г, таблица 3.8). Следует отметить, что к концу периода дифференцировки не было отмечено изменения в уровне экспрессии СК 13, интенсивность флюоресценции для которого, как и до дифференцировки, не отличалась от отрицательного контроля (рисунок 3.11Ж-З). Также после содержания СКМ в среде с высокой концентрацией EGF не было отмечено изменений в морфологии клеток СКМ (рисунок 3.11К-Л).

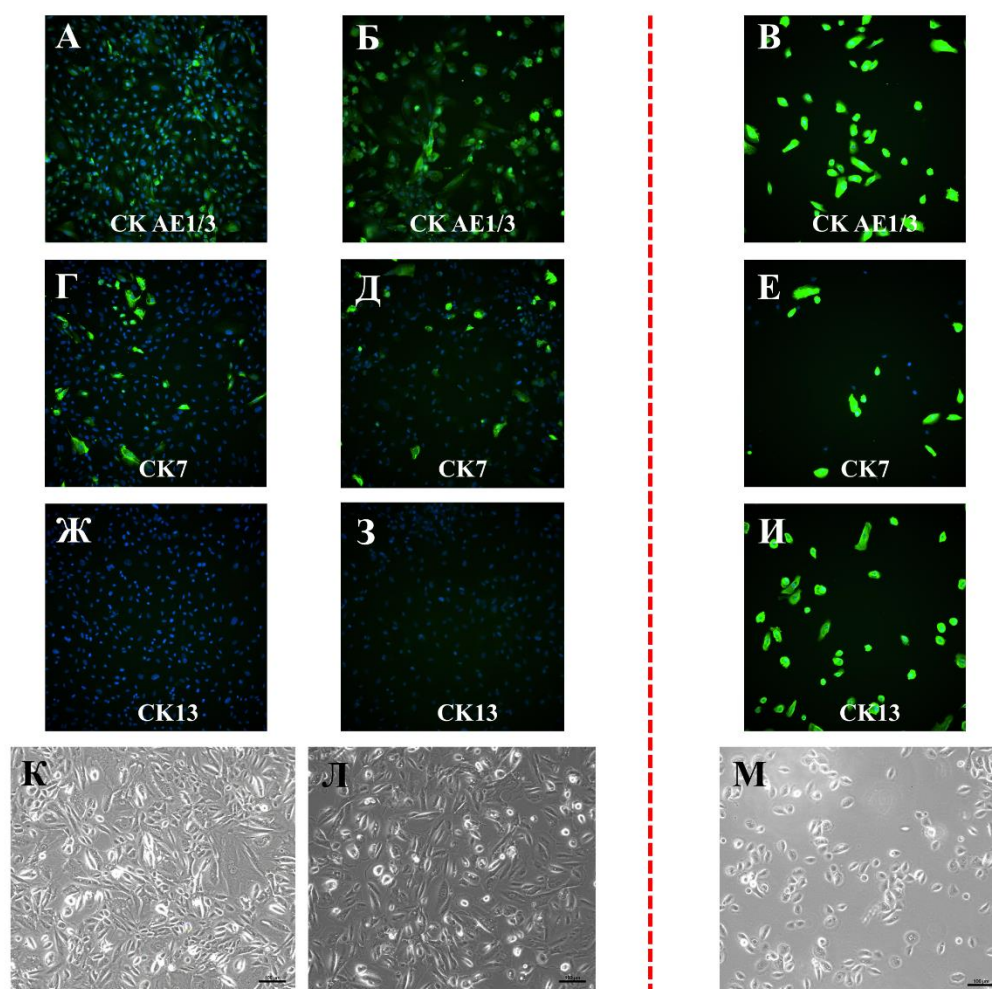


Рисунок 3.11. А, Г, Ж: экспрессия цитокератинов в СКМ до дифференцировки (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); Б, Д, З: экспрессия цитокератинов в СКМ после дифференцировки в клетки уротелия (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); К: световая микроскопия культуры СКМ до дифференцировки; Л: световая микроскопия культуры СКМ после уротелиальной дифференцировки; В, Е, И: экспрессия цитокератинов клетками уротелия в культуре (флуоресцентная микроскопия, синий - DAPI); М: световая микроскопия культуры клеток уротелия.

