

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-101-114

ФОРМИРОВАНИЕ МОНОСЛОЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОВЕРХНОСТИ СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА МАЛОГО ДИАМЕТРА В УСЛОВИЯХ ПОТОКА

М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.О. Кривкина, Т.В. Глушкова, В.В. Севостьянова, А.Г. Кутихин, Л.В. Антонова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

Цель: создать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с использованием аутологичных эндотелиальных клеток и белков внеклеточного матрикса и оценить эффективность формирования эндотелиального монослоя при прекондиционировании напряжением сдвига в сосудистом протезе малого диаметра. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга из смеси полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) изготовлены PHBV/PCL-трубчатые каркасы протезов сосудов и модифицированы фибрином. Для заселения в протезы из крови пациентов с ишемической болезнью сердца выделили культуру эндотелиальных клеток. Фенотипирование культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) проводили методом проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии, также исследовали пролиферативную и ангиогенную активность клеток. Клеточнозаселенные сосудистые каркасы культивировали в установке пульсирующего потока с итоговым напряжением сдвига 2,85 дин/см². Влияние пульсирующего потока на формирование монослоя оценивали методами иммунофлуоресцентной, сканирующей электронной, атомной силовой микроскопии, полнотранскриптомным секвенированием. **Результаты.** Под влиянием пульсирующего потока эндотелиальные клетки, заселенные в трубчатый каркас, продемонстрировали увеличение уровня экспрессии белков эндотелиального профиля, фокальной адгезии и цитоскелета. Выявлены преимущества культивирования клеточнозаселенных сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см² в сравнении со статическими условиями, что отразилось на формировании устойчивой адгезии эндотелиальных клеток, а также цитоскелетных перестройках. Полнотранскриптомное секвенирование показало, что напряжение сдвига индуцировало повышение уровня экспрессии дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих белки, обеспечивающие развитие сосудов, целостность эндотелия, эндотелиальный метаболизм. Разработан протокол изготовления персонализированного клеточнозаселенного биодеградируемого сосудистого протеза малого диаметра в условиях пульсирующего потока. **Заключение.** Использование аутологичных фибрина и культуры КФЭК и прекондиционирование напряжением сдвига позволяют получить персонализированный клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с непрерывным функциональным эндотелиальным монослоем, адаптированным к потоку.

Ключевые слова: тканевая инженерия, аутологичные эндотелиальные клетки, пульсирующий поток, персонализированный сосудистый протез.

Для корреспонденции: Ханова Мария Юрисовна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (904) 374-36-61. E-mail: khanovam@gmail.com

Corresponding author: Mariam Khanova. Address: 6, Sosnovy bulvar, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Phone: (904) 374-36-61. E-mail: khanovam@gmail.com

ENDOTHELIAL CELL MONOLAYER FORMATION ON A SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFT SURFACE UNDER PULSATILE FLOW CONDITIONS

M.Yu. Khanova, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva, E.O. Krivkina, T.V. Glushkova, V.V. Sevostianova, A.G. Kutikhin, L.V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Objective: to create a cell-populated small-diameter vascular graft (SDVG) using autologous endothelial cells and extracellular matrix proteins, and to evaluate the efficiency of endothelial cell monolayer formation during shear stress preconditioning in a SDVG. **Materials and methods.** PHBV/PCL tubular scaffolds of vascular grafts were made by electrospinning from a mixture of polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV) copolymer and polycaprolactone (PCL) and modified with fibrin. To populate the graft, an endothelial cell culture was isolated from the blood of patients with coronary heart disease. Phenotyping of endothelial colony-forming cell (ECFC) culture was performed by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. Cell proliferative and angiogenic activity were also studied. Cell-populated vascular scaffolds were cultured in a pulsatile flow setup with a final shear stress of 2.85 dyne/cm². The effect of pulsatile flow on monolayer formation was assessed by immunofluorescence, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and whole-transcriptome RNA sequencing. **Results.** Under the influence of pulsatile flow, endothelial cells that were seeded into the tubular scaffold showed an increase in the expression level of endothelial profile proteins, focal adhesion and cytoskeleton. In contrast to endothelial cell culture on a vascular graft surface under static conditions, when cultured under pulsatile flow with 2.85 dyne/cm² shear stress, endothelial lining cells have an increased ability to adhere and are oriented along the pulsatile flow path. Whole-transcriptome RNA sequencing showed that induced shear stress increased expression levels of differentially expressed genes encoding proteins that ensure vascular development, endothelial integrity, and endothelial metabolism. A protocol for fabrication of a personalized cell-populated biodegradable SDVG under pulsatile flow conditions was developed. **Conclusion.** The use of autologous fibrin and ECFC culture, as well as shear stress preconditioning, allow to obtain a personalized cell-populated SDVG with continuous functional endothelial monolayer adapted to the flow.

Keywords: tissue engineering, autologous endothelial cells, pulsatile flow, personalized vascular graft.

ВВЕДЕНИЕ

Создание биodeградируемых протезов сосудов малого диаметра, способных после имплантации резорбироваться и заменяться новыми собственными сосудами пациента, освобождает от необходимости репротезирования, поэтому представляет собой актуальную задачу тканевой сосудистой инженерии [1, 2]. Исследователи ведут поиск идеальной культуры, которая обладала бы высоким пролиферативным потенциалом и полноценной функциональной активностью, а также доступностью воспроизведения.

Считается, что для предупреждения тромбоза тканеинженерных сосудистых протезов весьма эффективной может быть эндотелизация протезов *in vitro* или ранняя стимулированная эндотелизация разрабатываемых конструкций *in situ* [3–5].

Эндотелиальные клетки сосудов постоянно подвергаются напряжению сдвига из-за силы трения, создаваемой током крови. Посредством активации механосенсоров они распознают изменения локального напряжения сдвига и циклическую деформацию, модулируется внутриклеточная передача сигналов, что ведет к изменениям экспрессии генов, морфологии клеток и структурному ремоделированию [6].

В прямой части сосуда напряжение сдвига и циклическое растяжение имеют четко определенные направления, ответ эндотелиальных клеток на направленные механические стимулы включает ремоделирование структуры цитоскелета, чтобы минимизировать внутриклеточный стресс. Эти адаптивные изменения способствуют поддержанию гомеостаза и оказывают атеропротекторный эффект. В сосудистой сети сложной геометрии возникают разнонаправленные механические стимулы, которые могут способствовать атерогенезу в этих областях [7].

Эндотелизация протезов *in vitro* дорога и требует прекодиционирования клеток напряжением сдвига с целью повышения жизнеспособности и устойчивости клеток к смыванию током крови с поверхности клеточнозаселенного протеза после его имплантации в сосудистое русло [8–9]. Также бытует мнение, что из периферической крови невозможно в большом количестве получить аутологичные эндотелиальные клетки [10–12]. Поэтому в целях клеточного заселения внутренней поверхности трубчатых каркасов ученые зачастую прибегали к использованию мононуклеарной фракции костного мозга или стромально-васкулярной фракции жировой ткани либо применя-

ли индуцированные плюрипотентные клетки, дабы соблюсти персонифицированность биологического материала, выступающего в качестве источника собственных сосудистых клеток [13–15].

В своих предыдущих работах мы показали возможность получения аутологичных КФЭК с высоким пролиферативным потенциалом из мононуклеарной фракции крови большинства пациентов с ишемической болезнью сердца [16].

Адгезии эндотелиальных клеток к полимерной основе препятствует гидрофобность поверхности, ее чужеродный молекулярный состав и отсутствие сайтов клеточной адгезии. С целью устранения этих факторов проводят модификацию поверхности различными белками внеклеточного матрикса. В тканевой инженерии в качестве подложки обычно используют белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, желатин) животного происхождения либо аллогенные, что повышает риск негативного иммунного ответа после имплантации протеза в сосудистое русло. Использование в качестве фидерного слоя аутологичного фибрина, полученного из периферической крови пациента, позволит снизить иммуногенность биодеградируемого полимерного сосудистого протеза с белковым покрытием. Использование аутологичных фибрина и культуры КФЭК позволит сконструировать персонифицированный сосудистый протез малого диаметра, а культивирование в установке пульсирующего потока – адаптировать эндотелиальные клетки к активным механическим стимулам, существующим в естественном кровотоке.

