

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-1-96-109

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА МОДИФИЦИРОВАНИЯ ТРУБЧАТОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА БИМОЛЕКУЛАМИ bFGF, SDF-1 α И VEGF НА ПРОЦЕССЫ ФОРМИРОВАНИЯ *IN VIVO* ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КРОВЕНОСНОГО СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА

Л.В. Антонова, В.В. Севостьянова, А.Г. Кутихин, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Т.В. Глушкова, А.В. Миронов, Е.О. Кривкина, О.Л. Барбараиш, Л.С. Барбараиш

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

На сегодняшний день тканеинженерные сосудистые протезы малого диаметра являются многообещающей альтернативой аутологичным сосудам для проведения шунтирующих операций и замены поврежденных сосудов. В связи с этим продолжается поиск биологически активных молекул для улучшения эндотелизации трубчатых полимерных матриксов и стимуляции образования гладкомышечного слоя. Ранее нами было продемонстрировано, что инкорпорирование сосудистого эндотелиального фактора роста в трубчатые каркасы, изготовленные методом электроспиннинга из полигидроксибутирата/валерата/поликапролактона, способствовало ускоренному формированию эндотелиального монослоя. Однако существует вероятность того, что необходимо дополнительное поддержание VEGF-опосредованной эндотелизации, а также стимуляция формирования других структур кровеносного сосуда. **Цель** – оценить эффект основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы SDF-1 α в сравнении с одиночным использованием сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), а также в комбинации с VEGF, инкорпорированных в биodeградируемые сосудистые протезы, на формирование новообразованной сосудистой ткани в зоне локации протезов после их имплантации в брюшную аорту крыс на 3, 6 и 12 месяцев. **Материалы и методы.** Методом двухфазного электроспиннинга нами были изготовлены 2 вида трубчатых матриксов: с инкорпорированием одного из факторов (GF: VEGF или bFGF или хемоаттрактантная молекула SDF-1 α) и каркасы с послойным инкорпорированием трех факторов (VEGF/bFGF/SDF-1 α : во внутреннюю 1/3 стенки графта – VEGF, во внешние 2/3 стенки – bFGF и хемоаттрактантная молекула SDF-1 α), с последующей оценкой морфологии, механических свойств и ремоделирования *in vivo* путем имплантации в брюшную аорту крыс. **Результаты.** Полимерные трубчатые матриксы с тремя биомолекулами имели 100% первичную проходимость. Послойное инкорпорирование биомолекул улучшало морфологию и механические свойства графтов, способствовало полноценной эндотелизации по сравнению с использованием только сосудистого эндотелиального фактора роста. Кроме того, основной фактор роста фибробластов ускорял формирование гладкомышечного слоя. **Обсуждение.** Полученные результаты показали, что послойное инкорпорирование сосудистого эндотелиального фактора роста, основного фактора роста фибробластов и хемоаттрактантной молекулы SDF-1 α в полимерный сосудистый протез обеспечивает его высокую проходимость и улучшает формирование новообразованной сосудистой ткани *in situ*.

Ключевые слова: тканевая инженерия, биodeградируемые полимеры, сосудистый протез, сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, стромальный фактор 1 альфа, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки.

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (3842) 64-38-02. E-mail: antonova.la@mail.ru

For correspondence: Antonova Larisa Valeryevna. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002. Tel. (3842) 64-38-02. E-mail: antonova.la@mail.ru

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*

L.V. Antonova, V.V. Sevostyanova, A.G. Kutikhin, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva, T.V. Glushkova, A.V. Mironov, E.O. Krivkina, O.L. Barbarash, L.S. Barbarash

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

Aim. To evaluate the potential synergistic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) and stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) complemented with VEGF compared to VEGF alone when being added into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) / poly(ϵ -caprolactone) vascular grafts implanted into rat abdominal aorta for 3, 6, or 12 months. **Materials and methods.** Utilizing emulsion electrospinning, we fabricated one-layer vascular grafts with either VEGF, bFGF, or SDF-1 α , and two-layer vascular grafts with VEGF incorporated into the inner layer and bFGF and SDF-1 α incorporated into the outer layer following structural evaluation, tensile testing, and *in vivo* testing using a rat abdominal aorta replacement model. **Results.** Grafts containing all three growth factors had a 100% primary patency rate. The combination of bFGF, SDF-1 α and VEGF improved morphology and mechanical properties of the grafts. Furthermore, such combination of the bioactive factors promoted endothelialization compared to VEGF alone. In addition, bFGF induced a rapid formation of a SMC layer. **Conclusion.** Taking together, these findings show that the incorporation of bFGF and SDF-1 α into the vascular grafts in combination with VEGF enhances vascular tissue regeneration and provides a higher primary patency rate.

Key words: tissue engineering, biodegradable polymers, vascular grafts, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, stromal cell-derived factor 1 α , endothelial cells, smooth muscle cells.

ВВЕДЕНИЕ

Тканевая инженерия кровеносных сосудов является одним из наиболее перспективных подходов для создания альтернативных сосудистых имплантатов малого диаметра с оптимальными механическими свойствами и высокой биосовместимостью [1]. Тканеинженерные сосудистые протезы, изготовленные преимущественно из природных или синтетических биodeградируемых полимеров, представляют собой трехмерную подложку для адгезии и пролиферации клеток с последующим формированием ткани кровеносного сосуда *de novo* [2]. Однако на сегодняшний день в клинической практике все еще отсутствуют готовые биodeградируемые протезы сосудов малого диаметра для регенерации кровеносного сосуда *in situ*, которые могут быть использованы для проведения шунтирующих операций и замены поврежденных кровеносных сосудов.

Ранее нами была показана возможность инкорпорирования в состав полимерных матриц ростовых факторов с сохранением биологической активности последних [3], а также возможность спонтанной эндотелизации трубчатых каркасов малого диаметра, изготовленных методом двухфазного электроспиннинга из полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) и содержащих в своем составе сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [4, 5]. VEGF наиболее часто используют для стимуляции эндотелизации, так как он активизирует

и поддерживает миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку эндотелиальных клеток (ЭК), увеличивает продукцию оксида азота и усиливает сосудистую проницаемость [6, 7].

В настоящем исследовании нами было предложено дополнительное инкорпорирование основного фактора роста фибробластов (bFGF/FGF-2) и стромального фактора 1 альфа (SDF-1 α /CXCL12) для поддержания и стабилизации эффектов VEGF в трубчатых полимерных матрицах. bFGF хорошо известен своей способностью стимулировать миграцию, пролиферацию и выживание ЭК и гладкомышечных клеток (ГМК) [8]. В сравнении с VEGF bFGF имеет меньший проангиогенный эффект, однако обеспечивает созревание кровеносных сосудов [9]. В свою очередь, SDF-1 α является хемоаттрактантом для ЭК, стимулирует формирование длинных и разветвленных капиллярных сетей [10, 11]. Более того, SDF-1 α усиливает миграцию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые способны дифференцироваться в гладкомышечные клетки (ГМК) внутри сосудистой стенки [12].

