

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ЗАСЕЛЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ ИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Ш.Б. Саая¹, И.С. Захарова¹⁻³, М.К. Живень¹⁻³, А.И. Шевченко¹⁻³, А.А. Карпенко¹,
Е.А. Покушалов¹, Л.Н. Иванова^{3,4}, С.М. Закиян¹⁻⁴

¹ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Российская Федерация

² Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Российская Федерация

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация

В настоящее время в сосудистой хирургии использование синтетических протезов малого диаметра сопряжено с более высокой частотой осложнений (тромбоз, рестеноз, гиперплазия интимы), чем при операциях с использованием аутологических сосудов. Однако сопутствующая патология, повторные операции и мультифокальное поражение сосудов ограничивают применение аутоины и аутоартерии. Важным фактором, обеспечивающим длительную проходимость сосудов, является наличие в их стенке функциональных васкулярных клеток, которые вырабатывают биологически активные вещества и обеспечивают механические свойства. **Цель.** Выбор оптимального материала для создания клеточно-наполненных тканеинженерных сосудов. **Материалы и методы.** Эндотелиальные (ЭК) и гладкомышечные клетки (ГМК), полученные из миокарда человека, были заселены на поверхность децеллюляризированной гомоартерии, ксеноперикарда, политетрафторэтилена (PTFE), полиэтилентерэфталата (PET), поликапролактона (PCL) и полилактид-когликолида (PLGA). **Результаты.** Синтетические биodeградируемые каркасы из поликапролактона и полилактид-ко-гликолида обеспечивают клеточную адгезию, ЭК и ГМК сохраняют специфические поверхностные антигены и способность к наработке межклеточного матрикса. **Заключение.** Материалы из поликапролактона и полилактид-ко-гликолида, полученные методом электроспиннинга, могут быть использованы для создания клеточно-наполненных сосудистых протезов.

Ключевые слова: тканевая инженерия сосудов, человеческие эндотелиальные и гладкомышечные клетки, поликапролактон, ксеноперикард, политетрафторэтилен, полиэтилентерэфталат, полилактид-ко-гликолид.

Для корреспонденции: Саая Шораан Биче-оолович. Адрес: 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15. Тел. (913) 905-40-20. E-mail: shoraans@gmail.com.

For correspondence: Saaya Shoraan Biche-oolovich. Address: 15, Rechkunovskaya St., Novosibirsk, Russian Federation. Tel. (913) 905-40-20. E-mail: shoraans@gmail.com

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELLS AFTER SEEDING ON THE SURFACE OF NATURAL AND SYNTHETIC MATERIALS

Sh.B. Saqya¹, I.S. Zakharova¹⁻³, M.K. Zhiven¹⁻³, A.I. Shevchenko¹⁻³, A.A. Karpenko¹, Ye.A. Pokushalov¹, L.N. Ivanova^{3,4}, S.M. Zakian¹⁻⁴

¹ E.N. Meshalkin Novosibirsk State Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, Russian Federation

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

At present, vascular surgery using small diameter synthetic grafts is associated with a higher incidence of complications (thrombosis, restenosis, intimal hyperplasia) than in operations using autologous vessels. However, the occurrence of concomitant pathology, reoperations and multifocal vascular disease limit the use of autologous vein and arteries. The important factor providing a long-term patency is the presence of vascular cells, which produce biologically active substance and provide mechanical properties. **Aim.** Selection of the optimal scaffold for creating cell-seeded tissue-engineering vessels. **Materials and methods.** Endothelial (EC) and smooth muscle cells (SMC) derived from human myocardium were seeded on different surfaces: decellularized homoarteria, xenopericardium, polytetrafluoroethylene (PTFE), polyethylene terephthalate (PET), polycaprolactone (PCL) and polylactide-co-glycolide (PLGA). **Results.** Synthetic biodegradable materials polycaprolactone and polylactide-co-glycolide provide cell adhesion. The cells cultured on the polycaprolactone and polylactide-co-glycolide scaffolds retain their functional properties: viability and proliferative properties, maintain specific endothelial antigens and synthesis of extracellular matrix. **Conclusion.** Synthetic biodegradable polycaprolactone and polylactide-co-glycolide electrospun scaffolds can be used for creation of cell-filled vascular prostheses.