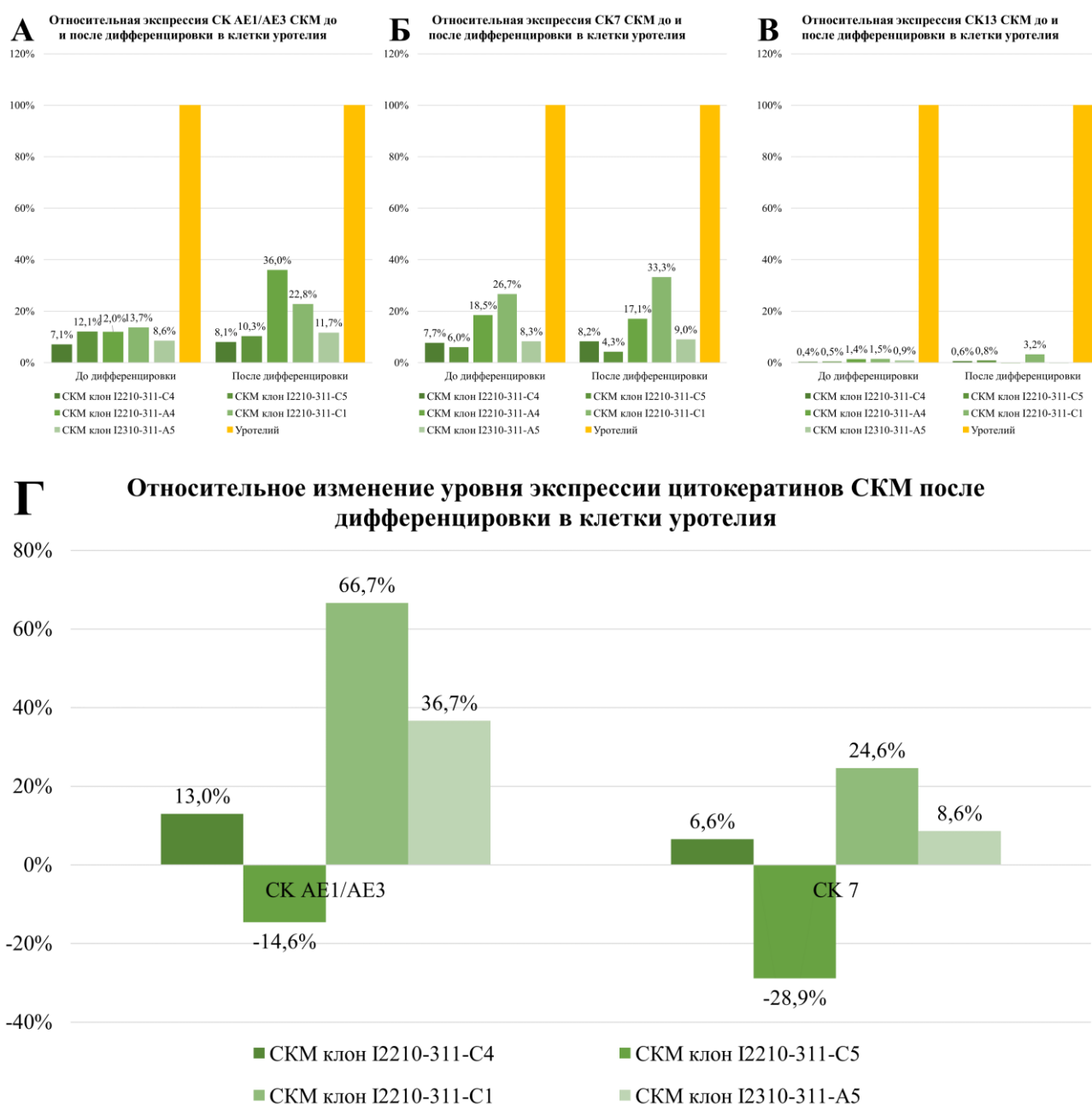


Рисунок 3.12. А-В: относительный уровень экспрессии цитокератинов в различных клонах СКМ до и после уротелиальной дифференцировки; Г: относительное изменение уровня экспрессии цитокератинов после уротелиальной дифференцировки.

Таблица 3.8. Относительные значения экспрессии маркеров уротелия до и после дифференцировки

Маркер дифференцировки	Относительный уровень экспрессии маркеров		Относительное изменение экспрессии маркера после дифференцировки Me [мин.–макс.]*
	До дифференцировки Me [мин.–макс.]	После дифференцировки Me [мин.–макс.]	
СК AE1/AE3	10,4% [7,1% – 13,7%]	11,0% [8,1% – 22,8%]	24,9% [-14,6% – 66,7%] $p=0,2598$
СК 7	8,0% [6,0% – 26,7%]	8,6% [4,3% – 33,3%]	7,6% [-28,9% – 24,6%] $p=0,9512$
СК 13	0,7% [0,4% – 1,5%]	0,7% [-0,6% – 3,2%]	-

Примечание. * — для СК 13 относительное значение экспрессии до и после дифференцировки для стволовых клеток из мочи было на уровне отрицательного контроля, поэтому относительное изменение экспрессии не подсчитано.

Обсуждение

Существует лишь ограниченное количество опубликованных работ, сообщающих о приобретении стволовыми клетками фенотипа уротелиальных клеток в культуре под воздействием высоких концентраций EGF [Bodin и др., 2010]. При этом в данных работах не рассматриваются молекулярные механизмы, лежащие в основе такой дифференцировки. EGF впервые был выделен и описан в 1962 году [Cohen, 1962]. EGF – это короткий пептид, состоящий из 53 аминокислот. Он является базовым представителем семейства факторов роста, включающих в себя TGF- α , heparin-binding EGF (HB-EGF), амфирегулин, бетацеллюлин, эпирегулин. EGF был обнаружен во множестве биологических жидкостей, включая молоко, слюну, мочу, плазму, амниотическую жидкость и др. Биологическая роль EGF также обширна. EGF действует через рецепторы EGFR, которые связаны с множеством внутриклеточных молекулярных путей, таких как Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR и PLC γ /PKC. EGF играет важную роль на ранних этапах эмбрионального развития. Во взрослом организме EGF является регулятором поведения стволовых клеток множества тканей, таких как нейральные

стволовые клетки, стволовые клетки сердечной ткани, МСК костного мозга, стволовые клетки кишечника и др. Растворимый EGF увеличивает пролиферацию МСК в культуре и выживаемость нейральных стволовых клеток.

В данной работе не было обнаружено достоверного увеличения экспрессии цитокератинов под воздействием высокой концентрации EGF, несмотря на многочисленные попытки и ранжирование концентрации EGF и исходной плотности посадки клеток, что ставит под вопрос возможность применения EGF для дифференцировки СКМ в клетки уротелия.

3.7 Оценка пролиферативной активности и жизнеспособности СКМ на биоматериале ССС

Для оценки возможности использования СКМ в ТИК был проведен анализ пролиферативной активности СКМ на биоматериале на основе коллагена первого типа (ССС). В качестве контроля пролиферации была использована культура кожных фибробластов человека. Оценка жизнеспособности СКМ и фибробластов после культивирования на биоматериале с применением реагента PrestoBlue на 5-й и 10-й день культивирования показала, что клетки сохраняют жизнеспособность и пролиферируют на биоматериале ССС (рисунок 3.13). Хотя все клоны СКМ показали положительную динамику роста культуры со временем, скорость пролиферации на биоматериале значительно отличались между клонами. Так на 5 сутки культивирования на биоматериале ССС медиана доли клеток от монослоя составила 35,0% при минимальном и максимальном значениях 25,1%, 64,8%, соответственно. К 10 суткам медиана доли клеток от монослоя на биоматериале составила 48,5% при минимальном и максимальном значениях 47,1% и 82,6%, соответственно. Кожные фибробласты человека также показали положительную динамику роста на биоматериале ССС. Медианные значения доли клеток от монослоя на 5-е и 10-е сутки для фибробластов составили 30,0% и 63,3%, соответственно. На рисунке 3.14А показана жизнеспособность клона I139-289-D6 СКМ человека (самого быстрорастущего клона по результатам оценки

жизнеспособности с применением реагента PrestoBlue) на биоматериале ССС с применением флуоресцентной микроскопии клеток. В поле зрения микроскопа практически отсутствуют мертвые клетки. СКМ равномерно распределены на биоматериале, распластаны и занимают большую часть его поверхности. Аналогичные данные по выживаемости клеток на биоматериале ССС получены для кожных фибробластов (рисунок 3.14Б).