Цель работы – создать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с использованием аутологичных эндотелиальных клеток и белков внеклеточного матрикса и оценить эффективность формирования эндотелиального монослоя в условиях preconditionирования напряжением сдвига.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление биодеградируемых трубчатых каркасов

Полимерные биодеградируемые трубчатые каркасы из смеси 5% раствора поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксиивалерата) (PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% раствора поли(ε-капролактона) (PCL, Sigma-Aldrich, США), растворенных в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1 : 2, изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC, Япония). Для изготовления каркасов использовали иглы калибра 22G. Напряжение на игле – 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,3 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об./мин, расстояние от иглы до на-

моточного коллектора – 15 см, диаметр намоточного коллектора – 4 мм.

Модифицирование фибрином внутренней поверхности трубчатых каркасов

Внутреннюю поверхность трубчатых каркасов модифицировали фибрином. Фибриноген выделяли из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. Забор крови выполнялся после получения добровольного информированного согласия на использование биологического материала в научно-исследовательских целях. Исследование было одобрено ЛЭК (протокол № 20 от 9.12.2020). Кровь, забранную в вакуумные пробирки с цитратом натрия, центрифугировали при 2000 g 10 мин, полученную плазму охлаждали до 4 °С. В плазму при постоянном перемешивании добавляли холодный этанол (70 об. %, 4 °С) в соотношении 4 : 1 (плазма/этанол). Сразу после этого раствор центрифугировали при 600 g при 4 °С в течение 5 мин. Надосадочную плазму декантировали и осадок фибриногена растворяли в 0,9% NaCl₂ с HEPES при 37 °С (до концентрации фибриногена 30–40 мг/мл) [17]. Фибриноген полимеризовали с помощью тромбина и CaCl₂. Полимерные графты погружали и пропитывали полученным раствором фибриногена. Далее на поверхность трубчатого каркаса наносили раствор тромбина 500 IU/мл (Thrombin from human plasma, T7009, Sigma-Aldrich, США) и CaCl₂ 40 ммоль/л для полимеризации фибрина. После полимеризации трубчатый каркас погружали в натрий-фосфатный буферный раствор (PBS) с ε-аминокапроновой кислотой 2 мг/мл до последующего заселения клетками.

Получение КФЭК

Для заселения сосудистых протезов использовали культуру колониеформирующих эндотелиальных клеток мононуклеарной фракции периферической крови, обладающих высокой пролиферативной активностью и полноценной функциональностью. Кровь брали у пациентов с ишемической болезнью сердца (группа пациентов, которым при дальнейшем развитии заболевания потребуется протезирование в объеме АКШ) после получения добровольного информированного согласия на использование биологического материала в научно-исследовательских целях. Получение культуры КФЭК основано на культивировании мононуклеарной фракции (МНФ) крови в средах, содержащих ростовые факторы. Исследования проводились на базе ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и были одобрены ЛЭК (протокол № 20 от 9.12.2020). Методика культивирования, иммунофенотипирование и исследование функциональных свойств полу-

ченной культуры представлены ранее в публикации нашего коллектива [16]. Проведено сравнительное исследование профиля генной экспрессии культуры КФЭК с культурой зрелых клеток коронарной артерии НСАЕС [18].

Фенотипирование культуры с помощью проточной цитометрии

Для окрашивания отбирали 1×10^5 клеток полученной культуры, отмытой PBS. В работе использовали комбинации моноклональных антител, конъюгированных различными красителями: с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) – CD3 (BC, A07746), CD34 (BC, IM1870U), vWF (abcam, ab8822); с фикоэритрином (PE) – CD309 (BD, 560494), CD14 (BC, A07764); с аллоцикоцианином (APC) – CD133 (MACS, 130-090-826), CD31 (BL, 303115); с фикоэритрином-цианином 7 (PC7) – CD146 (BL, 361008); с Pacific Blue 450 (PB 450) – HLA DR (BL, 307633); с Krome Orange (KrOr) – CD45 (BC, A96416).

Пробоподготовку проводили согласно протоколам фирм-производителей по двум панелям: 1) CD3, CD14, HLADR, CD45; 2) CD34, KDR, CD146, CD133, CD31, CD45. Культуру клеток с морфологией «булыжной мостовой» дополнительно окрашивали vWF, CD146. В качестве контроля использовали культуру, окрашенную антителами соответствующего изотипического контроля, CD146 – PC7 Mouse IgG1 (BL, 400127), CD31, CD133 – APC Mouse IgG1 (BL, 400121), CD309 – PE Mouse IgG1 (BD, 550617), CD3, CD3, CD34 – FITC Mouse IgG1 (BC, A07795), CD14 – PE Mouse IgG2 α (BC, 559319), CD45 – KrOr Mouse IgG1 (BC, A96415), HLA DR – PB Mouse IgG2 α (BL, 400235). При окрашивании внутриклеточного белка vWF выполняли фиксацию и пермеабиллизацию клеток с применением набора IntraPrep (BC, A07803, США). Далее пробы ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (BC, США) в программе CytExpert. Настройку прибора для каждой панели выполняли с использованием контрольных проб, окрашенных соответствующими изотипами, дальнейший анализ всех образцов выполнен на единых настройках прибора.

Заселение клетками биodeградируемого трубчатого каркаса

В PNBV/PCL-каркасы вводили суспензию КФЭК в концентрации 700 тыс./мл. Первые 8 ч после заселения сосудистые протезы переворачивали каждые 30 мин для равномерного распределения клеток по поверхности. Через сутки культуральную среду заменяли. Общее время культивирования сосудистых протезов в статических условиях составило 2 суток.

После этого сосудистые протезы подключали в установку пульсирующего потока (Harvard Apparatus, США) на предварительных настройках, обеспечивающих напряжение в $1,27$ дин/см² в течение суток. Затем постепенно увеличивали напряжение, доводя до $2,85$ дин/см². Рабочий режим культивирования в установке пульсирующего потока включал в себя следующие параметры: частота выброса – 20 уд./мин, объем выброса – 0,7 мл, итоговое напряжение сдвига – $2,85$ дин/см². В таком режиме продолжали культивирование в течение 5 суток в стерильных условиях в CO₂-инкубаторе при 37 °C. Для контроля аналогичные сосудистые протезы культивировали в статических условиях.

Сканирующая электронная микроскопия

Внутреннюю поверхность трубчатых каркасов исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии на различных этапах (до и после модифицирования фибрином PNBV/PCL-каркасов, после заселения КФЭК) на микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума. Подготовка образцов заключалась в фиксации в глутаровом альдегиде (Sigma, США) в течение суток с последующим замораживанием и лиофилизацией в установке Freezone 2.5 (Labonco, США) при температуре -40 °C и давлении $<0,133$ мбар. После этого образцы монтировали на специальные столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее золото-паладиевое покрытие толщиной 7 нм в установке EM CE200 (Leika Mikro-systeme GmbH, Австрия).