Key words: vascular tissue engineering, human endothelial and smooth muscle cells, polycaprolactone, xenopericardium, polytetrafluoroethylene, polyethylene terephthalate, polylactide-co-glycolide.

ВВЕДЕНИЕ

В сосудистой хирургии в настоящее время для операций шунтирования или протезирования используются как биологические, так и синтетические протезы. Для увеличения срока проходимости сосудистых шунтов малого диаметра многими исследователями были предприняты попытки заселения сосудистых скаффолдов различными клетками. Последние, в свою очередь, должны обеспечивать механическую прочность, тромборезистентность и ингибировать гиперплазию интимы, воспалительную и иммунологическую активность. Известно, что эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов играют важную роль в структурной целостности стенки сосуда за счет способности этих клеток вырабатывать межклеточный матрикс и биологически активные вещества [1].

По литературным данным, клетки, культивируемые на различных поверхностях, могут различаться по своим функциональным свойствам и также могут терять фенотипическую специфичность [2]. Таким образом, выбор оптимально материала, который бу-

дет способствовать адгезии клеток с сохранением жизнеспособности и функциональных свойств, играет важную роль для создания биомиметических протезов в тканевой инженерии сосудов.

Ранее исследователями была показана возможность создания тканеинженерного сосуда, состоящего из интимы, меди и адвентиции с использованием ГМК, ЭК и фибробластов [3, 4]. После дополнительного улучшения механических свойств этих тканеинженерных сосудов (ТИС) появилась возможность их имплантации в артериальную позицию. Прокладимость этих протезов после имплантации в сонные артерии животным наблюдалась в течение 26 недель. Авторы отметили важность сочетания эндотелиального и гладкомышечного слоев на полученной тканеинженерной конструкции, т. к. повышалась целостность и стабильность неоинтимы, создавался приемлемый антитромбогенный потенциал после имплантации, ускорялась регенерация и ремоделирование неомеди и неоадвентиции в долгосрочном периоде [5].

Для клеточного заселения применялись и децеллюляризированные артерии. Заселенные эндотели-

альными клетками-предшественниками (EPCs), такие трансплантаты показывали более длительную проходимость, чем трансплантаты без клеточного заселения [6]. Квинт и др. разработали уникальный метод создания децеллюляризованных артериальных трансплантатов малого диаметра с использованием биоразлагаемого полимера. Ими предложено культивировать аллогенные гладкомышечные клетки аорты свиней на деградируемом каркасе из полигликолевой кислоты (PGA) в биореакторе. Полученные сосуды затем децеллюляризовали и повторно заселяли полученную матрицу графта аутологичными ЭК и эндотелиальными клетками-предшественниками (EPC) свиньи. Данный сосуд функционировал так же, как и артериальные трансплантаты, и постепенно заселялся клетками хозяина *in vivo* в течение 4 недель [7].

На сегодняшний день актуальным является заселение синтетических материалов, используемых для создания искусственных сосудов, хотя исследования по клеточному наполнению политетрафторэтилена (PTFE) и полиэтилентерэфталата (PET) стали проводиться с 1980-х годов. Не все материалы, применяемые в сосудистой хирургии, применимы для создания протезов сосудов малого диаметра: PTFE, PET, полиуретаны демонстрируют неудовлетворительные отдаленные показатели в силу тромбоза и стеноза [8]. В последнее время все большее внимание уделяется биodeградируемым полимерным материалам, таким как поликапролактон (PCL), полилактид-ко-гликолид (PLGA), полиуретан (PU) и др. Это связано с тем, что они имеют ряд положительных свойств: биodeградация, биосовместимость, простота производства, контролируемость морфологических и механических свойств, обеспечивают рост клеток. Однако продукты распада этих полимеров могут вызывать воспалительные реакции, а быстрая деградация может привести к потере структурной целостности. Одной из распространенных технологий получения каркасов сосудов в тканевой инженерии является электроспиннинг. Нановолокна, полученные при помощи данной технологии, укладываются в трехмерную структуру, которая достаточно быстро инфильтрируется клетками и покрывается эндотелием [9]. Такие протезы малого диаметра, созданные из биоразлагаемых полимеров, в том числе PCL, показали хорошие хирургические и механические свойства с проходимостью до 24 недель после имплантации в брюшную аорту крысам [10]. Биodeградируемые синтетические протезы при имплантации в нижнюю полую вену животным могут замещаться тканью, похожей на стенку нативной вены [11]. Кроме того, электроспиннинговые нановолокна обладают потенциалом инкапсуляции и контролируемого высвобождения лекарств, которые могут позволять