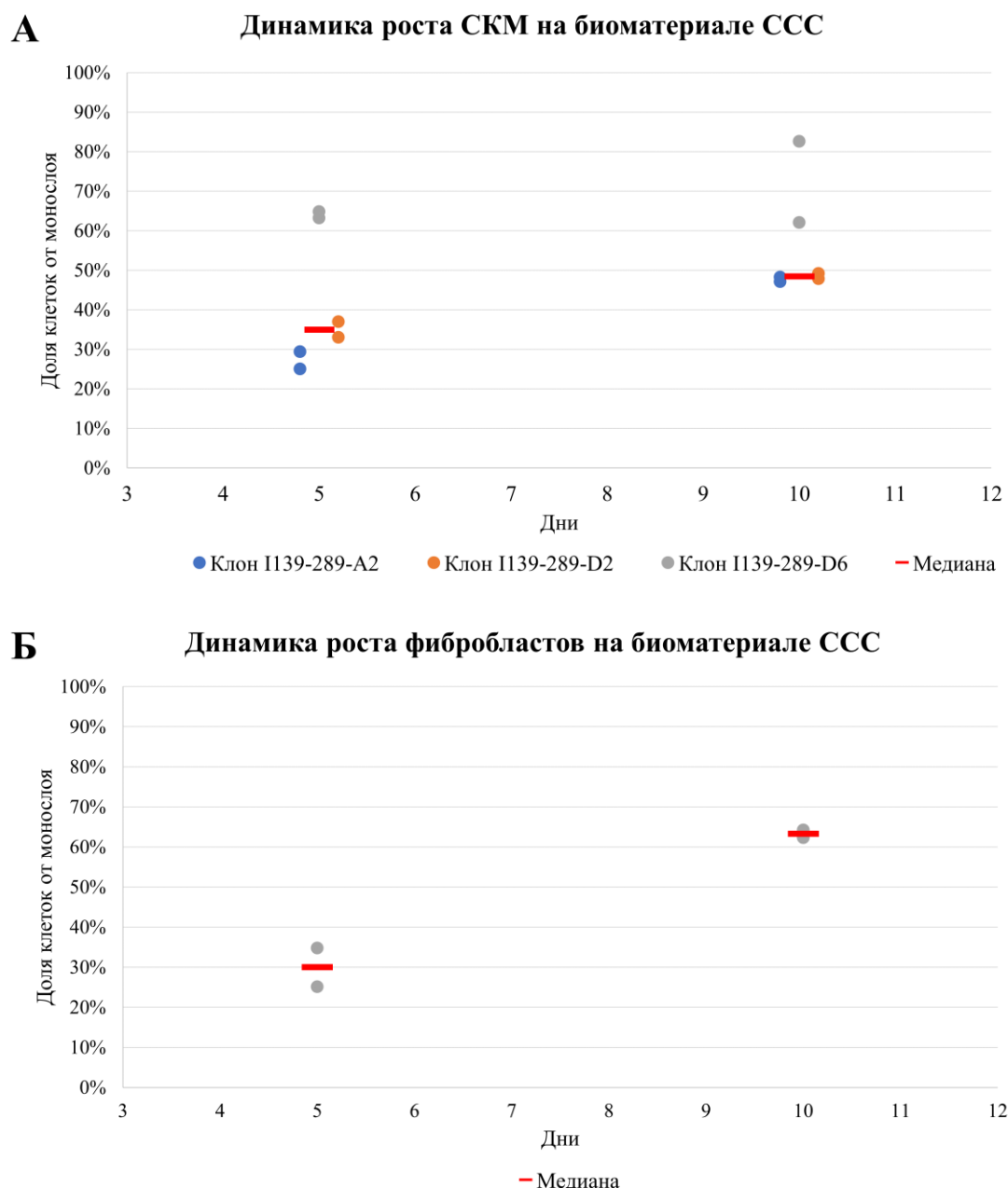


Рисунок 3.13. Жизнеспособность 3 клонов СКМ (А) и фибробластов (Б) человека на биоматериале ССС, определенная методом оценки метаболической активности клеток с применением реагента PrestoBlue.

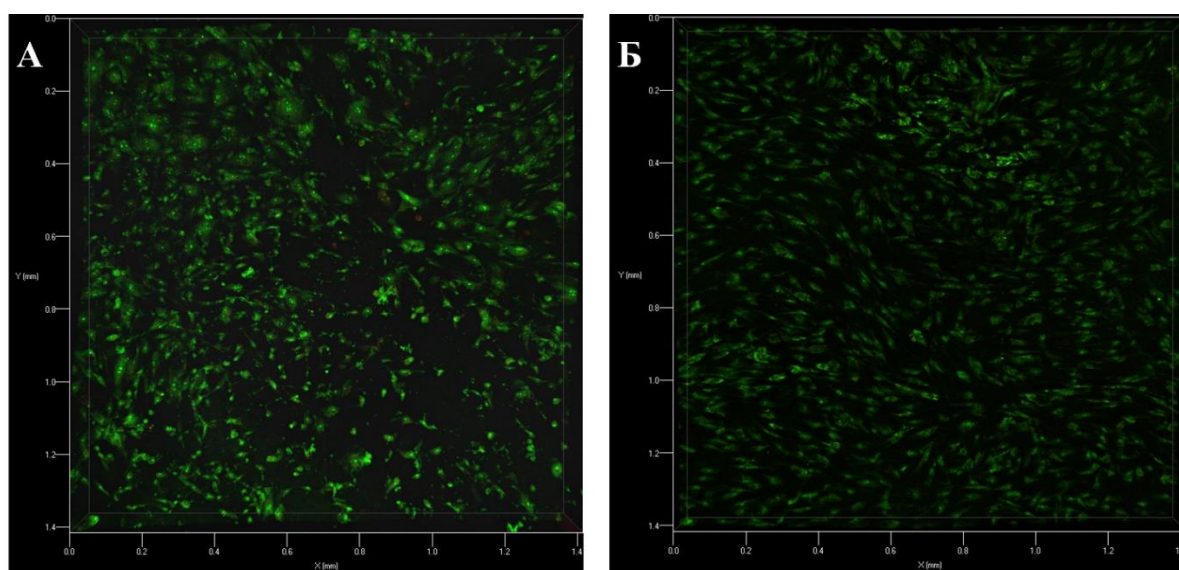


Рисунок 3.14. Флуоресцентные изображения клона I139-289-D6 СКМ (А) и фибробластов (Б) человека, окрашенных флуоресцентными красителями Live/Dead после 5 суток культивирования на биоматериале ССС.