Цель – оценить эффект bFGF и SDF-1 α в сравнении с одиночным использованием VEGF, а также в комбинации с VEGF, инкорпорированных в биodeградируемые сосудистые протезы, на формирование новообразованной сосудистой ткани в зоне локации трубчатых полимерных матриц после их имплантации в брюшную аорту крыс на 3, 6 и 12 месяцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление трубчатых полимерных матрикс

Трубчатые матриксы диаметром 2 мм, содержащие одну биологически активную молекулу (GF), изготавливали методом двухфазного электроспиннинга из смеси 5% полигидроксибутирата/валерата (PHBV, Sigma–Aldrich) и 10% поликапролактона (PCL, Sigma–Aldrich) в хлороформе на установке электроспиннинга Nanop-01A (MECC) при напряжении 23 kV, скорости подачи раствора 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора 150 мм, с использованием затупленной иглы 22G. В качестве биологически активных молекул для инкорпорирования в матриксы использовали рекомбинантные ростовые факторы крысы: VEGF (Sigma–Aldrich) или bFGF (Sigma–Aldrich) или рекомбинантную хемоаттрактантную молекулу крысы SDF-1 α (Sigma–Aldrich), вводя их в полимерный раствор в соотношении 20:1. Конечная концентрация биомолекул составила 500 нг/мл полимерного раствора. Трубчатые каркасы с комбинацией биологически активных молекул (VEGF/bFGF/SDF-1 α) изготавливали следующим образом: внутреннюю 1/3 стенки каркаса – из суспензии PHBV/PCL с раствором VEGF, как описано выше. Далее электроспиннинг продолжали с эмульсией (20:1) из раствора PHBV/PCL с bFGF и SDF-1 α в равных количествах в PBS. Конечная концентрация каждого вида биомолекул составила 500 нг/мл полимерного раствора.

Морфология полимерных трубчатых каркасов

Структуру поверхности изготовленных полимерных трубчатых каркасов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi), предварительно осуществляя золото-палладиевое напыление внутренней, внешней поверхности образцов размером 0,5 \times 0,5 см и поперечного среза – с образованием проводящего покрытия толщиной 30 нм. Оценку изображений проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health). Для определения среднего диаметра волокна, размера пор и пористости проводили минимум 100 измерений.

Механические свойства

Прочность и упруго-деформативные свойства трубчатых каркасов изучали в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75 на универсальной испытательной машине Zwick/Roell (Zwick GmbH). Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении сосудистого сегмента. Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при растяжении (МПа)

до начала разрушения. В качестве альтернативного критерия прочности использовали абсолютное значение максимальной силы, приложенной к образцу до начала разрушения (Fmax, Н). Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа), который определяли в диапазонах физиологического давления (80–120 мм рт. ст.). В качестве контроля использовали участки внутренней грудной артерии (internal mammary artery, IMA) человека, которые забирали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на забор биоматериала.

Имплантация *in vivo*

Для имплантации графтов использовали 6-месячных самцов крыс популяции Wistar массой 400–450 г (n = 48). Все процедуры осуществляли, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Животных вводили в наркоз 3% изофлураном, во время проведения операции использовали ингаляционный наркоз 1,5% изофлурана. Биodeградируемые сосудистые протезы с внутренним диаметром 2 мм и длиной 10 мм после стерилизации γ -излучением имплантировали в брюшную часть аорты крыс по методике «конец в конец». Все процедуры проводили в асептических условиях. После оперативного вмешательства животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания. Крыс с имплантированными протезами выводили из эксперимента через 3, 6 и 12 месяцев (n = 4 на точку вывода в каждой группе). Полимерные сосудистые протезы выделяли с участками прилежащей аорты и делили на две части. Одну часть замораживали при –140 °С для последующего проведения иммунофлуоресцентного анализа, вторую часть фиксировали в 10% забуференном формалине (Electron Microscopy Sciences) в течение 24 часов при температуре 4 °С, после чего осуществляли гистологическое и гистохимическое исследование.

Гистологическое исследование

Образцы для рутинного гистологического исследования заключали в парафин, получали по 6 серийных срезов толщиной 5 мкм из центральной части графта и зоны анастомоза. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Полученные препараты изучали по всей поверхности среза сосудистого протеза (до 30 полей зрения в зависимости от увеличения) методом световой микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss) при увеличениях объектива $\times 5$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$.

Иммуногистохимия

Для проведения иммуногистохимической реакции использовали набор Spring (Spring Bioscience, США) и кроличьи антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -smooth muscle actin, α -SMA) (Spring bioscience). Парафиновые срезы эксплантированных биодеградируемых сосудистых протезов толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла (Bio optica) с полилизинным покрытием. После депарафинизации и высокотемпературной демаскировки на срезы наносили ингибитор эндогенной пероксидазы (Hydrogen Peroxidase Block) в течение 10 мин, после чего срезы промывали в 2 порциях фосфатного буфера (0,01 М, pH 7,4) по 5 мин. Для снижения неспецифической окраски использовали полимерный блок (Protein Block). Затем на срезы наносили по 50 мкл первичных антител к α -SMA и инкубировали во влажной камере в течение 1 часа. По завершении этапа инкубации срезы обрабатывали биотинилированными антикроличьими вторичными антителами (Second Antibody). После промывки в фосфатном буфере (0,01 М, pH 7,4) наносили стрептавидин-пероксидазный комплекс (Polymer Block), а также хромоген (диаминобензидин, DAB). Реакцию останавливали помещением срезов в дистиллированную прохладную воду, после чего докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадском балъзаме. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали нативные сосуды и раствор для разведения антител (Ab Diluent) соответственно. Препараты изучали с помощью светового микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Из замороженных образцов с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific) изготавливали срезы толщиной 8 мкм и помещали на стекла, покрытые L-полилизин (Menzel). Иммунофлуоресцентную окраску срезов проводили с использованием следующих специфических первичных антител: антитела мыши к CD31 крысы (ab119339, Abcam) и антитела кролика к CD34 крысы (ab185732, Abcam), или антитела мыши к коллагену I крысы (ab28028, Abcam) и антитела кролика к коллагену IV крысы (ab6586, Abcam), или антитела к фактору фон Виллебранда, конъюгированные с FITC (ab8822, Abcam). В случае неконъюгированных первичных антител на срезы наносили смесь вторичных антител: антитела козы к Ig мыши, конъюгированные с AlexaFluor568 (ab175473, Abcam), и антитела осла к Ig кролика, конъюгированные с AlexaFluor488 (ab150105, Abcam). Автофлуоресценцию удаляли с помощью реагента Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore) согласно инструкции производителя. Срезы докрашивали ядерным красителем DAPI

(Sigma-aldrich, США) и заключали в ProLong (Life Technologies) под покровное стекло. В качестве положительного контроля на CD31 и vWF использовали образцы нативной аорты крысы, на CD34 – срезы эмбриона крысы, на коллаген I и IV – срезы кожи крысы. Отрицательный контроль окрашивания осуществляли заменой первичных антител на раствор BSA в фосфатно-солевом буфере с сохранением протокола окрашивания. Полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss).

Статистическая обработка данных

Для проведения статистического анализа использовали GraphPad Prism (Graph Pad Software). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий между двумя независимыми группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. При сравнении трех и более независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, для парного сравнения групп применяли критерий Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как медиана и 25-й и 75-й процентиля Me (25%; 75%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки синергичного действия VEGF, bFGF или SDF-1 α был разработан биодеградируемый сосудистый протез, содержащий инкорпорированный VEGF во внутреннем слое стенки, а bFGF с SDF-1 α – во внешнем слое. Таким образом, VEGF и bFGF/SDF-1 α были разделены по их хемоаттрактантной активности. В данной модели VEGF использовали с целью стимуляции миграции прогениторных и зрелых эндотелиальных клеток на внутреннюю поверхность трубчатого каркаса, в то время как bFGF и SDF-1 α были выбраны для привлечения функциональных клеток, таких как ГМК, которые впоследствии могут продуцировать гликозаминогликаны, коллаген, эластин и другие компоненты межклеточного матрикса в стенке каркаса. Протезы кровеносного сосуда с отдельно инкорпорированными VEGF, bFGF или SDF-1 α служили моделью для изучения вклада отдельно взятой биомолекулы в формирование новообразованной сосудистой ткани.