производить бесклеточные тканеинженерные конструкции [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные популяции ЭК и ГМК получили из миокарда выходного отдела правого желудочка человека с последующим культивированием и характеристикой в соответствии с ранее разработанным нами протоколом [13]. Кусок кардиоэкспланта (5 мм³) измельчали механически до кусочков размером не более 1 мм³ с последующим ферментативным гидролизом в растворе 0,1% коллагеназы NB (Life Technologies) при 37 °C. Далее полученные клетки культивировали в питательных средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных (EGM-2) или гладкомышечных клеток (SmGM-2). Для эндотелиальных клеток дополнительно выполняли магнитный сортинг магнитными частицами MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированными с антителами к CD31 человека. При анализе у полученных клеток отмечается наличие эндотелиальных и гладкомышечных маркеров (CD31, α -SMA), также они характеризуются способностью нарабатывать межклеточный матрикс (фибронектин, коллаген, эластин).

Для исследования были взяты эпокси-консервированный лоскут из ксеноперикарда (КемПерипласт-Нео, NeoCor, г. Кемерово), децеллюляризованная гоомартерия (НИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск), полученные и консервированные согласно протоколу [14]. Исследованы синтетические материалы, которые используются в сосудистой хирургии: PTFE (Acuseal, Gore), PET (Intergard, Intervascular), а также материалы из PCL и PLGA, изготовленные и охарактеризованные нашими коллегами [15].

ЗАСЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НА СИНТЕТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДЛОЖКАХ

Площадь заселяемой поверхности подложек составляла 2 см². Количество заселяемых клеток составляло 10⁵/см² во всех изучаемых группах. Клетки культивировались на подложках от 2 до 6 дней в среде EGM, Lonza (если заселяли поверхность эндотелиальными клетками) и SmGM, Lonza (если заселяли гладкомышечными клетками), комбинированной EGM и SmGM (если культивировали два типа клеток одновременно). Заселение двумя типами клеток проводили поэтапно: сначала одну из поверхностей заселяли гладкомышечными клетками в среде SmGM. Через сутки подложку переворачивали и заселяли другую сторону эндотелиальными клетками. Время культивирования и оценка проводились в период от 2 до 7 дней.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ЕСТЕСТВЕННЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ СОСУДИСТЫХ МАТЕРИАЛАХ

Характеристика морфологических и функциональных свойств ЭК и ГМК в составе полученных тканеинженерных конструкций проводилась методом иммунофлуоресцентной окраски антителами на специфические поверхностные и цитоплазматические антигены, а также на компоненты межклеточного матрикса. Клетки, растущие на сосудистых матрицах, фиксировали 4% PFA (параформальдегид) 10 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой PBS (2 раза по 15 мин). Далее пермеабилizовали раствором 0,05% Triton (30 мин при комнатной температуре). Промывали фосфатным буфером PBS (2 раза по 15 мин). Инкубировали при комнатной температуре в 0,1% BSA (30 мин). Добавляли 200 мкл первичных антител (табл.) в растворе BSA, инкубировали при +4 °C во влажной камере в течение ночи. Промывали PBS (2 раза по 15 мин). Добавляли 400 мкл вторичных антител в растворе BSA. Инкубировали 1 час при комнатной температуре во влажной камере в темноте. Промывали PBS (2 раза по 15 мин). Подложки с заселенными на них клетками перемещали на предметное стекло в 10% растворе DAPI, сверху подложку накрывали покровным стеклом и плотно закрывали края препарата лентой Parafilm. Детекция проводилась с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ксеноперикард

Поверхность ксеноперикарда, используемого в клинической практике, заселялась сначала гладкомышечными клетками в количестве $3 \times 10^5/\text{см}^2$, заранее прижизненно окрашенными красным флуоресцентным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (MitoTracker). Заселенные гладкомышечными клетками поверхности помещались в обычные условия культивирования: 5% CO₂, 37 °C. Через 24 часа другая сторона поверхности заселялась заранее прижизненно окрашенными эндотелиальными клетками в количестве $3 \times 10^5/\text{см}^2$. Окраска эндотелиальных клеток основана на их способности метаболизировать ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL), в результате чего зеленый флуоресцентный краситель Alexa 488 инкорпорирует в цитоплазму клеток. Качественная оценка распределения клеточных типов проводилась спустя 48 часов от начала эксперимента. На поверхности ксеноперикарда происходило слабое заселение и неадекватная пролиферация гладкомышечных клеток (рис., а). Анализ конфокальных микрофотографий позволяет заключить, что не происходит упорядоченного бинарного формирования клеточных слоев.