Обсуждение

Для оценки возможности использования СКМ в тканевой инженерии было проведено исследование взаимодействия СКМ с биоматериалом. В качестве биоматериала была выбрана пленка на основе коллагена I типа, полученного из коровьей кожи ССС. Данный скаффолд был подробно исследован для различных типов клеток, его изготовление стандартизовано, он сертифицирован и коммерчески доступен. Биоматериал ССС показал высокую клеточную и биосовместимость для различных типов клеток включая клетки переходного эпителия человека. В настоящей работе показано, что СКМ хорошо пролиферируют на биоматериале ССС. Оценка жизнеспособности СКМ с помощью PrestoBlue и окраска СКМ с помощью Live/Dead системы показали, что клетки прикрепляются к биоматериалу ССС и пролиферируют на нем. Эти данные согласуются с данными некоторых предыдущих исследований, где СКМ успешно использовали вместе с различными типами биоматериалов, включая децеллюляризированный матрикс тонкого кишечника свиньи [Wu и др., 2011],

материалы на основе синтетических полимеров [Guan и др., 2015] и бактериальную целлюлозу [Bodin и др., 2010], для создания тканеинженерных конструкций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные в настоящей диссертационной работе данные можно заключить, что стволовые клетки, выделенные из мочи, представляют собой перспективный источник клеток для регенеративной медицины, так как они могут быть получены неинвазивным путем, могут содержаться в культуре до одного месяца и давать достаточное количество клеток для использования в различных областях регенеративной медицины, включая тканевую инженерию. Также стволовые клетки, выделенные из мочи, способны к длительному выживанию на биоматериале из коллагена первого типа. Особый интерес представляет возможность стволовых клеток, выделенных из мочи, дифференцироваться в гладкомышечные клетки, а также их вероятное происхождение из эпителия проксимального канальца нефрона и капсулы Шумлянско-Боумана. Между тем, результаты данной диссертационной работы ставят под сомнение возможность дифференцировки стволовых клеток, выделенных из мочи, в клетки уротелия под воздействием высокой концентрации эпидермального фактора роста. Поэтому, учитывая важную роль клеток уротелия в тканеинженерной конструкции мочеиспускательного канала в формировании здоровой слизистой при уретропластике, необходимо пересмотреть подходы к использованию стволовых клеток, выделенных из мочи, как источника клеток уротелия в тканевой инженерии мочеиспускательного канала.

ВЫВОДЫ

1. Стволовые клетки, выделенные из мочи, — клетки, встречающиеся в крайне малых количествах в моче, способны к образованию культур *in vitro*, экспрессируют на своей поверхности маркеры мезенхимальных стромальных клеток и других видов стволовых клеток: CD73, CD90, CD105, CD29, CD44, CD54, SSEA4; не экспрессируют маркеры гематопозитических стволовых клеток; имеют эпителиальный фенотип.
2. Стволовые клетки, выделенные из мочи, представляют собой гетерогенную популяцию клеток, содержащую субпопуляцию клеток с фенотипом прогениторных клеток проксимальных канальцев нефрона, субпопуляцию клеток с фенотипом стволовых клеток париетального листка капсулы Шумлянско-Боумана и субпопуляцию клеток с фенотипом предшественников подоцитов.
3. Гладкомышечные клетки мочевого пузыря в культуре имеют высокую экспрессию внутриклеточных маркеров α SMA, кальпонины и десмина и умеренную экспрессию тяжелой цепи миозина. Клетки уротелия мочевого пузыря, имеют высокий уровень экспрессии внутриклеточных цитокератинов AE1/AE3, 7 и 13.
4. Содержание стволовых клеток, выделенных из мочи, в среде с факторами тромбоцитарного фактора роста-BB и трансформирующего фактора роста- β 1 приводит к значительному увеличению экспрессии факторов гладкомышечных клеток α SMA и кальпонины. Содержание стволовых клеток, выделенных из мочи, в среде с высоким содержанием эпидермального фактора роста не приводит к достоверному изменению в экспрессии маркеров уротелия цитокератинов AE1/AE3, 7 и 13.
5. Стволовые клетки, выделенные из мочи, выживают и пролиферируют на биоматериале на основе коллагена первого типа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСК – стволовые клетки из амниотической жидкости

ГМК/SMC – гладкомышечные клетки

α ГМА/ α SMA – α гладкомышечный актин

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Макс – максимум

Me – медиана

Мин – минимум

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

СКМ – стволовые клетки, выделенные из мочи

СО – стандартное отклонение

ТИК – тканеинженерная конструкция

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

АРС – алофикоцианин (allophycocyanin)

ВМР – протеин костного морфогенеза (bone morphogenic protein)

ВРХ – экстракт бычьего гипофиза (bovine pituitary extract)

ССС – биоматериал на основе коллагена первого типа (collagen cell carrier)

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)

СК – цитокератин

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла (Dulbecco's modified Eagle medium)

DPBS - Фосфатно-солевой буфер Дульбекко без кальция и магния (Dulbecco's phosphate buffered saline)

DT – время удвоения популяции (doubling time)

EDTA – этилендиаминтетрауксусной кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)

EGF – эпидермальный фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов 16 (fibroblast growth factor)

FITC – флуоресцеина изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)

FBS – фетальная телячья сыворотка (fetal bovine serum)

Gli1 – эффектор внутриклеточного молекулярного пути Sonic Hedgehog

KSFM – бессывороточная среда для кератиноцитов (keratinocyte serum-free medium)

PCL – поликапролактон (polycaprolactone)

PD – удвоение популяции (population doubling)

PDGF-BB – тромбоцитарный фактор роста с двумя В субъединицами (platelet-derived growth factor-BB)

PDX – подокаликсин

PE – фикоэритрин (phycoerythrin)

PGA – полигликолиевая кислота (polyglycolic acid)

PLA – полимолочная кислота (polylactic acid)

PLGA – сополимер молочной и гликолиевой кислоты (poly-(lactic-co-glycolic acid))