Иммунофлуоресцентное исследование

После окончания культивации проводили иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиального слоя, сформированного на внутренней поверхности сосудистого протеза. Сосудистый протез фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин, затем разрезали вдоль и фиксировали в раскрытом состоянии на предметных стеклах внутренней поверхностью вверх. Клетки на внутренней поверхности окрашивали на маркеры эндотелиальных клеток: CD31, VEGFR2 (CD309), CD144, vWF, маркер адгезии F-actin и Talin. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (vWF, F-actin) проводили пермеабиллизацию 0,01% раствором Triton X-100. На F-actin окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor™ 568 Phalloidin, A12380, Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для остальных маркеров использовали первичные антитела: Mouse anti-CD31 (ab119339), Rabbit anti-VEGFR2 (ab2349), Rabbit anti-CD144 (ab33168), Sheep anti-vWF – FITC (ab8822), Rabbit

anti-Talin (ab71333) и вторичные антитела: Donkey anti-Mouse IgG Highly Cross-Adsorbed – AF555 (A-31570), Donkey anti-Rabbit IgG Highly Cross-Adsorbed – AF488 (A-21206) (Thermo Fisher, США). Инкубацию с первичными антителами производили при 4 °C в течение 16 часов, с вторичными – при комнатной температуре в течение часа. Для блокировки неспецифического связывания использовали раствор 1% бычьего сывороточного альбумина. Образцы докрашивали DAPI (Sigma, США). Готовые стекла заключали в ProLong (Life technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Оценка клеточной адгезии и жизнеспособности

Адгезию и жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности сосудистых протезов оценивали путем флуоресцентной микроскопии. Образцы отмывали в PBS, последовательно вносили Hoechst 33342 (10 мкг/мл, 14533, Sigma Aldrich, США), затем с этидиум бромидом (30 мкг/мл, 46067, Sigma Aldrich, США) и инкубировали в течение 10 минут и 1 минуты соответственно. Образцы анализировали на лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Zeiss, Германия). Клеточную адгезию оценивали путем подсчета ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342, в поле зрения. Анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении $\times 200$. Полученные результаты пересчитывали и представляли как ед/мм².

Относительное количество мертвых клеток высчитывали по формуле: абсолютное количество мертвых клеток $\times 100\%$ / абсолютное количество всех адгезированных клеток. Относительное количество живых клеток определяли путем вычитания доли мертвых клеток из 100% адгезированных клеток.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7. Данные представлены как медианы (Me) и квартили (25% и 75%). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Полнотранскриптомное секвенирование

Для проведения полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали культуру КФЭК в количестве 10 млн клеток. Клетки были лизированы тризолом (15596018, Invitrogen, США) с последующим выделением тотальной РНК при помощи набора

Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen, США) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich, США). Качество РНК контролировали с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067-1513, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) по индексу целостности РНК (RNA integrity index, RIN). Оценку количества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и флуорометре Qubit 4 (Invitrogen, США). Для 1 мкг выделенной РНК проводили деплецию рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen, Австрия) с дальнейшим формированием ДНК-библиотек (SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit, 042.96, Lexogen, Австрия). Качество полученных ДНК-библиотек анализировали с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). Количественный анализ ДНК-библиотек осуществляли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (RT-qPCR) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Далее эквимольно смешивали ДНК-библиотеки и секвенировали на платформе HiSeq 2000 (Illumina) с длиной парно-концевых прочтений 2×125 нуклеотидов.

Полученные прочтения фильтровали по качеству ($QV > 20$), длине (>20), с помощью программы TrimGalore v.0.4.4 удаляли адаптерную последовательность. После фильтрации среднее количество ридов превышало 10 миллионов. Их картирование на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводили с использованием программы CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: Similarity fraction = 0.8, Length fraction = 0.8, Mismatch cost = 2, Insertion cost = 3, Deletion cost = 3; в итоге были получены файлы в формате .bam. Для оценки дифференциальной экспрессии генов использовали мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели, используемой в программах EdgeR и DESeq2.

Значение индекса целостности РНК (RIN), выделенной из культуры КФЭК, было не менее 8, что свидетельствовало о ее высоком качестве и возможности использования для RNA-seq (рекомендуется $RIN \geq 7$). Количество полученной тотальной РНК в образцах составляло не менее 29 мкг, этого было более чем достаточно для деплеции рРНК (рекомендуется ≥ 1 мкг).

Статистический анализ результатов полнотранскриптомного секвенирования

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные пред-

ставлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей, а также минимума и максимума. Группы сравнивали по U-критерию Манна–Уитни. При анализе различий между клеточными культурами статистически значимые дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) определяли по кратности изменения ≥ 2 и скорректированному с учетом средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR) значению $p < 0,05$. Анализ обогащения набора генов на основе геной онтологии (Gene Ontology – GO) проводили в категориях молекулярных функций, биологических процессов и клеточных компонентов с использованием Gene Set Test в CLC GW. При сравнении групп клеток в рассматривали категории с поддержкой

$p < 0,05$ (FDR) и отношением ДЭГ к общему количеству генов более 50%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика аутологических колониформирующих эндотелиальных клеток

Фенотип полученной культуры КФЭК соответствовал фенотипу зрелых эндотелиальных клеток: CD31+CD309+vWF+CD146+, отсутствие экспрессии прогениторных маркеров CD34, CD133 (рис. 1) [16]. Культура обладала высокой пролиферативной активностью. Выявлена полноценная функциональная активность, в том числе ангиогенная [16].

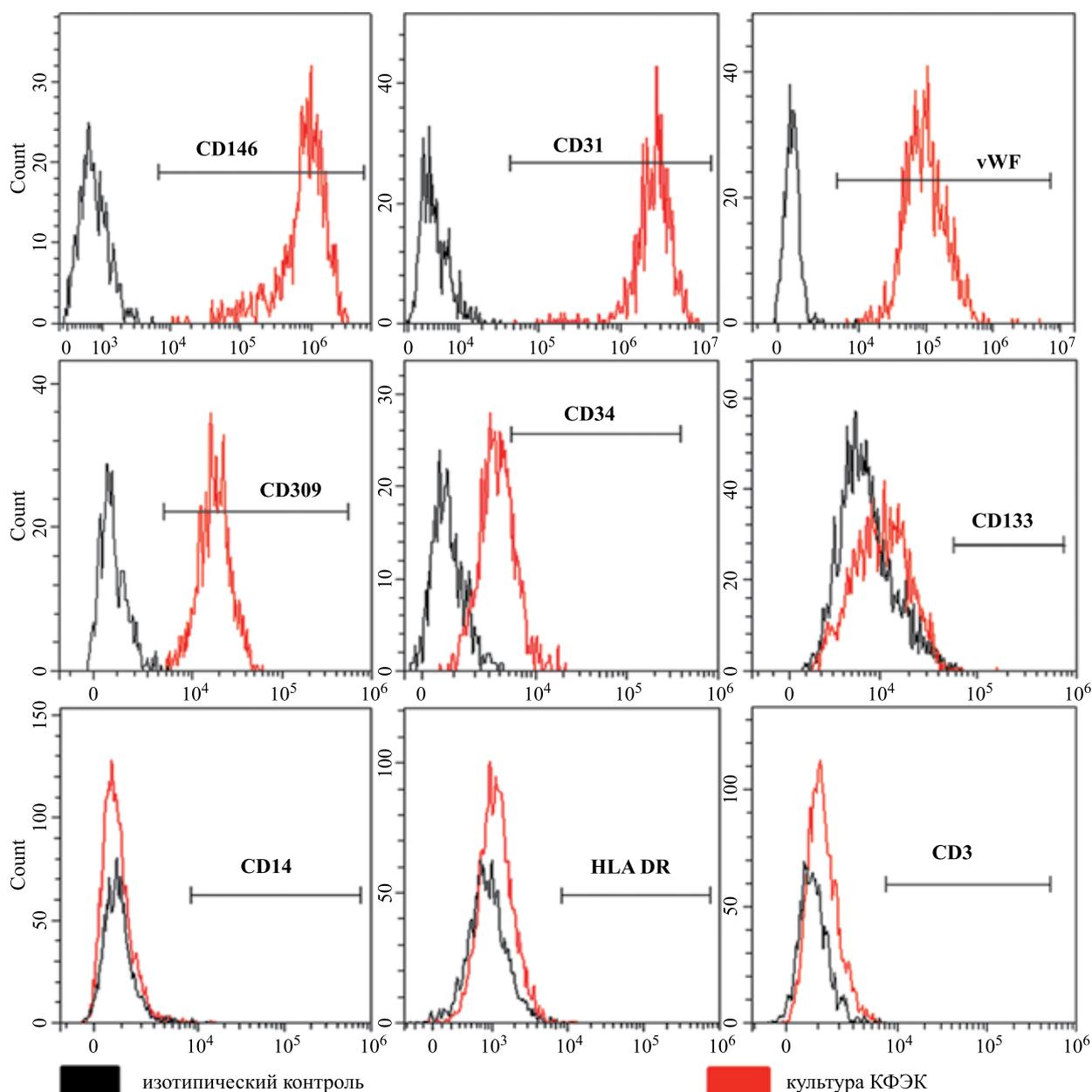


Рис. 1. Фенотип культуры КФЭК. Проточная цитометрия [16]

Fig. 1. ECFC culture phenotype. Flow cytometry [16]

Структура поверхности PHBV/PCL-каркасов до и после модифицирования фибрином

Немодифицированные PHBV/PCL-каркасы обладали однородной высокопористой структурой с хаотичным переплетением нитей. Средний диаметр волокон составил 2,8 [1,9; 3,3] мкм, размер пор – 36,1 [30,2; 38,7] мкм. Модификация поверхности полимерного каркаса фибрином значительно изменила его архитектуру (рис. 2). Выявлено, что при полимеризации фибрин выравнивал поверхность полимерного каркаса, образуя равномерное мелкопористое покрытие их мельчайших разветвленных фибрилл с диаметром волокон 125 [94,0; 152,0] нм и поры размером 273 [176,0; 333,0] нм.