Децеллюляризованная гомоартерия

На поверхность децеллюляризованного сосуда заселялись эндотелиальные клетки в количестве $3 \times 10^5/\text{см}^2$, заранее прижизненно окрашенные красным флуоресцентным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (MitoTracker). В течение часа эндотелиальные клетки успешно

Таблица

Список используемых первичных и вторичных антител

List of used primary and secondary antibodies

Первичные антитела	Детектируемый объект	Фирма	Каталожный номер
Выявление клеток			
anti- α -sma	Актин гладких мышц (гладкомышечные клетки)	DAKO	M0851
anti-human CD31	Человеческие эндотелиальные клетки	DAKO	M0823
Выявление межклеточного матрикса			
anti-collagen I	Коллаген 1-го типа	Abcam	ab34710
anti-collagen IV	Коллаген 4-го типа	Life Span	LS-B6723
anti-fibronectin	Фибронектин	Abcam	ab6328
anti-elastin	Эластин	Abcam	21610

Вторичные антитела	Фирма	Каталожный номер
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1	Life Technologies	A21124
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1	Life Technologies	A21121
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG2a	Life Technologies	A21134
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L)	Life Technologies	A11031
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Life Technologies	A11029

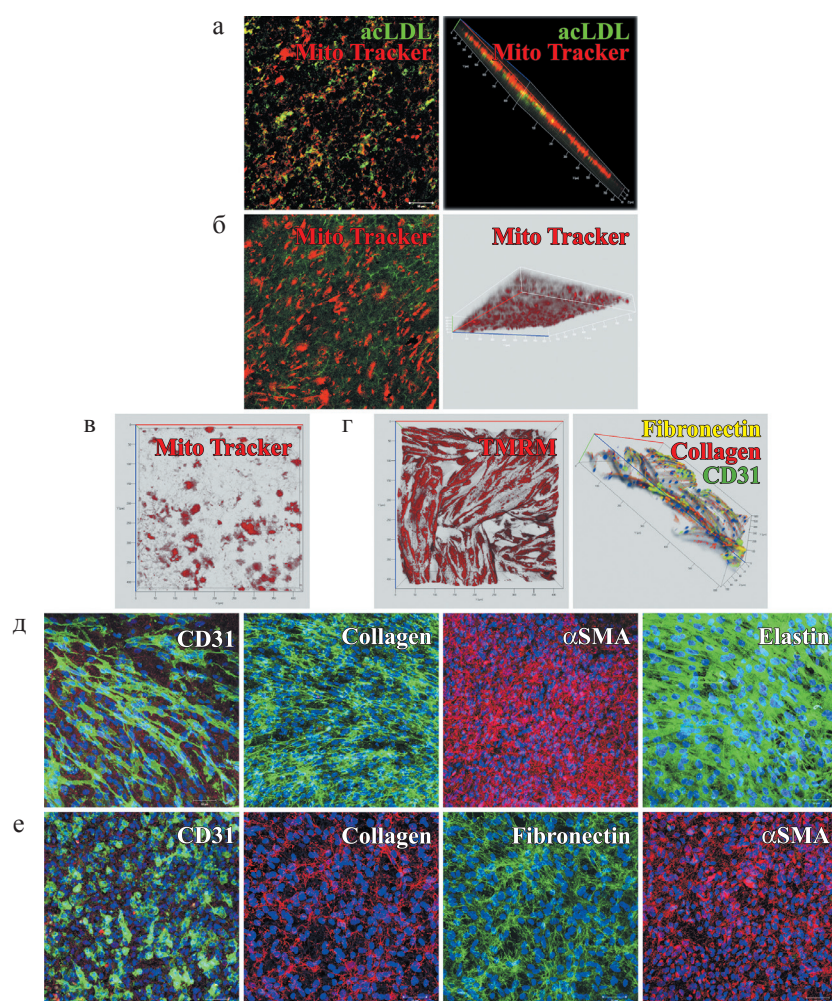


Рис. Проллиферирующие эндотелиальные и гладкомышечные клетки на поверхности из синтетических и естественных материалов: а – эндотелиальные и гладкомышечные клетки на поверхности ксеноперикарда; эндотелиальные клетки, специфически метаболизирующие ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL) *in vivo*, детектируются по зеленому сигналу; гладкомышечные клетки *in vivo* окрашены митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (красный сигнал); б – эндотелиальные клетки на поверхности децеллюляризованной аорты *in vivo* окрашены митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (красный сигнал); в – эндотелиальные клетки на поверхности PTFE *in vivo* окрашены митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (красный сигнал); г – эндотелиальные клетки на поверхности PET окрашены витальным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (красный сигнал) (слева); эндотелиальные клетки на поверхности PET окрашены антителами к эндотелиальным маркерам CD31 (зеленый), коллаген (красный), фибронектин (желтый) (справа); д – эндотелиальные и гладкомышечные клетки на поверхности из PCL; эндотелиальные клетки окрашены антителами к эндотелиальным маркерам CD31 (зеленый), коллаген (зеленый), гладкомышечные клетки окрашены антителами к актину гладких мышц α SMA (красный), эластину (зеленый); е – эндотелиальные и гладкомышечные клетки на поверхности из PLGA; эндотелиальные клетки окрашены антителами к эндотелиальным маркерам CD31 (зеленый), коллаген (красный), фибронектин (зеленый), гладкомышечные клетки окрашены антителами к актину гладких мышц α SMA (красный); ядра окрашены DAPI. Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM780 NLO (Zeiss)