Сканирующая электронная микроскопия поверхности образцов показала, что все виды полимерных трубчатых матриксов были образованы хаотично расположенными волокнами микро- и наноразмерного диаметра, которые образовывали незамкнутые, взаимосвязанные поры. Различий по диаметру волокон и пористости между двумя типами матриксов не обнаружено (рис. 1). Оценку механических

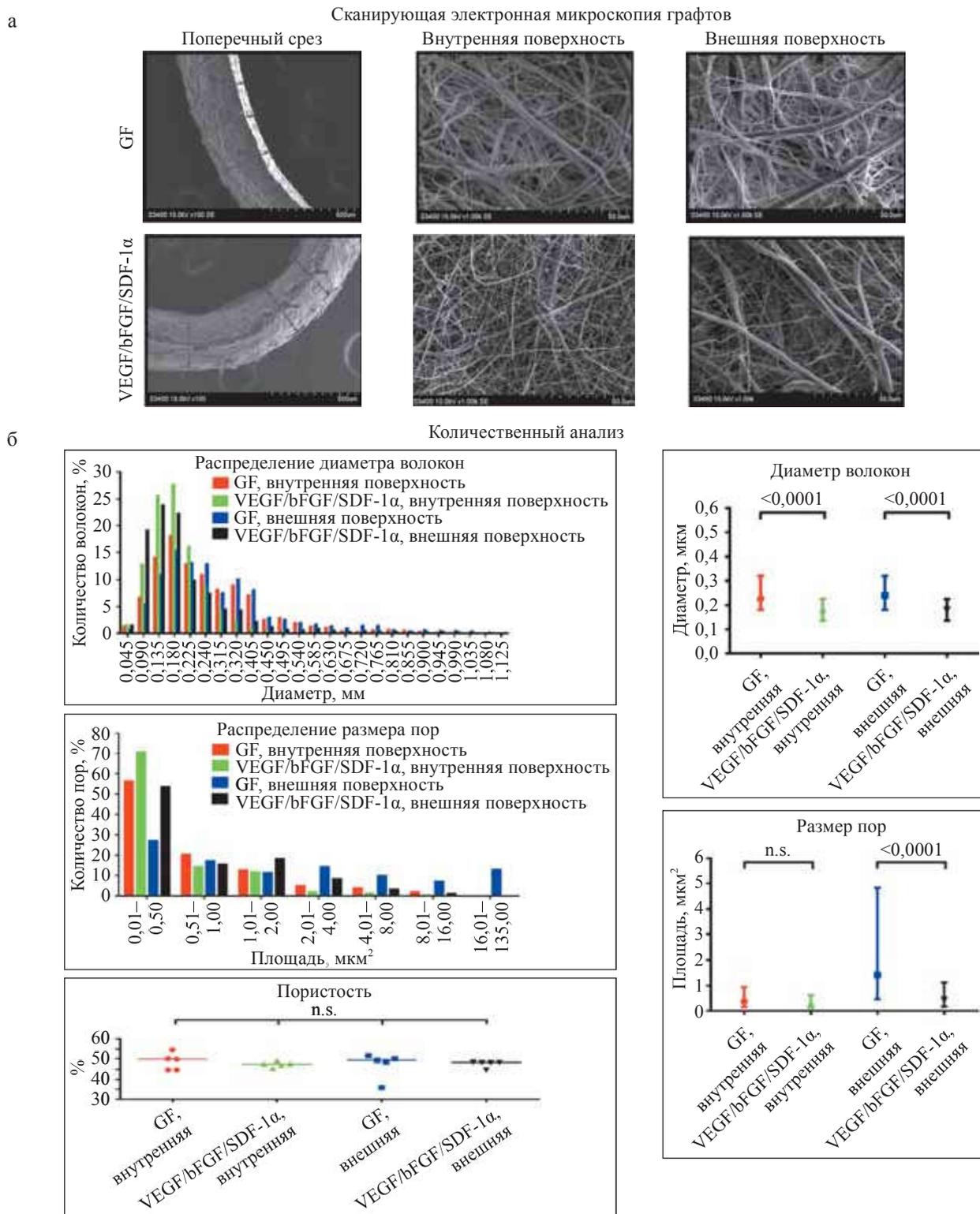


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия структуры трубчатых полимерных матрицков: а – изображения внутренней и внешней поверхностей матрицков, модифицированных отдельно VEGF, bFGF или SDF-1α (GF) либо тремя факторами одновременно с образованием двухслойной структуры (VEGF/bFGF/SDF-1α), ×1000; б – количественный анализ изображений (по шесть снимков с общим количеством волокон и пор >100), данные представлены как медиана и 25-й и 75-й квартили, для сравнения данных использован критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Данна для множественных сравнений, р-уровень с поправкой на множественные сравнения представлен в числовом виде, n.s. – отсутствие достоверных отличий

Fig. 1. Scanning electron microscopy of the grafts: а – pre-implantation representative scanning electron microscopy images of the grafts modified exclusively with either VEGF, bFGF or SDF-1α (merged in GF group due to being one-layer), or with all three factors having a two-layer structure; б – quantitative image analysis (six images per group containing in total > 100 fibers and pores), data are represented as the median with interquartile range, Kruskal–Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test, p values adjusted for multiple comparisons are reported in a numerical manner, n.s. is for not significant

свойств полимерных сосудистых протезов проводили в сравнении со свойствами внутренней грудной артерии человека, так как она широко применяется при проведении аортокоронарного шунтирования [13]. Выявлено, что прочность полимерных каркасов PNBV/PCL/VEGF/bFGF/SDF-1 α составляла 3,5 (2,88; 3,24) МПа и превышала прочность каркасов с изолированным введением ростовых факторов и хемоаттрактантной молекулы – 2,04 (1,70; 2,35) МПа, при равной толщине выдерживая большую нагрузку при растяжении ($p < 0,05$), и соответственно, характеризовались большим напряжением (рис. 2). Некоторое увеличение прочности двухслойных

трубчатых полимерных матриц приближало их по физико-механическим свойствам к внутренней грудной артерии человека. Достоверных различий между двумя типами протезов по относительному удлинению и модулю Юнга не выявлено.

Синтетические протезы кровеносных сосудов PNBV/PCL с VEGF, bFGF, SDF-1 α , а также комплексом VEGF/bFGF/SDF-1 α имплантировали в аорту крыс на 3, 6 и 12 месяцев. Поскольку для крыс характерна активная миграция клеток из нативного сосуда в сосудистый протез через зону анастомоза [14], в последующем проводили исследование средней части имплантированных конструкций.