На внутренней поверхности клеточнозаселенных PHBV/PCL/фибрин сосудистых протезов обнаруже-

ны хорошо распластанные эндотелиальные клетки, что свидетельствует о качественной адгезии. В то же время на немодифицированных PHBV/PCL каркасах обнаружено крайне неравномерное распределение КФЭК. При отсутствии фидерного слоя, несущего сайты клеточной адгезии, достаточно плотное приращение клеток не происходило.

Режим культивирования клеточнозаселенного сосудистого протеза в условиях пульсирующего потока

Проведен подбор оптимального режима пульсирующего потока для формирования и сохранения эндотелиальной выстилки на поверхности PHBV/PCL/фибрин сосудистых протезов.

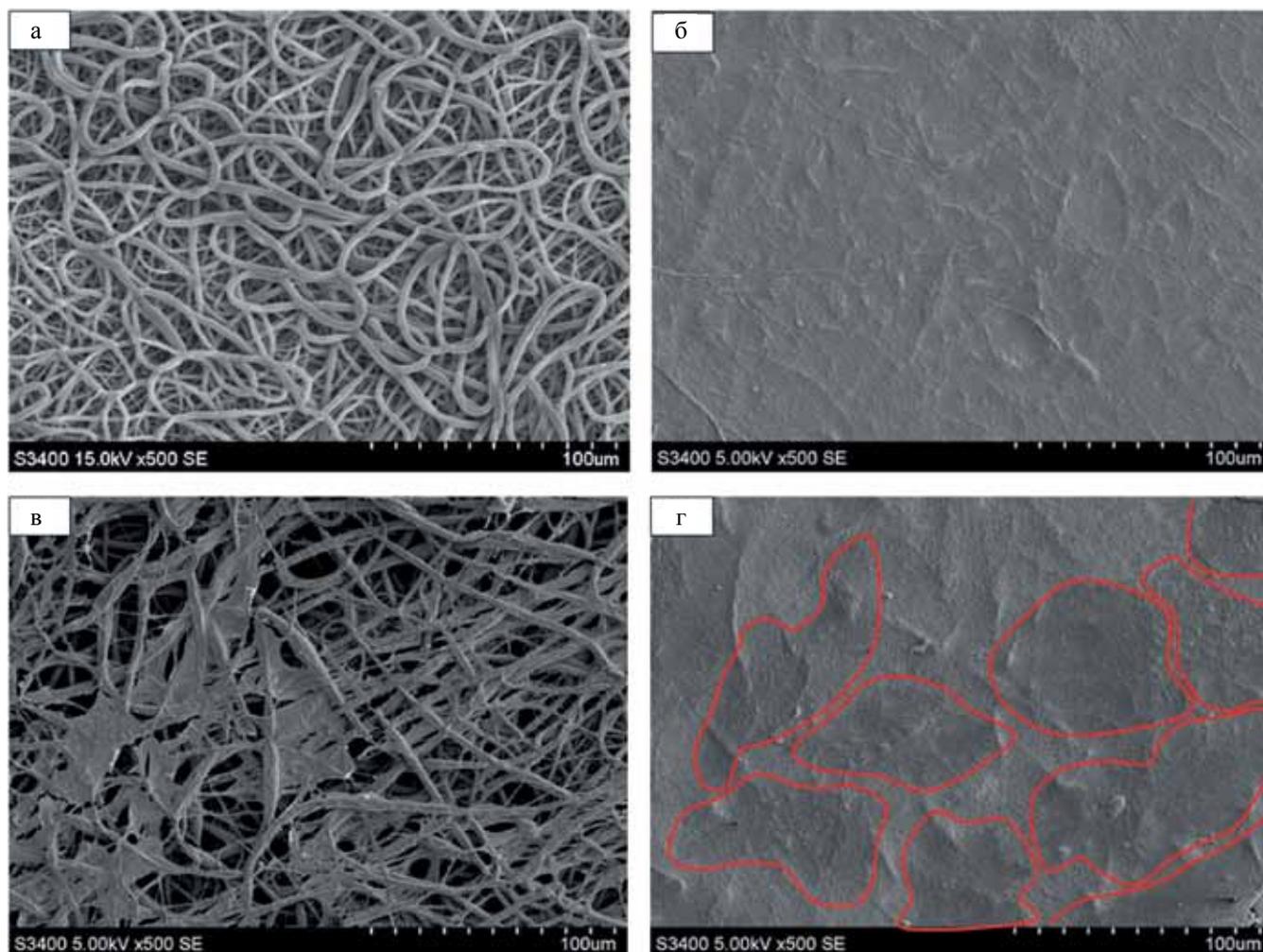


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов: а – PHBV/PCL; б – PHBV/PCL/фибрин, в – PHBV/PCL, заселенные КФЭК; г – PHBV/PCL/фибрин, заселенные КФЭК. Красная линия очерчивает контур клеток. $\times 500$

Fig. 2. Scanning electron microscopy of the inner surface of biodegradable vascular prostheses: a – PHBV/PCL; б – PHBV/PCL/fibrin, в – ECFC-populated PHBV/PCL; г – ECFC-populated PHBV/PCL/fibrin. The red line outlines the cell contour. $\times 500$

Выявлено, что увеличение времени культивирования эндотелиальных клеток на поверхности протезов не приводит к повышению эффективности заселения. По-видимому, это связано с тем, что зрелые эндотелиальные клетки обладают умеренной пролиферативной активностью. Спустя 2 суток культивирования эндотелиальных клеток в статичных условиях большая часть внутренней поверхности протеза была заселена. Через 7 суток в статичных условиях происходила умеренная пролиферация с формированием практически непрерывного клеточного слоя. При культивировании клеток на поверхности протезов в статичных условиях более 7 суток (14-е и 21-е сутки) наблюдали гибель части клеток с нарушением клеточного монослоя.

В условиях пульсирующего потока мы определили следующий оптимальный режим культивирования клеточнозаселенного сосудистого протеза: продолжительность предварительного культивирования в статичных условиях – 2 суток, продолжительность последующего культивирования в установке пульсирующего потока – 5 суток при следующих параметрах пульсирующего потока: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд./мин; напряжение сдвига – 2,85 дин/см². Напряжение сдвига постепенно увеличивали до указанного значения после предварительного культивирования в статичных условиях клеток в течение двух суток.

Результаты клеточного заселения трубчатых каркасов PNBV/PCL/фибрин

Жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток, культивируемых на внутренней поверхности биodeградируемых каркасов PNBV/PCL/фибрин, была полностью сохранена независимо от условий культивирования. Также не было обнаружено статистически значимых отличий в плотности клеточных популяций на единицу площади (рис. 3). Полученные результаты подтверждают, что выбранный режим культивирования не оказывает повреж-

дающего влияния на эндотелиальную выстилку, а фидерный слой из фибрина обеспечил для КФЭК достаточные адгезивные характеристики поверхности.