Fig. Proliferating endothelial and smooth muscle cells on the surface of synthetic and natural materials: а – endothelial and smooth muscle cells on the surface xenopericardium; endothelial cells specific metabolizing acetylated form low-density lipoprotein (acLDL) *in vivo*, are detected by the green signal; smooth muscle cells *in vivo* stained by mitochondrial dye MitoTracker DeepRedFM (red signal); б – endothelial cells on the surface of the decellularized aorta, stained by mitochondrial dye MitoTracker DeepRedFM (red signal); в – endothelial cells on the surface of PTFE stained by mitochondrial dye MitoTracker DeepRedFM *in vivo* (red signal); г – endothelial cells on the surface of PET stained by vital mitochondrial dye MitoTracker DeepRedFM (red signal) (left); the endothelial cells on the surface PET stained with antibodies to endothelial markers CD31 (green), collagen (red), fibronectin (yellow) (right); д – endothelial and smooth muscle cells on the surface of the PCL; endothelial cells stained with antibodies to endothelial markers CD31 (green), collagen (green), smooth muscle cells stained with antibodies to smooth muscle actin α SMA (red), elastin (green); е – endothelial and smooth muscle cells on the surface of PLGA; endothelial cells stained with antibodies to endothelial markers CD31 (green), collagen (red), fibronectin (green), smooth muscle cells stained with antibodies to smooth muscle actin α SMA (red); the nuclei stained with DAPI. Laser scanning confocal microscope LSM 780 NLO (Zeiss)

прикреплялись к внутренней поверхности сосуда, спустя 24 часа начинали активно пролиферировать. Наблюдения за клетками в течение 48 часов показали, что они не проникают внутрь сосуда, располагаются на поверхности графта и не формируют плотного монослоя (рис., б).

Политетрафторэтилен (PTFE) и полиэтилентерэфталат (PET)

Поверхности из синтетических материалов PTFE и PET, используемых в клинической практике, заселялись эндотелиальными клетками по вышеописанному протоколу. Перед заселением на поверхность из PTFE эндотелиальные клетки окрашивались прижизненно MitoTracker DeepRedFM. Дальнейшие наблюдения показали, что в течение 48 часов не происходит нормального заселения поверхности и активной пролиферации заселенных клеток (рис., в).