P(LLA-CL) – сополимер L-молочной кислоты и ϵ -капролактона (poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone))

PPAR γ – рецептор-активатор пролиферации пероксисом гамма (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

RGD – аминокислотная последовательность Арг-Гли-Асп

Shh – сигнальная молекула внутриклеточного молекулярного пути Sonic Hedgehog

TGF β – трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β)

VEGF – васкулярно-эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor)

ZO-1 – белок плотных контактов zonula occludens-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васютин И. А. и др. Реконструкция уретры с помощью технологий тканевой инженерии // Вестник РАМН. 2017. Т. 72. № 1. С. 17–25.
2. Иллек Я. Ю. и др. Нефриты у детей. Киров, 2012. 341 с.
3. Коган М. И. Стриктуры уретры у мужчин. Россия, 2010. Вып. Практическая медицина.
4. Acharya P. и др. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004. Т. 287. № 2. С. F305–318.
5. Adamowicz J. и др. New Amniotic Membrane Based Biocomposite for Future Application in Reconstructive Urology // PloS One. 2016. Т. 11. № 1. С. e0146012.
6. Algarrahi K. и др. Repair of injured urethras with silk fibroin scaffolds in a rabbit model of onlay urethroplasty // J. Surg. Res. 2018. Т. 229. С. 192–199.
7. Andrianova I. G., Fedorova Z. D. [Practical method simultaneous extraction of pure fibrinogen and thrombin from blood plasma] // Lab. Delo. 1975. № 11. С. 648–650.
8. Andrich D. E., Greenwell T. J., Mundy A. R. The problems of penile urethroplasty with particular reference to 2-stage reconstructions // J. Urol. 2003. Т. 170. № 1. С. 87–89.
9. Angelotti M. L. и др. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury // Stem Cells Dayt. Ohio. 2012. Т. 30. № 8. С. 1714–1725.
10. Atala A. и др. The potential role of tissue-engineered urethral substitution: clinical and preclinical studies // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2017. Т. 11. № 1. С. 3–19.
11. Atala A., Kasper F. K., Mikos A. G. Engineering complex tissues // Sci. Transl. Med. 2012. Т. 4. № 160. С. 160rv12.
12. Aufderklamm S. и др. Collagen cell carriers seeded with human urothelial cells for urethral reconstructive surgery: first results in a xenograft minipig model // World J. Urol. 2017. Т. 35. № 7. С. 1125–1132.
13. Ball S. G., Shuttleworth C. A., Kielty C. M. Platelet-derived growth factor receptor-alpha is a key determinant of smooth muscle alpha-actin filaments in bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2007. Т. 39. № 2. С. 379–391.

14. Barbagli G. и др. Bulbar urethroplasty using buccal mucosa grafts placed on the ventral, dorsal or lateral surface of the urethra: are results affected by the surgical technique? // J. Urol. 2005. Т. 174. № 3. С. 955- 957; discussion 957-958.
15. Barbagli G. и др. Anterior Urethroplasty Using a New Tissue Engineered Oral Mucosa Graft: Surgical Techniques and Outcomes // J. Urol. 2018. Т. 200. № 2. С. 448–456.
16. Barbagli G., Lazzeri M. Surgical treatment of anterior urethral stricture diseases: brief overview // Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol. 2007. Т. 33. № 4. С. 461–469.
17. Barbagli G., Sansalome S. Oral Mucosal Graft Urethroplasty // Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery / под ред. S. B. Brandes, A. F. Morey. New York, NY: Springer New York, 2014. С. 177–195.
18. Bharadwaj S. и др. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering // Tissue Eng. Part A. 2011. Т. 17. № 15–16. С. 2123–2132.
19. Bharadwaj S. и др. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology // Stem Cells Dayt. Ohio. 2013. Т. 31. № 9. С. 1840–1856.
20. Bodin A. и др. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion // Biomaterials. 2010. Т. 31. № 34. С. 8889–8901.
21. Bouhout S., Chabaud S., Bolduc S. Organ-specific matrix self-assembled by mesenchymal cells improves the normal urothelial differentiation in vitro // World J. Urol. 2016. Т. 34. № 1. С. 121–130.
22. Brandes S. B. Decision Making and Surgical Technique in Urethroplasty // Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery / под ред. S. B. Brandes, A. F. Morey. New York, NY: Springer New York, 2014. С. 1–15.
23. Brighton C. T. и др. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell // Clin. Orthop. 1992. № 275. С. 287–299.
24. Cananzi M., Atala A., Coppi P. de. Stem Cells from Amniotic Fluid // Principles of Regenerative Medicine. : Elsevier, 2011. С. 223–239.
25. Caplan A. I. MSCs in Regenerative Medicine // Principles of Regenerative Medicine. : Elsevier, 2011. С. 253–262.
26. Catelas I., Dwyer J. F., Helgerson S. Controlled release of bioactive transforming growth factor beta-1 from fibrin gels in vitro // Tissue Eng. Part C Methods. 2008. Т. 14. № 2. С. 119–128.

27. Chapin K. и др. In vivo biocompatibility and time-dependent changes in mechanical properties of woven collagen meshes: A comparison to xenograft and synthetic mid-urethral sling materials // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2018.
28. Chen G., Ushida T., Tateishi T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges // J. Biomed. Mater. Res. 2000. T. 51. № 2. С. 273–279.
29. Chun S. Y. и др. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer // Urology. 2012. T. 79. № 5. С. 1186.e1-7.
30. Chun S. Y. и др. Urethroplasty using autologous urethral tissue-embedded acellular porcine bladder submucosa matrix grafts for the management of long-segment urethral stricture in a rabbit model // J. Korean Med. Sci. 2015. T. 30. № 3. С. 301–307.
31. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal // J. Biol. Chem. 1962. T. 237. С. 1555–1562.
32. Crapo P. M., Gilbert T. W., Badylak S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // Biomaterials. 2011. T. 32. № 12. С. 3233–3243.
33. Crisan M. и др. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // Cell Stem Cell. 2008. T. 3. № 3. С. 301–313.
34. D'Amour K. A. и др. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm // Nat. Biotechnol. 2005. T. 23. № 12. С. 1534–1541.
35. Davis N. F. и др. Evaluation of viability and proliferative activity of human urothelial cells cultured onto xenogenic tissue-engineered extracellular matrices // Urology. 2011. T. 77. № 4. С. 1007.e1-7.
36. De Coppi P. и др. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy // Nat. Biotechnol. 2007. T. 25. № 1. С. 100–106.
37. De Filippo R. E. и др. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices // J. Tissue Eng. Regen. Med. 2015. T. 9. № 3. С. 257–264.
38. De Filippo R. E., Yoo J. J., Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices // J. Urol. 2002. T. 168. № 4 Pt 2. С. 1789- 1792; discussion 1792-1793.
39. Dehoux J.-P., Gianello P. The importance of large animal models in transplantation // Front. Biosci. J. Virtual Libr. 2007. T. 12. С. 4864–4880.
40. Dorin R. P. и др. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? // World J. Urol. 2008. T. 26. № 4. С. 323–326.