На основе результатов окраски специфическими антителами проводили анализ влияния пульсирующего потока интенсивностью 2,85 дин/см² на фенотип колониеформирующих эндотелиальных клеток, межклеточные контакты, функциональную активность, организацию цитоскелета, адгезию клеток к поверхности. Было выявлено, что для КФЭК, составляющих монослой на внутренней поверхности трубчатых каркасов PNBV/PCL/фибрин, независимо от условий культивирования был характерен высокий уровень экспрессии специфичных эндотелиальных маркеров: CD31, CD309, CD144, vWF (рис. 4). Тем не менее в динамических условиях культивирования эти показатели были выше, за исключением CD144 (VE-кадгерина). Тем временем ответ на пульсирующий поток отразился в цитоскелетных перестройках. Средняя интенсивность флуоресценции структурного белка F-actin была достоверно выше в динамических условиях культивирования (p < 0,01). Под влиянием напряжения сдвига хаотичная ориентация микрофиламентов F-actin сменилась на преимущественную ориентацию клеток в направлении потока, что отражает адаптацию клеток на воздействие напряжения сдвига. Также адаптивным изменением к потоку является увеличение экспрессии белка точечной адгезии Talin (p < 0,05). Talin связывает интегриновые рецепторы и актиновый цитоскелет, является механочувствительным белком и передает механический сигнал среды клетке, позволяя ей адаптироваться к измененным условиям (табл. 1).

Выявлено изменение морфологии эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях пульсирующего потока. При таком рабочем режиме клетки вытягивались вдоль тока жидкости, плотно контактируя с соседними клетками, чего не наблюдалось в статичных условиях.

Эндотелиальный гомеостаз, поддерживаемый правильным профилем экспрессии генов, влияет на

Таблица 1

Результаты количественного анализа иммунофлуоресцентного окрашивания КФЭК, культивируемых в статических условиях («Статика») и в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см² («Динамика»)

Results of quantitative analysis of immunofluorescent staining of CFECs cultured under static conditions («Statics») and under conditions of a pulsating flow with a shear stress of 2.85 dyn/cm² («Dynamics»)

	Статика Me (25%; 75%)	Динамика Me (25%; 75%)
Средняя интенсивность флуоресценции CD31, у. ед.	50,5 [40,8; 55,3]	56,0 [53,5; 62,3]
Положительно окрашенная площадь CD309, %	2,0 [1,8; 2,3]	3,1 [2,7; 4,3]
Средняя интенсивность флуоресценции CD144, у. ед.	34,5 [31,3; 37,6]	22,0 [19,6; 23,2]
Средняя интенсивность флуоресценции vWF, у. ед.	5,5 [4,0; 7,3]	17,5 [13,5; 23,3]
Положительно окрашенная площадь Talin, %	1,7 [1,6; 1,9]	2,7 [2,1; 3,3]
Средняя интенсивность флуоресценции F-actin, у. ед.	59,7 [52,2; 64,8]	66,5 [62,7; 71,6]

долгосрочную проходимость сосудистого протеза. Чтобы определить, оказывает ли preconditionирование напряжением сдвига влияние на профиль генной экспрессии КФЭК, проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-Seq).

В результате секвенирования ДНК-библиотек были получены парные прочтения длиной 125 нук-

леотидов, общий объем которых варьировал в диапазоне 1–5 млрд пар оснований, а покрытие составляло 9,5–42,7 млн ридов. После фильтрации прочтений по качеству и длине, а также удаления адаптеров их количество практически не изменилось. Картирование прочтений библиотек на геном человека показало, что не менее 98,2% ридов во всех образцах соответ-

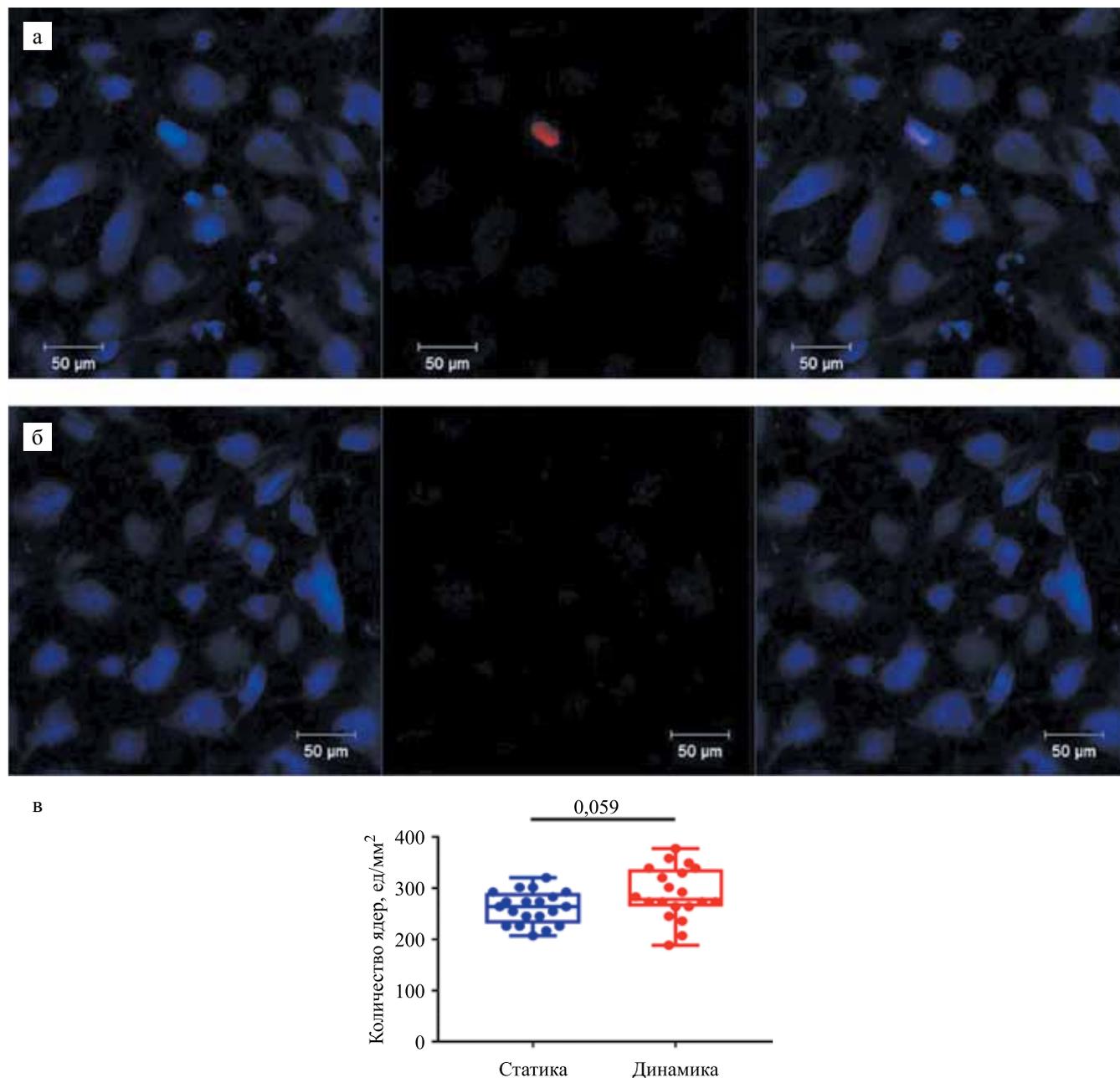


Рис. 3. Жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток человека (КФЭК) при культивировании в течение 7 суток на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/фибрин: а – в статических условиях; б – в условиях пульсирующего потока; в – количественный анализ плотности клеточной популяции, $p < 0,05$. Сочетанная окраска флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (синий) и этидиумом бромидом (красный). Конфокальная лазерная микроскопия, $\times 200$

Fig. 3. Viability of human ECFC when cultured for 7 days on the inner surface of PHBV/PCL/fibrin biodegradable vascular prostheses: а – under static conditions; б – under pulsatile flow conditions; в – quantitative analysis of cell population density, $p < 0.05$. Combined staining with Hoechst 33342 fluorescent (blue) and ethidium bromide (red). Confocal laser microscopy, $\times 200$

ствовали геному человека. При этом большая часть (82,2–90,4) прочтений приходилась на экзоны, т. е., белок-кодирующую часть генов.