Перед заселением поверхности из PET клетки прижизненно окрашивались другим митохондриальным красителем – TMRM. Данный краситель флуоресцентно окрашивает митохондрии с ненарушенным мембранным потенциалом, т. е. является маркером живых клеток. Несмотря на то что через 48 часов клетки на поверхности PET являются жизнеспособными и активно пролиферирующими, на данной поверхности не происходит формирования нормального монослоя (рис., г). Клетки прикрепляются к отдельным субъединицам синтетического волокна и распределяются вдоль каждой отдельной субъединицы. Для адекватного функционирования эндотелиальные клетки должны располагаться монослоем, сохранять характерные поверхностные антигены и нарабатывать компоненты межклеточного матрикса. Через 6 дней культивирования – времени, достаточного для выработки межклеточного матрикса монослоем эндотелиальных клеток на поверхности культурального пластика, в клетках на поверхности PET утрачивается специфический эндотелиальный маркер CD31, и они практически не нарабатывают фибронектин и коллаген.

Поликапролактон (PCL) и полилактид-ко-гликолид (PLGA)

Следующим материалом для заселения мы использовали заплату из PCL с отличающимися поверхностями с малопроницаемым внутренним слоем. Матрикс состоит из волокон диаметром в среднем 1 мкм и образуют между собой поры размером 6,6 мкм. Одна сторона имеет более гладкую поверхность за счет плотно уложенных волокон полимера. На эту поверхность заселялись эндотелиальные клетки. На противоположной поверхности большее расстояние между волокнами, что создает внешнюю шероховатость. Эту поверхность исполь-

зовали для заселения гладкомышечных клеток. Сначала заселялись ГМК в количестве 3×10^5 клеток/см², через сутки подложка переворачивалась и заселялась ЭК в том же количестве. Оценка заселения клеток при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания проводилась на 6-е сутки. Несмотря на активную пролиферацию и высокую плотность, ЭК располагаются в разных плоскостях, не образуя монослой с четкими межклеточными границами, часто формируя несколько слоев (рис., д). ГК утрачивают характерную веретеноподобную морфологию, ориентация актиновых волокон в них становится более свободной, при этом они сохраняют способность к продукции внеклеточного эластина. Около половины эндотелиальных клеток, культивируемых на поликапролактоне, утрачивают экспрессию поверхностного антигена CD31. Несмотря на частичную утрату эндотелиального фенотипа, клетки успешно нарабатывают внеклеточный матрикс – коллаген. Аналогичным способом клетки заселяли на поверхность PLGA. В силу структурных особенностей матрикса эндотелиальные и гладкомышечные клетки изменяют свою морфологию, эндотелиальный маркер CD31 сохраняется лишь в части эндотелиальных клеток, в гладкомышечных клетках также меняется структура актиновых волокон. Тем не менее детектируется выработка внеклеточного коллагена и фибронектина (рис., е). На поверхности PLGA заселенные гладкомышечные клетки изменяют свою морфологию, часть эндотелиальных клеток теряет антигенную специфичность. Несмотря на это, детектируется хорошая выработка фибронектина и коллагена клетками на этой поверхности. Учитывая то, что на поверхности из PCL и PLGA эндотелиальные и гладкомышечные клетки выявляют экспрессию характерных маркеров и функциональные свойства – способность к выработке внеклеточного матрикса, а также имеют тенденцию к образованию монослоя, данные синтетические материалы могут быть использованы как биodeградируемый скаффолд для создания клеточно-заселенных тканеинженерных конструкций с использованием в качестве источника клеток послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ксеноперикард – один из наиболее используемых материалов в сердечно-сосудистой хирургии. Предварительная обработка перикарда позволяет избавиться от клеточных элементов. Использование ксеноперикарда для пластики сонных артерий приводит к рестенозам чаще, чем при аутоартериальной пластике. Возможно, это связано с отсутствием клеток в стенке матрикса. Однако неудовлетворительное заселение клетками ограничивает использование этого материала для дальнейшего

исследования. Слабое заселение перикарда клетками подтверждают и другие исследования [16, 17], в которых отмечено, что после 16 часов заселенные клетки начинают постепенно терять свои витальные функции.

На поверхности децеллюляризованного артериального матрикса клетки активно пролиферируют. Однако из-за структуры матрикса гомоартерии клетки не проникают в его стенку. В децеллюляризованной ткани отсутствуют клеточные компоненты и ДНК, однако остается каркас сосуда, состоящий из коллагена и эластина [7]. Kaushal и др. заселяли эндотелиальными клетками-предшественниками (EPCs) децеллюляризованные подвздошные артерии свиней с последующей имплантацией в сонные артерии овцам. Эти заселенные тканеинженерные конструкции были проходимы до 130 дней и ремоделированы в неососуды, в то время как в контрольной группе без заселения клеток тромботические окклюзии развивались в течение 15 дней [6]. Эти результаты показывают, что децеллюляризованные сосудистые графты предрасположены к преждевременному выходу из строя, если сначала не заселять клетками или дополнительно не модифицировать. Кроме того, элементы внеклеточного матрикса в процессе децеллюляризации подвергаются физическим и химическим воздействиям, которые могут отрицательно влиять на биомеханические свойства с развитием дегенеративной недостаточности структуры трансплантата [18].