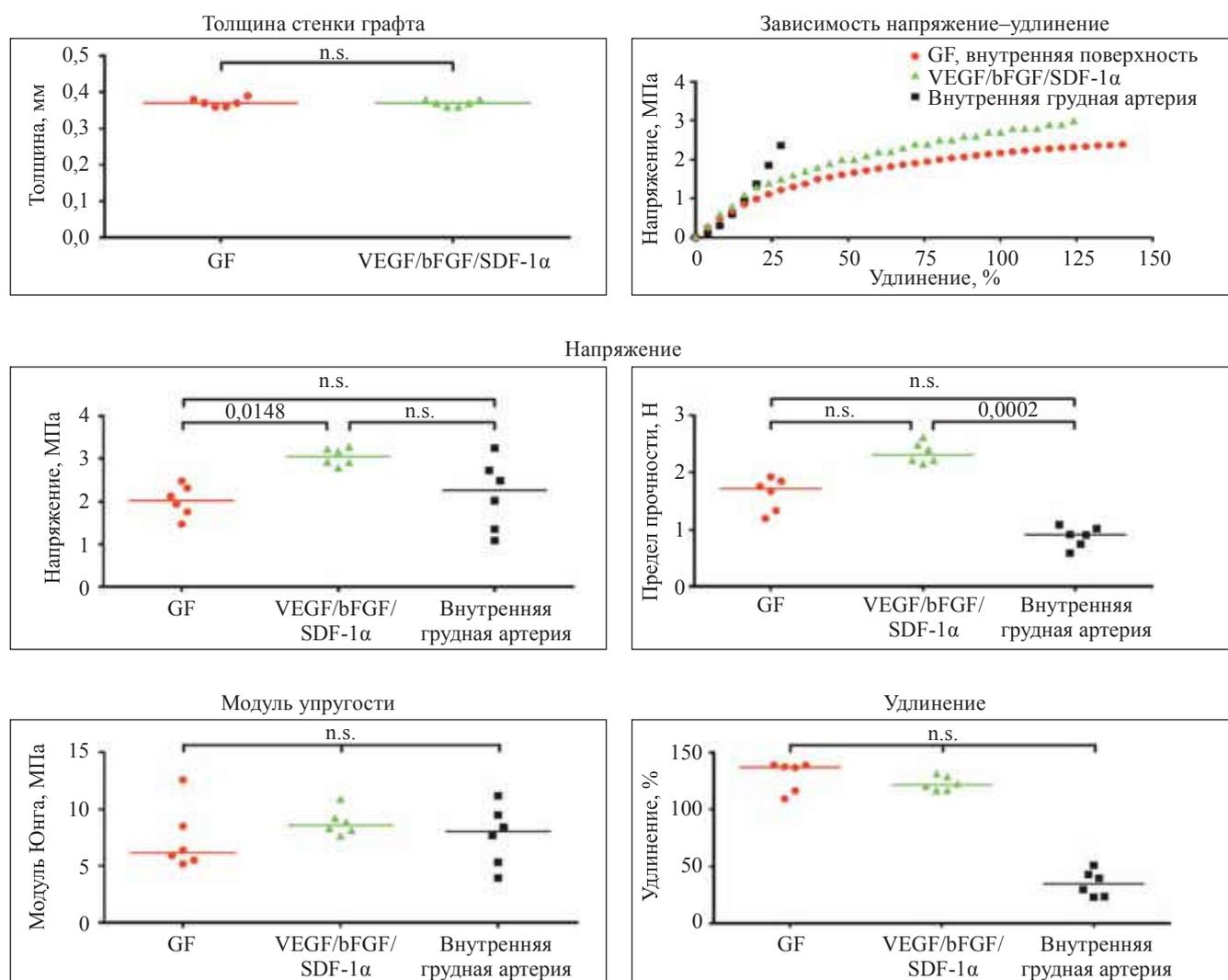


Рис. 2. Механические испытания полимерных трубчатых каркасов, модифицированных отдельно VEGF, bFGF или SDF-1 α (GF) либо тремя факторами одновременно (VEGF/bFGF/SDF-1 α). Данные представлены в виде диаграммы рассеяния с медианой, каждая точка представляет собой измерения от одного каркаса, для сравнения данных использован критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Данна для множественных сравнений, р-уровень с поправкой на множественные сравнения представлен в числовом виде, n.s. – отсутствие достоверных отличий

Fig. 2. Mechanical testing of the grafts modified exclusively with either VEGF, bFGF or SDF-1 α (merged in GF group due to being one-layer), or with all three factors having a two-layer structure. Data are represented as a univariate scatterplot with the median, each dot represents a measurement from one graft, Kruskal–Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test, p values adjusted for multiple comparisons are reported in a numerical manner, n.s. is for not significant. For a stress-strain curve, each dot represents the median of respective measurements for all six graft samples from the testing

После трех месяцев имплантации первичная проходимость для всех типов протезов была одинаковой и составила 75% (3 из 4), а через 6 и 12 месяцев она снижалась до 50% (2 из 4) для каркасов, модифицированных bFGF и SDF-1 α , но при этом достигала 75% (3 из 4) для сосудистых протезов с VEGF и

100% (4 из 4) для протезов с тремя инкорпорированными биоактивными молекулами. Непроходимость биodeградируемых сосудистых протезов была обусловлена формированием пристеночного тромба в зоне анастомоза, перекрывавшего большую часть просвета (рис. 3).

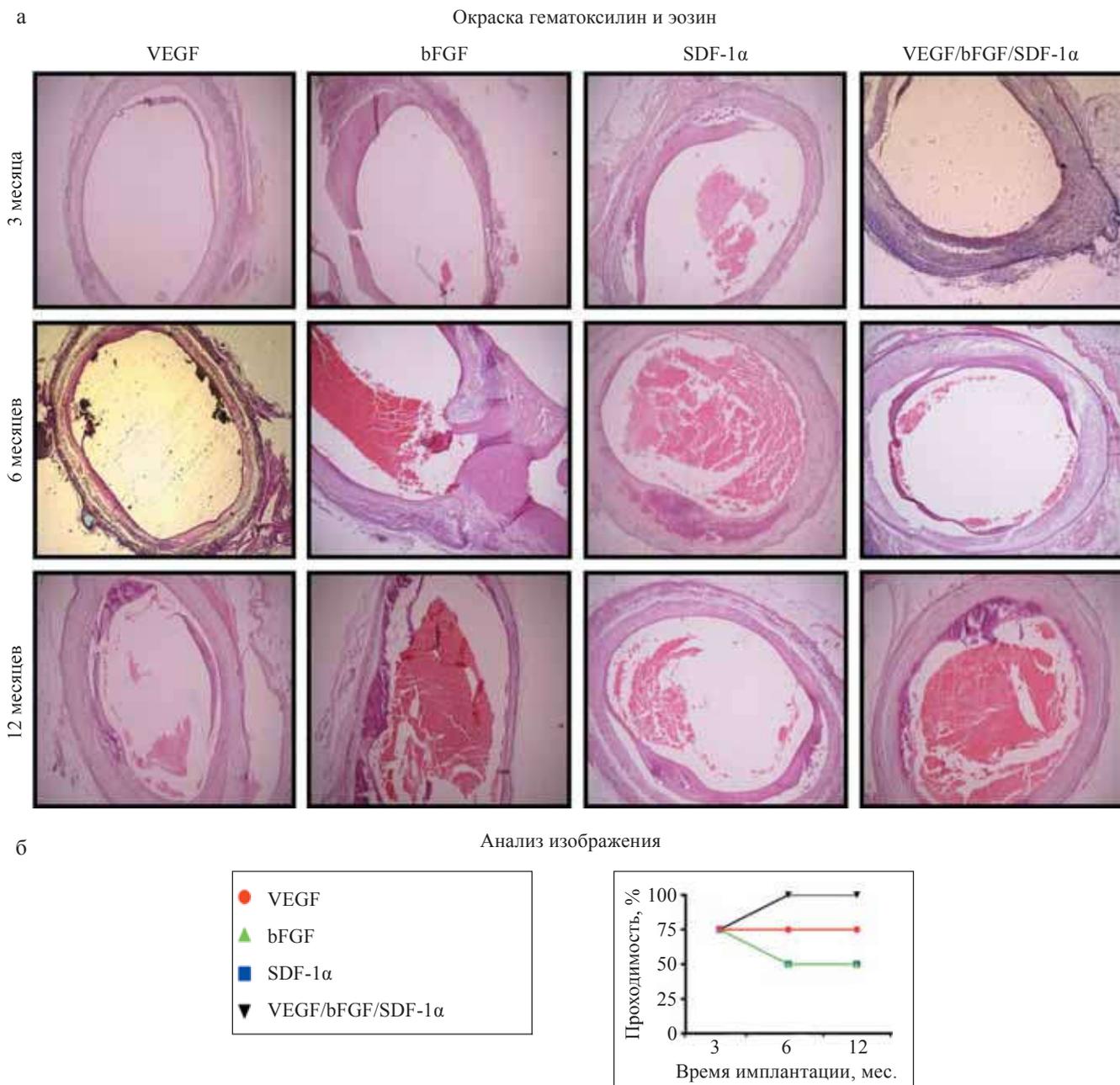


Рис. 3. Прходимость биodeградируемых сосудистых протезов, модифицированных комбинацией VEGF/bFGF/SDF-1 α , после имплантации в кровеносное русло в сравнении с протезами с одним из этих факторов: а – изображения световой микроскопии гистологических срезов с окраской гематоксилином и эозином протезов с одним из факторов – VEGF, bFGF или SDF-1 α и комбинацией этих факторов через 3, 6 и 12 месяцев после имплантации, $\times 50$; б – количественный анализ изображения, каждая точка представляет собой количество проходивших протезов в соответствующей экспериментальной группе в каждую временную точку