Были выявлены различия транскриптомов КФЭК, культивируемых на внутренней поверхности РНВВ/РСЛ/фибрин в статических условиях и в условиях пульсирующего потока. Всего у культуры КФЭК было идентифицировано 185 значимых ДЭГ. ДЭГ были аннотированы с использованием терминов, предложенных в базе данных Gene Ontology для дальнейшего раскрытия их молекулярных характеристик. ДЭГ были разделены на 125 категорий, которые можно условно разделить на 2 обширные группы: эндотелиальный метаболизм (62) и процессы, участвующие в биологии эндотелия (63).

Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов, показал, что воздействие пульсирующего потока активирует метаболизм в КФЭК. Для выявления этих отличий использовали инструмент

Gene Ontology, который обладал преимуществом при анализе ДЭГ в категории «эндотелиальный метаболизм» и позволил определить, что в статике 23 ДЭГ характеризовались повышенной экспрессией, в то время как в динамике – 39 (табл. 2).

Дальнейшее обогащение систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов при помощи укрупнения категорий Gene Ontology (особенно при помощи мануального аннотирования ДЭГ КФЭК) показало, что в ответ на пульсирующий поток наблюдается повышенная экспрессия генов, кодирующих:

- 1) белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (3 ДЭГ в условиях пульсирующего потока (динамических) против 2 ДЭГ в статических условиях);
- 2) белки, ответственные за регуляцию целостности эндотелия (9 ДЭГ в динамических против 6 ДЭГ в статических условиях);

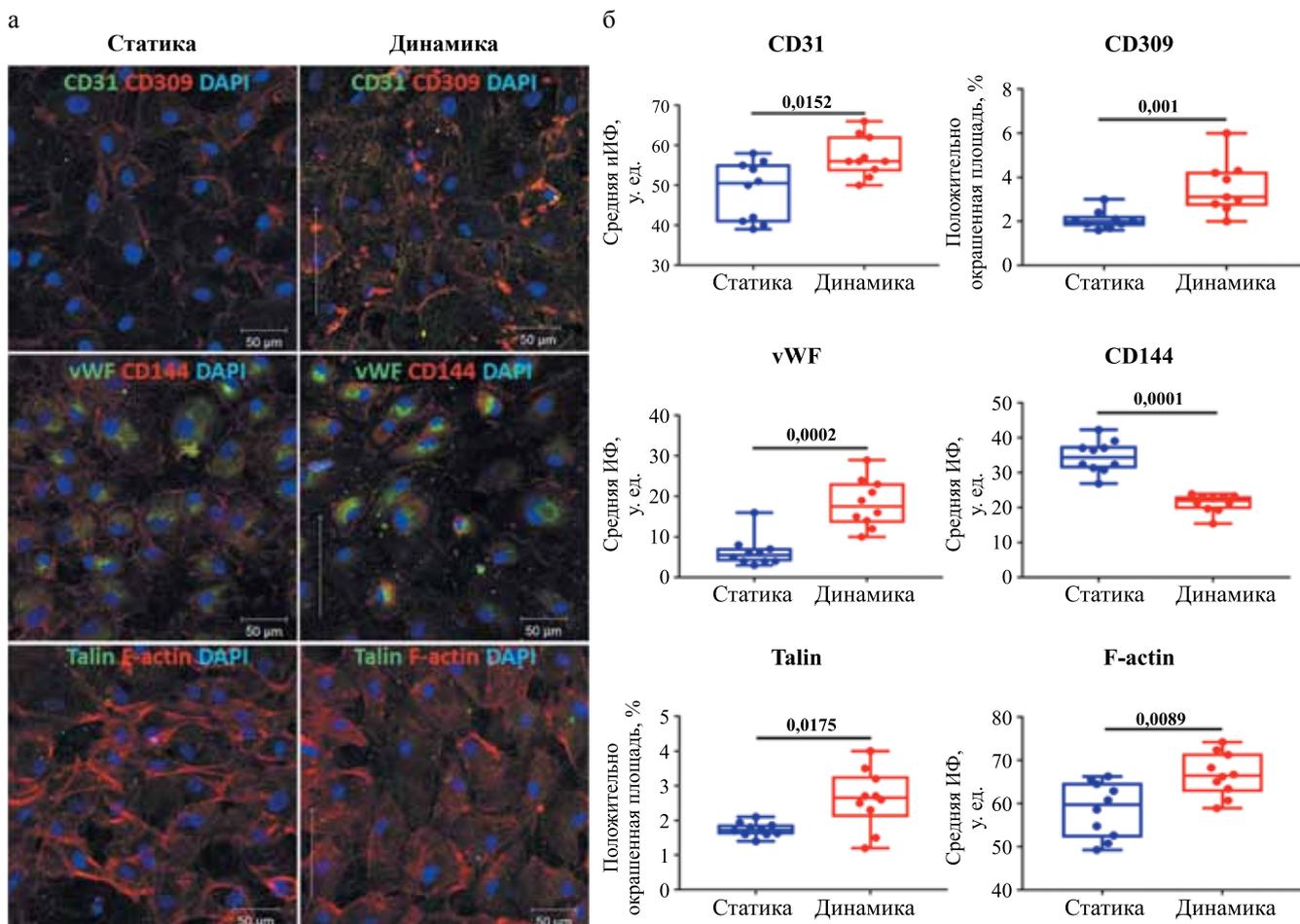


Рис. 4. Сочетанное иммунофлуоресцентное окрашивание колониформирующих эндотелиальных клеток, культивируемых в статических условиях («Статика») и в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см² («Динамика»): CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. а – репрезентативные фотографии, сканирующая конфокальная микроскопия, ×200; б – количественный анализ; ИФ – интенсивность флуоресценции

Fig. 4. Combined immunofluorescence staining of ECFCs cultured under static conditions («Static») and under pulsatile flow conditions with 2.85 dyn/cm² shear stress («Dynamic»): CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. а – representative photographs, scanning confocal microscopy, ×200; б – quantitative analysis; ИФ – fluorescence intensity

- 3) стимулирующие ангиогенез белки (48 ДЭГ в динамических против 33 ДЭГ в статических условиях);
- 4) белки, определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток (17 ДЭГ в динамических против 12 ДЭГ в статических условиях);
- 5) белки, способствующие миграции эндотелиальных клеток (21 ДЭГ в динамических против 15 ДЭГ в статических условиях);
- 6) белки, ответственные за регуляцию воспаления (20 ДЭГ в динамических против 16 ДЭГ в статических условиях) (рис. 5).

Именно мануальное аннотирование позволило установить различия ДЭГ КФЭК в ответ на пульсирующий поток во всех приведенных генных системах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нативный эндотелиальный слой формирует непрерывный, избирательно проницаемый, устойчивый к тромбообразованию барьер между циркулирующей кровью и сосудистой стенкой. Именно эндотелий в большей степени подвергается напряжению сдвига, которое оказывается током крови. Мы предприняли попытку разработать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра в условиях пульсирующего потока. Главной задачей было получить устойчивый к смыванию функциональный слой эндотелия на внутренней поверхности трансплантата. Эффективность выбранного протокола оценивали по формированию эндотелиального монослоя, его целостности и жизнеспособности, влиянию напряжения сдвига на фенотип эндотелиальных клеток.

Под воздействием пульсирующего потока клетки выравнивались относительно друг друга, формировали монослой и осуществляли межклеточные взаимодействия. Было установлено, что некоторые из этих сдвиговых реакций, например, выравнивание клеток, опосредованы рецепторами PECAM-1, VE-кадгерин

и VEGFR2 [19]. Эти рецепторы, обеспечивающие адгезию и формирующие монослой, осуществляют механотрансдукцию. Ламинарное напряжение сдвига способствует удлинению клеток и их ориентации вдоль стенки сосуда, активирует механосенсоры и внутриклеточные сигнальные пути, индуцирует экспрессию эндотелиальных генов и белков [20]. Таким образом, напряжение сдвига играет ведущую роль в сосудистом гомеостазе, обуславливая атеропротективные, антикоагулянтные и противовоспалительные функции [20–22].