41. El-Tabey N. и др. Cell-seeded tubular acellular matrix for replacing a long circumferential urethral defect in a canine model: Is it clinically applicable? // Arab J. Urol. 2012. Т. 10. № 2. С. 192–198.
42. Feng C. и др. Reconstruction of three-dimensional neourethra using lingual keratinocytes and corporal smooth muscle cells seeded acellular corporal spongiosum // Tissue Eng. Part A. 2011. Т. 17. № 23–24. С. 3011–3019.
43. Filipas D. и др. The histology and immunohistochemistry of free buccal mucosa and full-skin grafts after exposure to urine // BJU Int. 1999. Т. 84. № 1. С. 108–111.
44. Fu Q. и др. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix // BJU Int. 2007. Т. 99. № 5. С. 1162–1165.
45. Fu Q. и др. The effect of mechanical extension stimulation combined with epithelial cell sorting on outcomes of implanted tissue-engineered muscular urethras // Biomaterials. 2014. Т. 35. № 1. С. 105–112.
46. Graaf P. de и др. Systematic Review to Compare Urothelium Differentiation with Urethral Epithelium Differentiation in Fetal Development, as a Basis for Tissue Engineering of the Male Urethra // Tissue Eng. Part B Rev. 2017. Т. 23. № 3. С. 257–267.
47. Gu G.-L. и др. Tubularized urethral replacement using tissue-engineered peritoneum-like tissue in a rabbit model // Urol. Int. 2012. Т. 89. № 3. С. 358–364.
48. Guan J. и др. Human urine-derived stem cells can be induced into osteogenic lineage by silicate bioceramics via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway // Biomaterials. 2015. Т. 55. С. 1–11.
49. Guan Y. и др. Tissue engineering of urethra using human vascular endothelial growth factor gene-modified bladder urothelial cells // Artif. Organs. 2008. Т. 32. № 2. С. 91–99.
50. Guo H. и др. Urethral Reconstruction with Small Intestinal Submucosa Seeded with Oral Keratinocytes and TIMP-1 siRNA Transfected Fibroblasts in a Rabbit Model // Urol. Int. 2016. Т. 96. № 2. С. 223–230.
51. He C. и др. Fabrication of fibrinogen/P(LLA-CL) hybrid nanofibrous scaffold for potential soft tissue engineering applications // J. Biomed. Mater. Res. A. 2011. Т. 97. № 3. С. 339–347.
52. Hicks R. M. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1975. Т. 50. № 2. С. 215–246.
53. Hirschi K. K., D'Amore P. A. Pericytes in the microvasculature // Cardiovasc. Res. 1996. Т. 32. № 4. С. 687–698.

54. Huang J.-W. и др. Reconstruction of penile urethra with the 3-dimensional porous bladder acellular matrix in a rabbit model // *Urology*. 2014. Т. 84. № 6. С. 1499–1505.
55. Huang J.-W. и др. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model // *Biomed. Mater. Bristol Engl.* 2015. Т. 10. № 5. С. 055005.
56. Humphrey P. A. Male Urethra and External Genitalia Anatomy // *Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery* / под ред. S. B. Brandes, A. F. Morey. New York, NY: Springer New York, 2014. С. 17–23.
57. Hurst R. E. и др. Functional and structural characteristics of the glycosaminoglycans of the bladder luminal surface // *J. Urol.* 1987. Т. 138. № 2. С. 433–437.
58. Itskovitz-Eldor J. и др. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers // *Mol. Med. Camb. Mass.* 2000. Т. 6. № 2. С. 88–95.
59. Jiang S. и др. Urethral Reconstruction Using Mesothelial Cell-Seeded Autogenous Granulation Tissue Tube: An Experimental Study in Male Rabbits // *BioMed Res. Int.* 2017. Т. 2017. С. 1850256.
60. Jones J. C. Hemidesmosomes in bladder epithelial cells // *Urology*. 2001. Т. 57. № 6 Suppl 1. С. 103.
61. Jost S. P., Gosling J. A., Dixon J. S. The morphology of normal human bladder urothelium // *J. Anat.* 1989. Т. 167. С. 103–115.
62. Kajbafzadeh A.-M. и др. The application of tissue-engineered preputial matrix and fibrin sealant for urethral reconstruction in rabbit model // *Int. Urol. Nephrol.* 2014. Т. 46. № 8. С. 1573–1580.
63. Kajbafzadeh A.-M. и др. In vivo human corpus cavernosum regeneration: fabrication of tissue-engineered corpus cavernosum in rat using the body as a natural bioreactor // *Int. Urol. Nephrol.* 2017a. Т. 49. № 7. С. 1193–1199.
64. Kajbafzadeh A.-M. и др. Future Prospects for Human Tissue Engineered Urethra Transplantation: Decellularization and Recellularization-Based Urethra Regeneration // *Ann. Biomed. Eng.* 2017b. Т. 45. № 7. С. 1795–1806.
65. Kanatani I. и др. Fabrication of an optimal urethral graft using collagen-sponge tubes reinforced with Copoly(L-lactide/epsilon-caprolactone) fabric // *Tissue Eng.* 2007. Т. 13. № 12. С. 2933–2940.
66. Kang H. H. и др. Urothelial differentiation of human amniotic fluid stem cells by urothelium specific conditioned medium // *Cell Biol. Int.* 2014. Т. 38. № 4. С. 531–537.