Fig. 3. Primary patency of the grafts modified with a combination of VEGF, bFGF, and SDF-1 α after the implantation into abdominal aorta compared to the grafts modified with either of these factors: a – representative images of the H&E-stained grafts modified with either VEGF, bFGF, SDF-1 α , or all three factors at 3, 6, and 12 months postimplantation, $\times 50$; б – quantitative image analysis, each dot represents a primary patency rate with respect to the experimental group and time point

В проходимых имплантатах через 3 месяца на внутренней поверхности определяли неоинтимальную выстилку. В протезах с VEGF и комбинацией биомолекул неоинтима была представлена тонким слоем, в образцах с SDF-1 α имела вариабельную толщину, а с bFGF неоинтимальная выстилка имела форму полулуния и значительно варьировала по своей толщине, порой превышая толщину стенки самого сосудистого протеза. Однако к 6 и 12 месяцам имплантации ни в одном из графтов не отмечали увеличения размера неоинтимы или ее гиперплазии.

Возможным эффектом введения bFGF и SDF-1 α в структуру тканеинженерного трубчатого каркаса является привлечение специфических клеток в место регенерации и улучшение их выживаемости. Поэтому для оценки влияния bFGF и SDF-1 α на эндотелиализацию внутренней поверхности матриц PNBV/PCL образцы на первом этапе окрашивали на фактор фон Виллебранда (vWF) (рис. 4). vWF представляет собой гликопротеин, который синтезируется эндотелиальными клетками и осуществляет их связывание с коллагеном и ламинином [15]. bFGF и SDF-1 α , отдельно инкорпорированные в полимерные каркасы, не стимулировали формирование эндотелиального слоя по сравнению с VEGF на всех сроках имплантации. Однако наличие эндотелиальных клеток отмечали на внутренней поверхности всех образцов. Учитывая неспособность bFGF и SDF-1 α самостоятельно стимулировать формирование эндотелиального слоя, была выдвинута гипотеза о возможном поддержании VEGF-опосредованной эндотелизации этими двумя факторами. Для изучения этого вопроса проводили оценку эндотелиальных клеток предполагаемого монослоя, с двойным иммунофлуоресцентным окрашиванием на маркер зрелых (CD31) и прогениторных (CD34) эндотелиальных клеток. Результаты показали, что введение bFGF и SDF-1 α в дополнение к VEGF приводило к увеличению содержания CD31-позитивных клеток на внутренней поверхности тканеинженерных сосудистых протезов через 6 и 12 месяцев после имплантации, что не было отмечено для протезов с введением только bFGF или SDF-1 α (рис. 5). Никаких специфических эффектов биологически активных молекул в отношении CD34-позитивных клеток не отмечено, что может быть связано с быстрой дифференцировкой CD34-позитивных клеток в более зрелые после адгезии к поверхности матрикса.

Оценку влияния bFGF и SDF-1 α на привлечение в стенку биodeградируемого протеза кровеносного сосуда коллаген-продуцирующих клеток по сравнению с действием только VEGF проводили с помощью флуоресцентного окрашивания на

ядра клеток (DAPI) и коллагены I и IV (рис. 6), так как преимущественно коллагены данных типов входят в состав артериальной стенки [16, 17]. Результаты показали, что значительное содержание коллагеновых волокон присутствовало в стенке всех трансплантатов, но каких-либо существенных различий по количеству коллаген-продуцирующих клеток между всеми типами протезов не было (рис. 6).

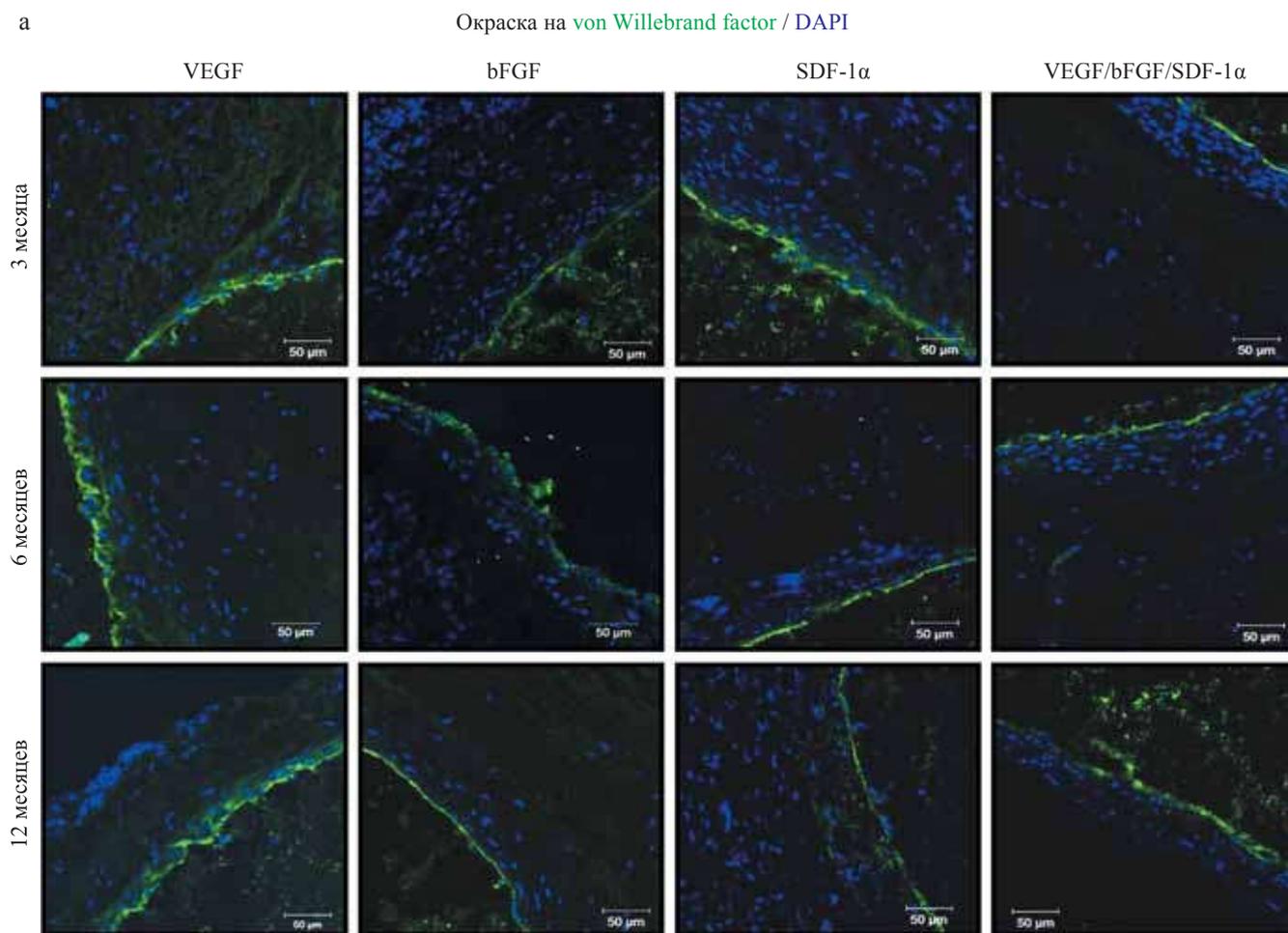
Большое количество α -SMA-позитивных клеток, формирующих группы клеток и слои в стенке тканеинженерного сосудистого протеза, определяли в протезах с bFGF и с тремя биоактивными молекулами уже после 3-го месяца имплантации (рис. 7). Таким образом, вероятно, что bFGF оказывает стимулирующее действие на образование гладкомышечного слоя. При этом стоит отметить, что слой ГМК наблюдали во всех полимерных трубчатых каркасах через 12 месяцев после имплантации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Общепризнанным является то, что сформированный непрерывный эндотелиальный слой на внутренней поверхности сосудистых имплантатов препятствует тромбообразованию, в то время как слой ГМК и организованная структура межклеточного матрикса с достаточным содержанием коллагена и эластина обеспечивают сократимость стенки и строение, близкое к нативным артериям, что обеспечивает оптимальную комплаентность стенки [6, 18–20]. Инкорпорирование ростовых факторов в полимерные тканеинженерные матриксы методом электроспиннинга представляет собой перспективный подход для создания материалов, способных привлекать на свою поверхности клетки, а также стимулировать их адгезию, пролиферацию и жизнеспособность [21, 22].