Tondreau et al. получили полную эндотелизацию децеллюляризованного тканеинженерного сосудистого каркаса, изготовленного методом самосборки внеклеточного матрикса из фибробластов. Эндотелиальный монослой удалось воссоздать с применением культуры HUVEC и в условиях потока со скоростью 40 мл/мин и с напряжением сдвига 0,65 дин/м² в течение 1 недели [23].

Кроме того, было установлено, что постепенное увеличение воздействующей силы тока жидкости от 5 до 10 дин/см² способствовало адгезии клеток на уровне 99,31 ± 4,97% через 32 часа культивирования с почти полным монослоем HUVEC [24].

Группе Yazdani et al. удалось получить эффективную эндотелизацию при высоких значениях напряжения сдвига. Каркасы, полученные из децеллюляризованной сонной артерий свиньи (4–5 мм), заселяли аутологичными эндотелиальными клетками и предварительно кондиционировали в течение 9 дней. В исследовании были апробированы три режима: низкое постоянное напряжение сдвига LSS (1,7 дин/см²), высокое постоянное напряжение сдвига HSS (13,2 дин/см²) и циклическое высокое напряжение сдвига CSS (13,2 дин/см², 60 уд./мин). Прекодиционирование протезов в условиях HSS и CSS привело к формированию монослоя и устойчивой адгезии, а также ориентации клеток в направлении

Таблица 2

Характеристика ДНК-библиотек, приготовленных из РНК КФЭК, культивированных в статических условиях и условиях пульсирующего потока, и результаты их секвенирования

Characterization of DNA-libraries prepared from samples RNA from CFECs, the cultured under static and pulsed flow conditions and the results of their sequencing

Образец	ДНК-библиотеки, нуклеотидов	Покрывтие, млн ридов	Процент прочтений (hg38)	Процент прочтений (экзоны)
<i>КФЭК статика</i>				
S1	356	15,7	98,2	84,9
S2	354	14,5	98,4	84,5
S3	389	42,7	98,2	82,2
S4	360	9,5	98,2	84,1
<i>КФЭК динамика</i>				
D1	346	15,1	98,2	88,8
D2	351	15,5	98,3	89,8
D3	353	15,3	98,3	90,4

потока. В модели артериовенозного шунтирования предварительно кондиционированные трансплантаты в условиях HSS и CSS оставались неповрежденными, морфология клеток сохранялась, наблюдалось статистически значимое снижение прикрепления элементов крови, особенно тромбоцитов, по сравнению с другими условиями. Вестерн-блоттинг продемонстрировал увеличение экспрессии белка eNOS и простагландин-I-синтазы для клеток, кондиционированных циклическим высоким напряжением сдвига,

по сравнению с клетками, кондиционированными только высоким напряжением сдвига [25].

В исследовании коллектива A.J. Melchiorri в 2016 г. полимерные каркасы из PGA, заселенные ЭПК, подвергали низкому напряжению сдвига в 0,6 дин/см², аналогичному венозной системе. Исследователи обнаружили усиление пролиферации, инфильтрации и дифференцировки ЭПК под влиянием динамической нагрузки. В динамически культивируемых трансплантатах наблюдали повышенную

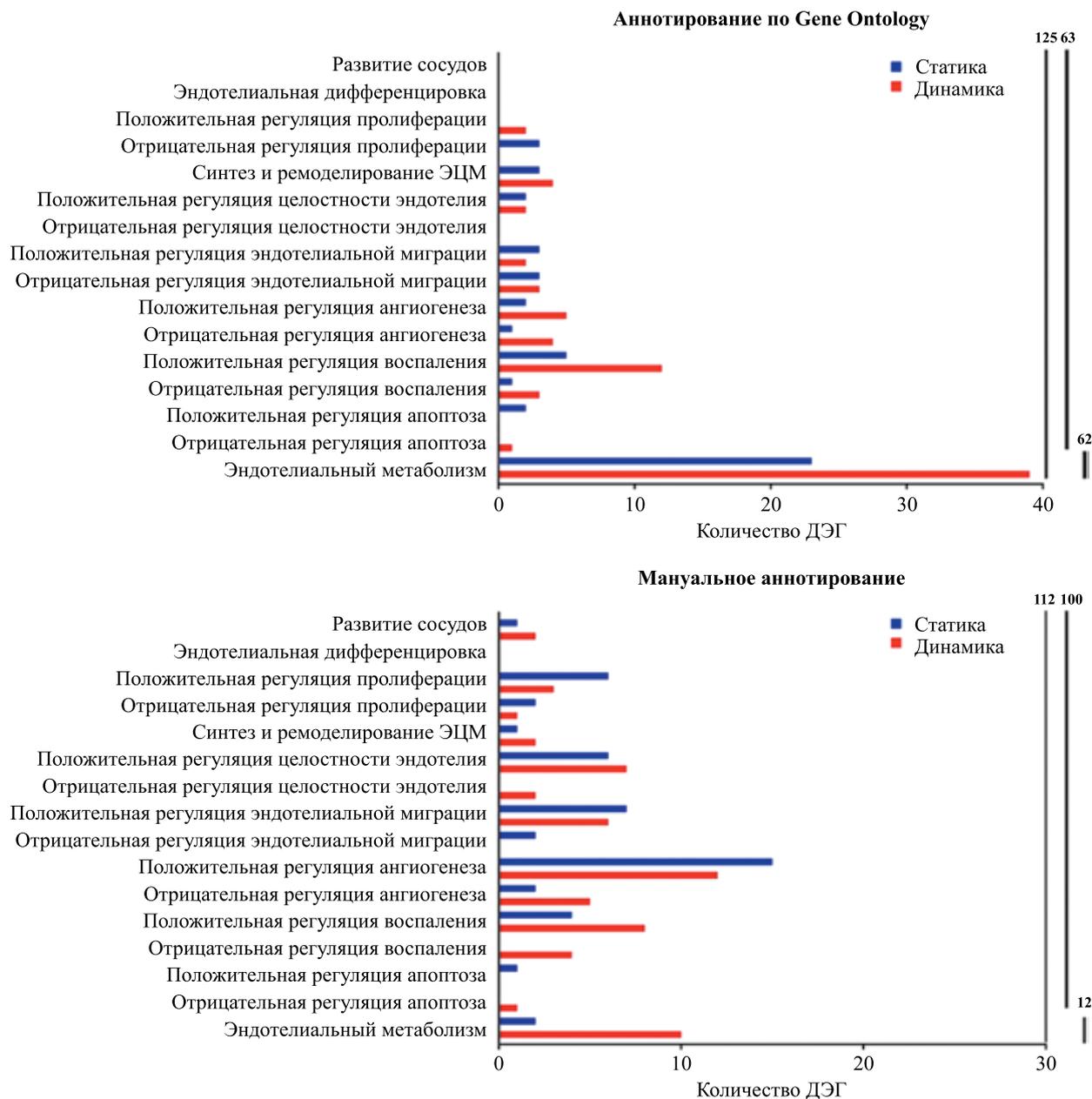


Рис. 5. Качественное и количественное сравнение профиля ДЭГ в КФЭК в статических условиях и при воздействии на них пульсирующего потока с напряжением сдвига в 2,85 дин/см² при помощи биоинформатического инструмента Gene Ontology и мануального аннотирования. ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

Fig. 5. Qualitative and quantitative comparison of the profile of DEGs in ECFC under static conditions and when exposed to pulsatile flow with 2.85 dyne/cm² shear stress using bioinformatic tool Gene Ontology and manual annotation. ЭЦМ – extracellular matrix

экспрессию функциональных эндотелиальных маркеров – vWF и VEGF по сравнению со статически культивированными ЭПК по результатам ПЦР [26].