67. Keane T. J. и др. Tissue-Specific Effects of Esophageal Extracellular Matrix // *Tissue Eng. Part A*. 2015. Т. 21. № 17–18. С. 2293–2300.
68. Keane T. J., Saldin L. T., Badylak S. F. Decellularization of mammalian tissues // *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. : Elsevier, 2016. С. 75–103.
69. Kemp V. de и др. Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature // *PloS One*. 2015. Т. 10. № 2. С. e0118653.
70. Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G. Cell biology and physiology of the uroepithelium // *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2009. Т. 297. № 6. С. F1477-1501.
71. Krampera M. и др. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus // *Bone*. 2007. Т. 40. № 2. С. 382–390.
72. Kreplak L. и др. Atomic force microscopy of Mammalian urothelial surface // *J. Mol. Biol*. 2007. Т. 374. № 2. С. 365–373.
73. Kulkarni S. и др. Lichen sclerosus of the male genitalia and urethra: surgical options and results in a multicenter international experience with 215 patients // *Eur. Urol*. 2009. Т. 55. № 4. С. 945–954.
74. Kundu A. K., Gelman J., Tyson D. R. Composite thin film and electrospun biomaterials for urologic tissue reconstruction // *Biotechnol. Bioeng*. 2011. Т. 108. № 1. С. 207–215.
75. Kurpinski K. и др. Proteomic Profiling of Mesenchymal Stem Cell Responses to Mechanical Strain and TGF-beta1 // *Cell. Mol. Bioeng*. 2009. Т. 2. № 4. С. 606–614.
76. Larsson H. M. и др. Fiber density of collagen grafts impacts rabbit urethral regeneration // *Sci. Rep*. 2018. Т. 8. № 1. С. 10057.
77. Latini J. M. и др. SIU/ICUD Consultation On Urethral Strictures: Epidemiology, etiology, anatomy, and nomenclature of urethral stenoses, strictures, and pelvic fracture urethral disruption injuries // *Urology*. 2014. Т. 83. № 3 Suppl. С. S1-7.
78. Lazzeri E. и др. Human Urine-Derived Renal Progenitors for Personalized Modeling of Genetic Kidney Disorders // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 2015. Т. 26. № 8. С. 1961–1974.
79. Le Blanc K. и др. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex // *Scand. J. Immunol*. 2003. Т. 57. № 1. С. 11–20.
80. Lee Y. J., Kim S. W. Current management of urethral stricture // *Korean J. Urol*. 2013. Т. 54. № 9. С. 561–569.

81. Li C. и др. Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts // J. Urol. 2008. Т. 180. № 4. С. 1538–1542.
82. Li H. и др. Epithelial-differentiated adipose-derived stem cells seeded bladder acellular matrix grafts for urethral reconstruction: an animal model // Tissue Eng. Part A. 2014. Т. 20. № 3–4. С. 774–784.
83. Li Y. и др. A Preclinical Study of Cell-seeded Tubularized Scaffolds Specially Secreting LL37 for Reconstruction of Long Urethral Defects // Anticancer Res. 2017. Т. 37. № 8. С. 4295–4301.
84. Liang F. и др. Urothelial hinge as a highly specialized membrane: detergent-insolubility, urohingin association, and in vitro formation // Differ. Res. Biol. Divers. 1999. Т. 65. № 1. С. 59–69.
85. Liu Y. и др. Urethral reconstruction with autologous urine-derived stem cells seeded in three-dimensional porous small intestinal submucosa in a rabbit model // Stem Cell Res. Ther. 2017. Т. 8. № 1. С. 63.
86. Lv X. и др. Structural and functional evaluation of oxygenating keratin/silk fibroin scaffold and initial assessment of their potential for urethral tissue engineering // Biomaterials. 2016a. Т. 84. С. 99–110.
87. Lv X. и др. Electrospun Poly(l-lactide)/Poly(ethylene glycol) Scaffolds Seeded with Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells for Urethral Epithelium Repair // Int. J. Mol. Sci. 2016b. Т. 17. № 8.
88. Lv X. и др. A smart bilayered scaffold supporting keratinocytes and muscle cells in micro/nano-scale for urethral reconstruction // Theranostics. 2018. Т. 8. № 11. С. 3153–3163.
89. Magnan M. и др. Tissue engineering of a genitourinary tubular tissue graft resistant to suturing and high internal pressures // Tissue Eng. Part A. 2009. Т. 15. № 1. С. 197–202.
90. Maitra B. и др. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation // Bone Marrow Transplant. 2004. Т. 33. № 6. С. 597–604.
91. Marchand M. и др. Concurrent generation of functional smooth muscle and endothelial cells via a vascular progenitor // Stem Cells Transl. Med. 2014. Т. 3. № 1. С. 91–97.
92. Martino M. M. и др. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. Т. 110. № 12. С. 4563–4568.

93. Mastropasqua L. Collagen cross-linking: when and how? A review of the state of the art of the technique and new perspectives // *Eye Vis. Lond. Engl.* 2015. Т. 2. С. 19.
94. Micol L. A. и др. In-vivo performance of high-density collagen gel tubes for urethral regeneration in a rabbit model // *Biomaterials.* 2012. Т. 33. № 30. С. 7447–7455.
95. Mikami H. и др. Two-layer tissue engineered urethra using oral epithelial and muscle derived cells // *J. Urol.* 2012. Т. 187. № 5. С. 1882–1889.
96. Min G. и др. Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution // *J. Cell Biol.* 2006. Т. 173. № 6. С. 975–983.
97. Nakanishi Y. и др. Tissue-engineered urinary bladder wall using PLGA mesh-collagen hybrid scaffolds: a comparison study of collagen sponge and gel as a scaffold // *J. Pediatr. Surg.* 2003. Т. 38. № 12. С. 1781–1784.
98. Nishimura G. и др. DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation // *Dev. Cell.* 2006. Т. 11. № 1. С. 93–104.
99. Orabi H. и др. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study // *Eur. Urol.* 2013. Т. 63. № 3. С. 531–538.
100. Osborn S. L. и др. Induction of human embryonic and induced pluripotent stem cells into urothelium // *Stem Cells Transl. Med.* 2014. Т. 3. № 5. С. 610–619.
101. Ovalle W. K. и др. *Netter Bases da Histologia.* , 2008.
102. Pechriggl E. J. и др. The male urethra: spatiotemporal distribution of molecular markers during early development // *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 2013. Т. 195. № 3. С. 260–271.
103. Pinnagoda K. и др. Engineered acellular collagen scaffold for endogenous cell guidance, a novel approach in urethral regeneration // *Acta Biomater.* 2016. Т. 43. С. 208–217.
104. Reing J. E. и др. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds // *Biomaterials.* 2010. Т. 31. № 33. С. 8626–8633.
105. Rezwan K. и др. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials.* 2006. Т. 27. № 18. С. 3413–3431.
106. Ricard-Blum S. The collagen family // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. Т. 3. № 1. С. a004978.
107. Rogovaya O. S. и др. Reconstruction of rabbit urethral epithelium with skin keratinocytes // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 1. С. 70–77.