В настоящее время протезы из PTFE и PET широко используются для хирургии артерий малого диаметра при отсутствии подходящего ауто трансплантата. Однако они имеют высокую частоту рестеноза и окклюзии после имплантации [19]. Преэндартализация может увеличить их тромборезистентность и улучшить проходимость шунтов малого диаметра [20, 21]. До настоящего времени многочисленные исследования не определили четкого протокола заселения их клетками и периода предварительного культивирования *in vitro* [22]. При имплантации таких ТИС в аорту экспериментальным животным заселенные клетки смывались током крови. Также эти исследователи показали, что инкубационный период для оптимального прикрепления клеток на PET и PTFE может варьировать от 30 минут до 24 часов [23]. Однако для успешного функционирования тканеинженерного трансплантата необходимо обеспечить не только заселение и пролиферацию клеток в составе протеза, но и сохранение их специфических антигенов и способности к выработке межклеточного матрикса. По полученным нами результатам, PET и PTFE являются не оптимальными для клеточной модификации, поскольку функционального монослоя эндотелия не образуется на поверхности обоих типов протезов, заселенные клетки теряют свои специфические антигены и способность

нарабатывать межклеточный матрикс. Вероятно, в случае PTFE это связано с большими расстояниями между волокнами материала, и вследствие этого клетки проваливались в толщу стенки каркаса. Неровная поверхность структуры PET, обусловленная ее крупными волокнами, препятствует оптимальному заселению клеток, ограничивая их рост в пределах отдельных островков.

Биодеградируемые конструкции (PCL, PLGA), полученные при помощи электроспиннинга, создают условия для проникновения клеток в структуру матрикса. При этом клеточные культуры могут поддерживать жизнедеятельность, сохранять свои функциональные свойства и могут быть применены для создания клеточно-наполненных тканеинженерных сосудов малого диаметра. Наши исследования показали, что эндотелиальные и гладкомышечные клетки теряют функциональные маркеры при заселении на ксеноперикард, PTFE, PET, поэтому данные материалы не подходят для создания клеточно-заселенных трансплантатов. Несмотря на удовлетворительное заселение клетками поверхности децеллюляризованной гомоартерии, возможно, требуется ее дополнительная модификация, в связи с тем что эндотелиальные клетки не формируют функционального монослоя. По результатам эксперимента, наиболее оптимальными для создания клеточно-заселенных тканеинженерных сосудов являются синтетические биодеградируемые ткани, полученные из волокон полимеров поликапролактона (PCL) и полилактид-ко-гликолида PLGA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из тестированных скэффолдов наиболее оптимальными для создания клеточно-заселенных тканеинженерных трансплантатов сосудов являются синтетические каркасы из полилактид-ко-гликолида и поликапролактона. Поверхность из поликапролактона обеспечивает адгезию, пролиферацию, миграцию эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Заселенные сосудистые клетки сохраняют специфические антигенные свойства, вырабатывают компоненты межклеточного матрикса: фибронектин, коллаген, эластин. В ходе дальнейшей работы для оценки функциональных свойств тканеинженерных конструкций в биологической модели *in vivo* решено использовать синтетический матрикс из PCL с клеточным заселением и без него.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00082.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Parizek M, Kasalkova N, Bacakova L, Slepicka P, Lisa V, Blazkova M, Svorcik V. Improved Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Poly-