Для изготовления трубчатых полимерных матриц использовали двухфазный электроспиннинг. Данная технология обеспечивает не только контролируемое стабильное высвобождение одного или нескольких биоактивных веществ из биodeградируемого материала, но и позволяет разделять биологические молекулы и полимер посредством изготовления эмульсии раствора полимера в органическом неполярном растворителе, с образованием отдельных капель с биомолекулами внутри полимерного волокна в результате испарения органического растворителя в процессе электроспиннинга [23, 24].

В настоящей работе среди множества доступных биологически активных факторов для введения в биodeградируемые сосудистые протезы были выбраны VEGF, bFGF и SDF-1 α благодаря их способности активировать и привлекать ЭК и ГМК.



б

Анализ изображения: окраска на vWF

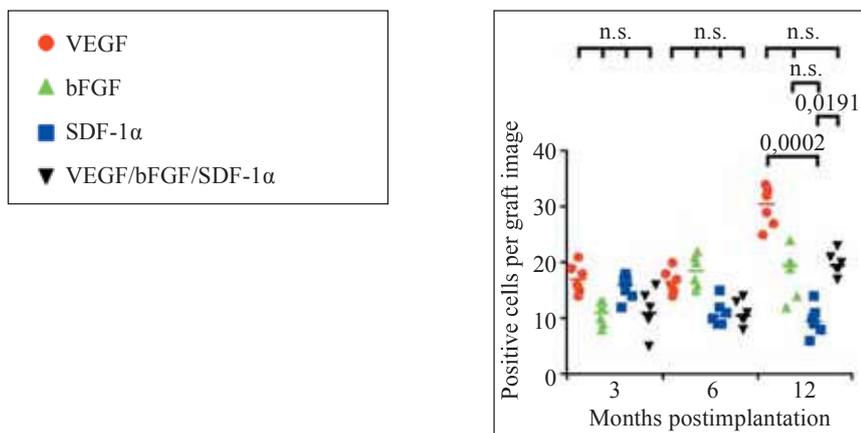


Рис. 4. Изображения конфокальной микроскопии биodeградируемых сосудистых протезов с одним из факторов – VEGF, bFGF или SDF-1 α и комбинацией этих факторов через 3, 6, и 12 месяцев имплантации: а – окраска на vWF (зеленый) и DAPI (синий), $\times 200$; б – количественный анализ изображений – данные представлены в виде диаграммы рассеяния с медианой, каждая точка представляет собой количество клеток на одном изображении, для сравнения данных использован критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Данна для множественных сравнений, р-уровень с поправкой на множественные сравнения представлен в числовом виде, n.s. – отсутствие достоверных отличий

Fig. 4. Confocal laser scanning microscopy images of the grafts modified with either VEGF, bFGF, SDF-1 α , or all three factors at 3, 6, and 12 months postimplantation: а – vWF (green) and DAPI (blue) staining, $\times 200$; б – quantitative image analysis, data are represented as a univariate scatterplot with the median, each dot represents a count from one image, Kruskal–Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test, p values adjusted for multiple comparisons are reported in a numerical manner, n.s. is for not significant