В нормальных физиологических условиях динамический баланс между механическим напряжением сдвига и биологическими ответами поддерживает целостность эндотелия [27]. Напряжения сдвига, возникающие в результате различных схем потока, инициируют различные сигнальные события в эндотелии, включая механочувствительность, внутриклеточную передачу стресса, преобразование механической силы в биохимические сигналы и механизмы обратной связи [28–29]. Белки фокальной адгезии – динамический механочувствительный мультибелковый комплекс, который связывает рецепторы интегрина внеклеточного матрикса с внутриклеточным актином. Этот комплекс представлен множеством различных белков (винкулин, зиксин, талин, паксиллин), которые выполняют каркасные, адапторные и регуляторные функции [30–31]. Присутствие белков фокальной адгезии отражает реакцию клетки на внешнюю среду и позволяет адаптировать адгезию клеточного матрикса к составу и механическим свойствам внеклеточного матрикса [32–34].

Культивирование КФЭК на поверхности каркасов PNBV/PCL/фибрин в условиях пульсирующего потока изменило ориентацию клеток в направлении потока, привело к увеличению экспрессии специфических эндотелиальных маркеров CD31, CD309 и vWF и стимулировало экспрессию структурного белка F-actin и белка очаговой адгезии Talin. Помимо этого, в эндотелиальных клетках произошло повышение экспрессии генов, кодирующих белки:

- обеспечивающие развитие кровеносных сосудов;
- ответственные за регуляцию целостности эндотелия;
- стимулирующие ангиогенез;
- определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток;
- способствующие миграции эндотелиальных клеток;
- ответственные за регуляцию воспаления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание персонифицированного биodeградируемого клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра становится возможным при использовании в качестве фидерного слоя аутологичного фибрина, а для клеточного заселения – аутологичной культуры КФЭК. Сформированные на внутренней поверхности протеза в условиях напряжения сдвига клетки эндотелиальной выстилки обладают повышенной синтетической активностью, способностью к адгезии, ориентированы по ходу пульсирующего потока. Напряжение сдвига также повлияло на транскриптом культуры клеток, повышая способность эн-

дотелия к миграции, пролиферации и сохранению целостности.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018; 22 (3): 340–354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009.
2. Mallis P, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering*. 2020; 7 (4): 160. doi: 10.3390/bioengineering7040160.
3. Ardila DC, Liou JJ, Maestas D, Slepian MJ, Badowski M, Wagner WR et al. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J Clin Med*. 2019; 8 (2): 185. doi: 10.3390/jcm8020185.
4. Braghirolli DI, Helfer VE, Chagastelles PC, Dalberto TP, Gamba D, Pranke P. Electrospun scaffolds functionalized with heparin and vascular endothelial growth factor increase the proliferation of endothelial progenitor cells. *Biomed Mater*. 2017; 12 (2): 025003. doi: 10.1088/1748-605X/aa5bbc.
5. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Кутихин АГ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ, Глушкова ТВ и др. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1 α и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 96–109. Antonova LV, Sevostyanova VV, Kutikhin AG, Velikanova EA, Matveeva VG, Glushkova TV et al. Influence of bFGF, SDF-1 α , or VEGF incorporated into tubular polymer scaffolds on the formation of small-diameter tissue-engineered blood vessel *in vivo*. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 96–109. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2018-1-96-109.
6. Ando J, Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15 (5): 1389–1403. doi: 10.1089/ars.2010.3361.
7. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292 (3): H1209-24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.

8. *Bilodeau K, Mantovani D.* Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng.* 2006; 12 (8): 2367–2383. doi: 10.1089/ten.2006.12.2367.
9. *Plein A, Fantin A, Denti L, Pollard J, Ruhrberg C.* Erythromieloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels. *Nature.* 2018; 562 (7726): 223–228. doi: 10.1038/s41586-018-0552-x.
10. *Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000; 105 (1): 71–77. doi: 10.1172/JCI8071.
11. *Estes ML, Mund JA, Ingram DA, Case J.* Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr Protoc Cytom.* 2010; 52 (1): 9.33.1–9.33.11. doi: 10.1002/0471142956.cy0933s52.
12. *Lee PS, Poh KK.* Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells.* 2014; 6 (3): 355–366. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.355.
13. *Krawiec JT, Liao HT, Lily Kwan LY, D'Amore A, Weinbaum JS, Rubin JP et al.* Evaluation of the stromal vascular fraction of adipose tissue as the basis for a stem cell-based tissue-engineered vascular graft. *J Vasc Surg.* 2017; 66 (3): 883–890.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2016.09.034.
14. *Luo J, Qin L, Zhao L, Gui L, Ellis VW, Huang Y et al.* Tissue-engineered vascular grafts with advanced mechanical strength from human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2020; 26 (2): 251–261.e8. doi: 10/1016/j.stem.2019.12.012.
15. *Fukunishi T, Best CA, Ong CS, Groehl T, Reinhardt J, Yi T et al.* Role of Bone Marrow Mononuclear Cell Seeding for Nanofiber Vascular Grafts. *Tissue Engineering Part A.* 2018; 24 (1–2): doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0044.
16. *Matveeva VG, Khanova MYu, Sardin ES, Antonova LV, Barbarash OL.* Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3453. doi: 10.3390/ijms19113453.
17. *Aper T, Kolster M, Hilfiker A, Teebken OE, Haverich A.* Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012; 2 (3): 115. doi: 10.4172/2155-9538.1000115.
18. *Великанова ЕА, Кутихин АГ, Матвеева ВГ, Тупикин АЕ, Кабилов МР, Антонова ЛВ.* Сравнение профиля генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови человека и эндотелиальных клеток коронарной артерии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2020; 9 (2): 74–81. *Velikanova EA, Kutikhin AG, Matveeva VG, Tupikin AE, Kabilov MR, Antonova LV.* Comparison of gene expression profiles of human peripheral blood derived endothelial colony-forming cells and coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020; 9 (2): 74–81. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81.
19. *Chien S.* Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292 (3): H1209–24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.
20. *Davies PF.* Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6 (1): 16–26. doi: 10.1038/ncp-cardio1397.
21. *Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiousses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005; 437 (7057): 426–431. doi: 10.1038/nature03952.
22. *Nayak L, Lin Z, Jain MK.* «Go With the Flow»: How Krüppel-Like Factor 2 Regulates the Vasoprotective Effects of Shear Stress. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2011; 15 (5): 1449–1461. doi: 10.1089/ars.2010.3647.
23. *Yazdani SK, Tillman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL.* The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg.* 2010; 51 (1): 174–183. doi: 10.1016/j.jvs.2009.08.074.
24. *Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP.* In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016; 22 (7): 663–670. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0562.
25. *Tondreau MY, Laterreur V, Gauvin R, Vallières K, Bourget JM, Lacroix D et al.* Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater.* 2015; 18: 176–185. doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.026.
26. *Liu J-X, Yan Z-P, Zhang Y-Y, Wu J, Liu X-H, Zeng Y.* Hemodynamic shear stress regulates the transcriptional expression of heparan sulfate proteoglycans in human umbilical vein endothelial cell. *Cell Mol Biol.* 2016; 62 (8): 28–34. doi: 10.14715/cmb/2016.62.8.5.
27. *Zhou J, Li Y-S, Chien S.* Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (10): 2191–2198. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.
28. *Davies PF.* Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6 (1): 16–26. doi: 10.1038/ncp-cardio1397.
29. *Tzima E.* Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res.* 2006; 98 (2): 176–185. doi: 10.1161/01.RES.0000200162.94463.d7.
30. *Burridge K, Wittchen ES.* The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.* 2013; 200 (1): 9–19. doi: 10.1083/jcb.201210090.
31. *Murphy KN, Brinkworth AJ.* Manipulation of Focal Adhesion Signaling by Pathogenic Microbes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (3): 1358. doi: 10.3390/ijms22031358.
32. *Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ.* Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1692 (2–3): 103–119. doi: 10.1016/j.bbamer.2004.04.007.
33. *Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA.* Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11 (9): 633–643. doi: 10.1038/nrm2957.
34. *Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM.* Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature.* 2010; 468 (7323): 580–584. doi: 10.1038/nature09621.

Статья поступила в редакцию 24.05.2021 г.
The article was submitted to the journal on 24.05.2021