- ethylene Grafted with Bioactive Molecules and Carbon Particles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009; 10 (10): 4352–4374.
2. T.D. VU and T. KOFIDIS, National University of Singapore, Singapore DOI: 10.1533/9780857096715.2.127 © 2014 Woodhead Publishing Limited.
 3. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986; 231: 397–400.
 4. Nicolas L'Heureux, Lucie Germain, Raymond Labbé, Francois A. Auger. Qulbec, Canada: *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study. *J. Vasc. Surg.* 1993; 17: 499–509.
 5. Matsuda T, Miwa H. A hybrid vascular model biomimicking the hierarchic structure of arterial wall: Neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1995; 110: 988–997.
 6. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*. *Nat Med*. 2001; 7: 1035–1040.
 7. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 9214–9219.
 8. Tara S, Rocco KA, Hibino N, Sugiura T, Kurobe H, Breuer CK, Shinoka T. Vessel bioengineering. *Circ. J.* 2014 Jan; 78 (1): 12–19.
 9. Wu H, Fan J, Chu CC, Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010; 21: 3207–3215.
 10. Pektok E, Nottelet B, Tille JC, Gurny R, Kalangos A, Moeller M et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly (epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation*. 2008; 118: 2563–2570.
 11. Roha JD, Sawh-Martinez R, Brennana MP, Jaya SM, Devineb L, Raoa DA et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. January 26, 2010 PNAS | March 9, 2010 | vol. 107 | no. 10 | 4669–4674.
 12. Su Y, Su Q, Liu W, Jin G, Mo X, Ramakrishna S. Dual-drug encapsulation and release from core-shell nanofibers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2011 March 18, doi: 10.1163/092050611X564137.
 13. Захарова ИС, Живень МК, Саая ШБ, Карпенко АА, Шевченко АИ, Струнов АА и др. Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015; 19 (4–2): 43–54. Zakharova IS, Zhiven' MK, Saaya ShB, Karpenko AA, Shevchenko AI, Strunov AA i dr. Razrabotka kletochnyh tehnologiy dlya sozdaniya kletочно-napolnennyh sudistykh transplantatov. *Patologiya krovoobrascheniya i kardiohirurgia*. 2015; 19 (4–2): 43–54.
 14. Сергеевичев ДС, Васильева МБ, Субботовская АИ, Юношев АС, Сильвестров ВВ, Новрузов РБ, Караськов АМ. Влияние детергентной и ферментной децеллюляризации на биомеханические свойства аортального аллогraftа. *Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2012; 10 (4). Sergeevichev DS, Vasilieva MB, Subbotovskaya AI, Yunoshev AS, Silvestrov VV, Novruzov RB, Karaskov AM. Vliyaniye detergentnoy i fermentnoy detsellyulyarizatsii na biomekhanicheskie svoystva aortalnogo allografta. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina*. 2012; 10 (4).
 15. Попова ИВ, Степанова АО, Сергеевичев ДС, Акулов АЕ, Захарова ИС, Покушалов ЕА, Лактионов ПП, Карпенко АА. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015; 19 (4): 63–71. Popova IV, Stepanova AO, Sergeevichev DS, Akulov AE, Zakharova IS, Pokushalov EA, Laktionov PP, Karpenko AA. Sravnitelnoe issledovanie treh tipov protezov, izgotovlennih metodom electrospinninga v eksperimente *in vitro* i *in vivo*. *Patologiya krovoobrascheniya i kardiohirurgia*. 2015; 19 (4): 63–71.
 16. Cynthia S. Wong, Melissa Sgarioto, Amal A. Owida, William Yang, Franklin L. Rosenfeldt, Yos S. Morsi. Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium. *Heart, Lung and Circulation*. 2006; 15: 371–377.
 17. Eybl E, Grimm M, Grabenwoger M, Bock P, Muller MM, Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1992; 104 (3): 763–9.
 18. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2003; 23: 1002–1006.
 19. Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: A review. *Biomaterials*. 2005; 26 (14): 1857–1875.
 20. Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP et al. *In vivo* cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005; 112 (1): 12–18.
 21. Mirengi L, Ramires PA, Pentassuglia RE, Rotolo P, Romito A. Growth of human endothelial cells on plasma-treated polyethyleneterephthalate surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2000; 11 (5): 327–331.
 22. Thompson MM, Budd JS, Eady SL, Allen KE, James M, James RF et al. Effect of seeding time and density on endothelial cell attachment to damaged vascular surfaces. *Br. J. Surg.* 1993; 80 (3): 359–362.
 23. Miyata T, Conte MS, Trudell LA, Mason D, Whittemore AD, Birinyi LK. Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts. *J. Surg. Res.* 1991; 50 (5): 485–493.

Статья поступила в редакцию 14.03.2016 г.
The article was submitted to the journal on 14.03.2016