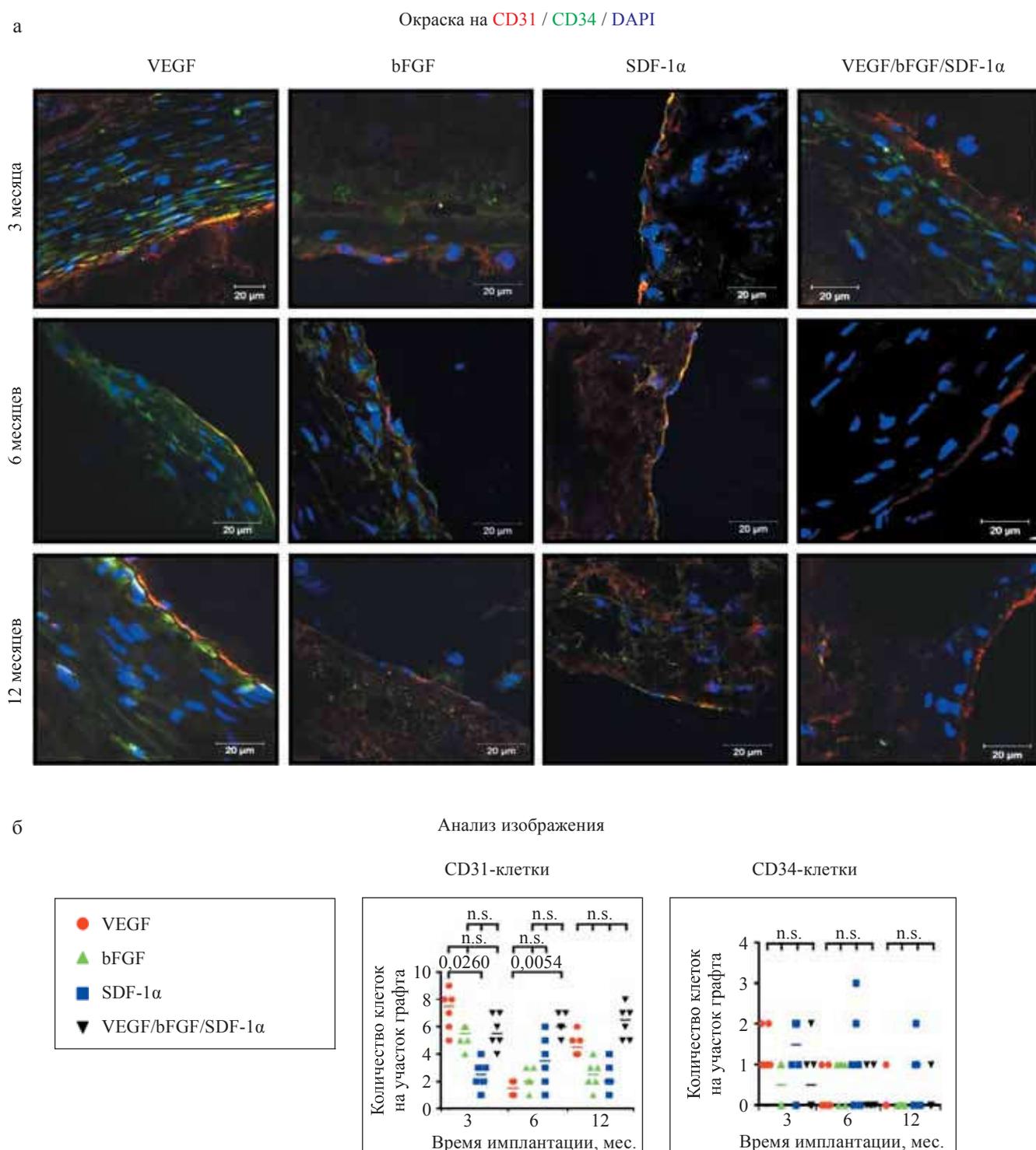
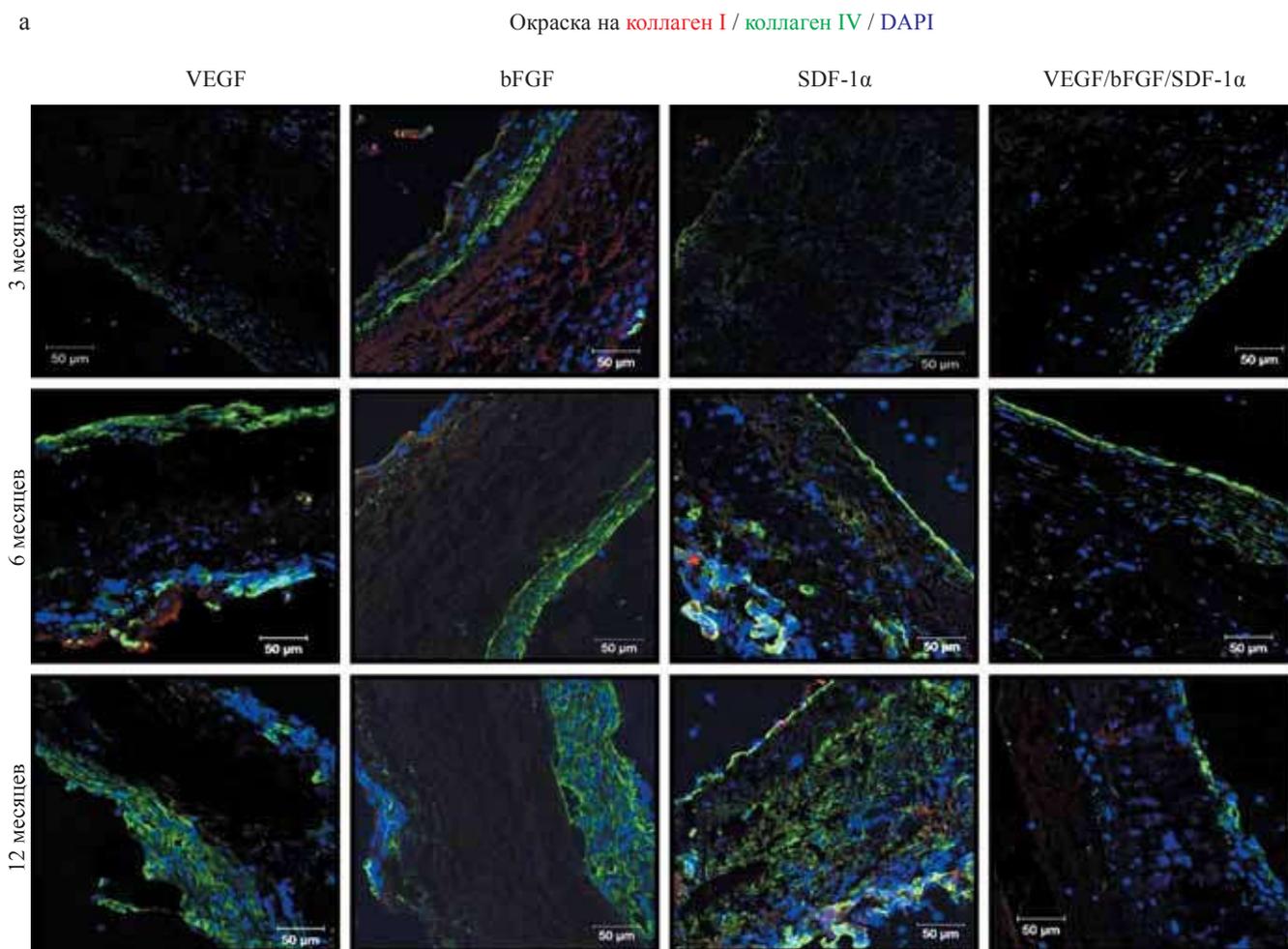


Рис. 5. Изображения конфокальной микроскопии биodeградируемых сосудистых протезов с одним из факторов – VEGF, bFGF или SDF-1 α и комбинацией этих факторов через 3, 6, и 12 месяцев имплантации: а – окраска на CD31 (красный), CD34 (зеленый) и DAPI (синий), $\times 630$; б – количественный анализ изображения, данные представлены в виде диаграммы рассеяния с медианой, каждая точка представляет собой количество клеток на одном изображении, для сравнения данных использован критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Данна для множественных сравнений, р-уровень с поправкой на множественные сравнения представлен в числовом виде, n.s. – отсутствие достоверных отличий

Fig. 5. Confocal laser scanning microscopy images of the grafts modified with either VEGF, bFGF, SDF-1 α , or all three factors at 3, 6, and 12 months postimplantation: а – CD31 (red), CD34 (green), and DAPI (blue) staining, $\times 630$; б – quantitative image analysis, data are represented as a univariate scatterplot with the median, each dot represents a count from one image, Kruskal–Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test, p values adjusted for multiple comparisons are reported in a numerical manner, n.s. is for not significant