108. Romagnani P. и др. Next generation sequencing and functional analysis of patient urine renal progenitor-derived podocytes to unravel the diagnosis underlying refractory lupus nephritis // *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 2016. Т. 31. № 9. С. 1541–1545.
109. Ronconi E. и др. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2009. Т. 20. № 2. С. 322–332.
110. Sagrinati C. и др. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2006. Т. 17. № 9. С. 2443–2456.
111. Salem S. A. и др. Polylactic-co-glycolic acid mesh coated with fibrin or collagen and biological adhesive substance as a prefabricated, degradable, biocompatible, and functional scaffold for regeneration of the urinary bladder wall // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013. Т. 101. № 8. С. 2237–2247.
112. Salingcarnboriboon R. и др. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property // *Exp. Cell Res.* 2003. Т. 287. № 2. С. 289–300.
113. Samami H. Computer modeling of the degradation behavior of polyester-based tissue engineering scaffolds // *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds.* : Elsevier, 2016. С. 45–74.
114. Santucci R. A., Joyce G. F., Wise M. Male urethral stricture disease // *J. Urol.* 2007. Т. 177. № 5. С. 1667–1674.
115. Sartoneva R. и др. Comparison of Poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) and Poly(trimethylene carbonate) Membranes for Urethral Regeneration: An In Vitro and In Vivo Study // *Tissue Eng. Part A.* 2018. Т. 24. № 1–2. С. 117–127.
116. Sayeg K. и др. Integration of collagen matrices into the urethra when implanted as onlay graft // *Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol.* 2013. Т. 39. № 3. С. 414–423.
117. Shah N. M., Groves A. K., Anderson D. J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFβ superfamily members // *Cell.* 1996. Т. 85. № 3. С. 331–343.
118. Sharma A. K. и др. Urinary bladder smooth muscle regeneration utilizing bone marrow derived mesenchymal stem cell seeded elastomeric poly(1,8-octanediol-co-citrate) based thin films // *Biomaterials.* 2010. Т. 31. № 24. С. 6207–6217.
119. Shin K. и др. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder // *Nature.* 2011. Т. 472. № 7341. С. 110–114.

120. Singh M., Blandy J. P. The pathology of urethral stricture // *J. Urol.* 1976. T. 115. № 6. С. 673–676.
121. Southgate J. и др. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification // *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 1994. T. 71. № 4. С. 583–594.
122. Souza G. F. и др. Histopathological evaluation of urethroplasty with dorsal buccal mucosa: an experimental study in rabbits // *Int. Braz J Urol Off. J. Braz. Soc. Urol.* 2008. T. 34. № 3. С. 345– 351; discussion 351-354.
123. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* 2006. T. 126. № 4. С. 663–676.
124. Tomlins P. Material types for tissue scaffolds // *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds.* : Elsevier, 2016. С. 1–21.
125. Vardouli L., Moustakas A., Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta // *J. Biol. Chem.* 2005. T. 280. № 12. С. 11448–11457.
126. Varley C. L. и др. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation // *J. Cell. Physiol.* 2006. T. 208. № 2. С. 407–417.
127. Walz T. и др. Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed «twisted ribbon» structure // *J. Mol. Biol.* 1995. T. 248. № 5. С. 887–900.
128. Wang D. и др. Repair of urethral defects with polylactid acid fibrous membrane seeded with adipose-derived stem cells in a rabbit model // *Connect. Tissue Res.* 2015. T. 56. № 6. С. 434–439.
129. Wang F. и др. Urethral reconstruction with tissue-engineered human amniotic scaffold in rabbit urethral injury models // *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2014. T. 20. С. 2430–2438.
130. Wang Z. и др. Smooth Muscle Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells for Treatment of Stress Urinary Incontinence // *Stem Cells Dev.* 2016. T. 25. № 6. С. 453–461.
131. Wessells H., McAninch J. W. Current controversies in anterior urethral stricture repair: free-graft versus pedicled skin-flap reconstruction // *World J. Urol.* 1998. T. 16. № 3. С. 175–180.
132. Wu S. и др. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering // *Biomaterials.* 2011. T. 32. № 5. С. 1317–1326.

133. Wu X.-R. и др. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease // *Kidney Int.* 2009. Т. 75. № 11. С. 1153–1165.
134. Xie M. и др. Evaluation of stretched electrospun silk fibroin matrices seeded with urothelial cells for urethra reconstruction // *J. Surg. Res.* 2013. Т. 184. № 2. С. 774–781.
135. Xie M. и др. Tissue-engineered buccal mucosa using silk fibroin matrices for urethral reconstruction in a canine model // *J. Surg. Res.* 2014. Т. 188. № 1. С. 1–7.
136. Xu J., Lamouille S., Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition // *Cell Res.* 2009. Т. 19. № 2. С. 156–172.
137. Yannas I. V. Emerging rules for inducing organ regeneration // *Biomaterials.* 2013. Т. 34. № 2. С. 321–330.
138. Zamiri P. и др. The biocompatibility of rapidly degrading polymeric stents in porcine carotid arteries // *Biomaterials.* 2010. Т. 31. № 31. С. 7847–7855.
139. Zhang K. и др. Application of Wnt Pathway Inhibitor Delivering Scaffold for Inhibiting Fibrosis in Urethra Strictures: In Vitro and in Vivo Study // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Т. 16. № 11. С. 27659–27676.
140. Zhang Y. и др. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction // *J. Urol.* 2008. Т. 180. № 5. С. 2226–2233.
141. Zhou S. и др. Fabrication of Tissue-Engineered Bionic Urethra Using Cell Sheet Technology and Labeling By Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide for Full-Thickness Urethral Reconstruction // *Theranostics.* 2017. Т. 7. № 9. С. 2509–2523.