б Анализ изображения: окраска на коллаген

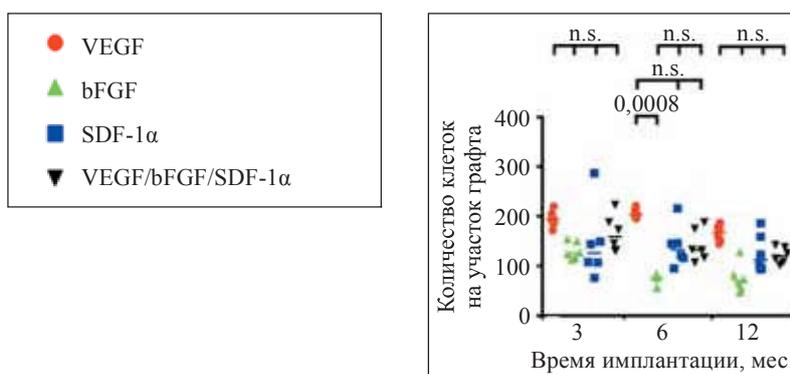
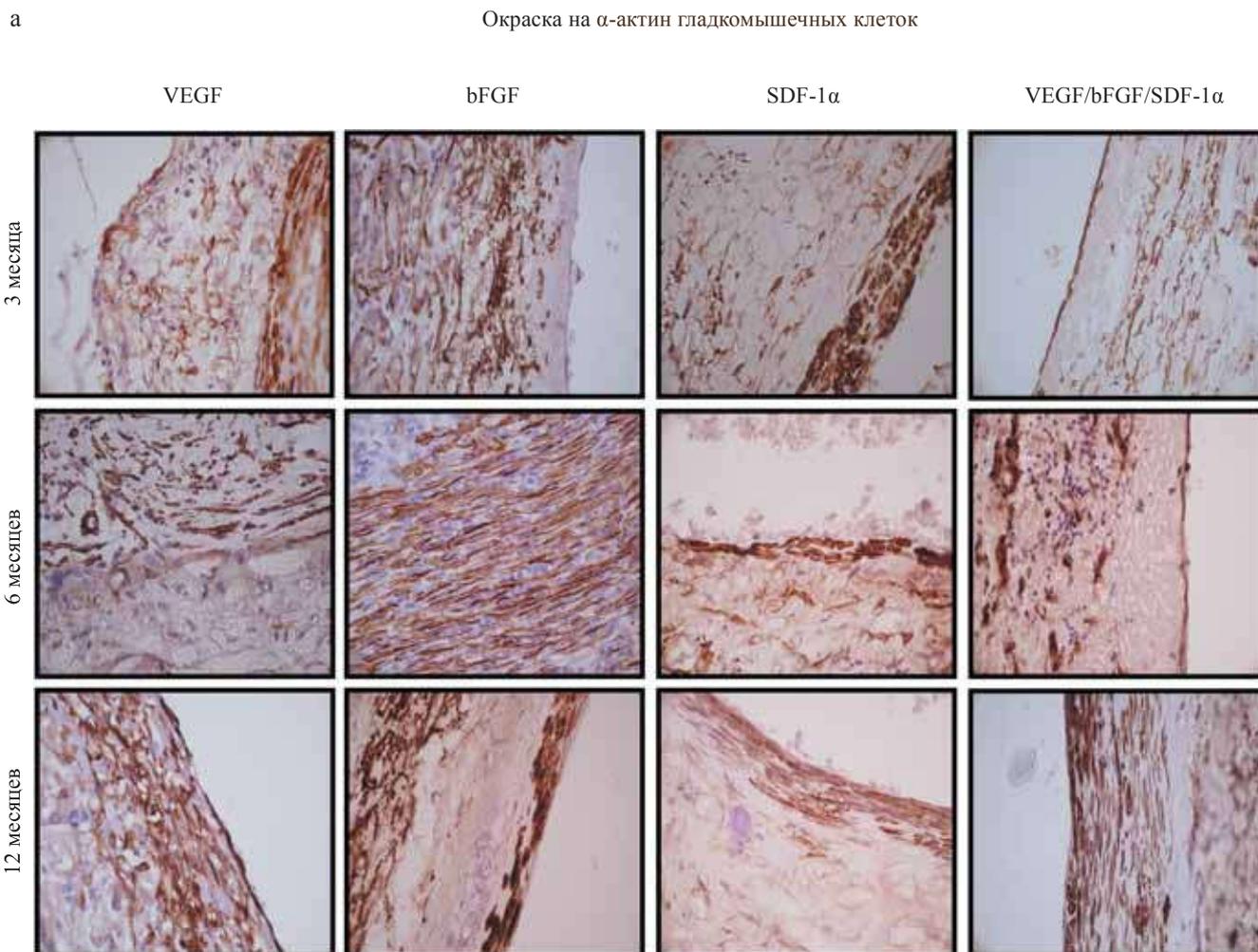


Рис. 6. Изображения конфокальной микроскопии биodeградируемых сосудистых протезов с одним из факторов – VEGF, bFGF или SDF-1 α и комбинацией этих факторов через 3, 6, и 12 месяцев имплантации: а – окраска на коллаген I (красный), коллаген IV (зеленый) и DAPI (синий), $\times 200$; б – количественный анализ изображения, данные представлены в виде диаграммы рассеяния с медианой, каждая точка представляет собой количество клеток на одном изображении, для сравнения данных использован критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Данна для множественных сравнений, р-уровень с поправкой на множественные сравнения представлен в числовом виде, n.s. – отсутствие достоверных отличий

Fig. 6. Confocal laser scanning microscopy images of the grafts modified with either VEGF, bFGF, SDF-1 α , or all three factors at 3, 6, and 12 months postimplantation: а – collagen I (red), collagen IV (green), and DAPI (blue) staining, $\times 200$; б – quantitative image analysis, data are represented as a univariate scatterplot with the median, each dot represents a count from one image, Kruskal–Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test, p values adjusted for multiple comparisons are reported in a numerical manner, n.s. is for not significant



б

Анализ изображения: α -SMA

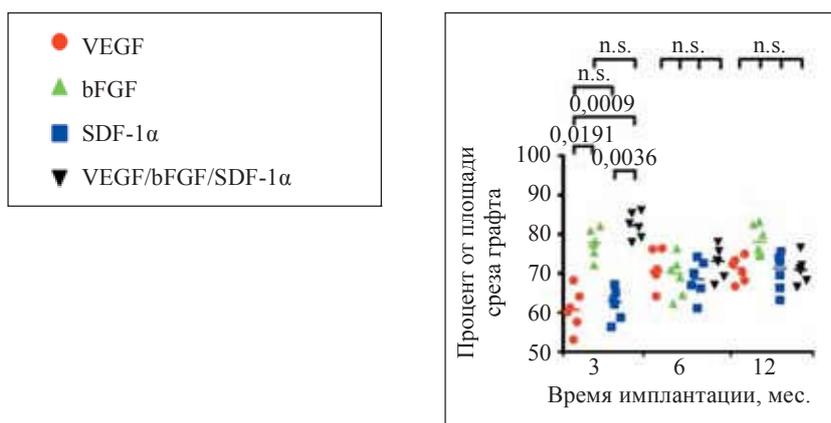


Рис. 7. Изображения световой микроскопии гистологических срезов с иммуногистохимической окраской на α -актин гладкомышечных клеток биodeградируемых сосудистых протезов с одним из факторов – VEGF, bFGF или SDF-1 α и комбинацией этих факторов через 3, 6 и 12 месяцев после имплантации: а – окраска на α -актин (коричневый), $\times 400$; б – количественный анализ изображения, каждая точка представляет собой количество проходимых протезов в соответствующей экспериментальной группе в каждую временную точку

Fig. 7. Light microscopy images, α -SMA immunohistochemistry of the grafts modified with either VEGF, bFGF, SDF-1 α , or all three factors at 3, 6, and 12 months postimplantation: а – α -SMA (brown) staining, $\times 400$; б – quantitative image analysis, data are represented as a univariate scatterplot with the median, each dot represents a count from one image

Было показано, что bFGF и SDF-1 α самостоятельно не стимулировали эндотелизацию по сравнению с VEGF, однако они поддерживали VEGF-индуцированную эндотелиализацию трубчатых каркасов и при этом не оказывали влияния на привлечение коллаген-продуцирующих клеток. Кроме того, следует отметить, что bFGF способствовал формированию гладкомышечного слоя, как самостоятельно, так и в комбинации с биомолекулами. Эти два эффекта могли способствовать высокой первичной проходимости сосудистых имплантатов с VEGF/bFGF/SDF-1 α по сравнению с протезами, содержащими один вид биомолекул.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследований, несмотря на различия в технологии введения биомолекул в состав полимерного материала, то есть инкорпорирование в полимерные волокна и иммобилизация на поверхности [25, 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, биodeградируемые сосудистые протезы малого диаметра, изготовленные методом двухфазного электроспиннинга, с VEGF, инкорпорированным во внутренний слой, и bFGF совместно с SDF-1 α , инкорпорированными во внешний слой, способны к быстрой эндотелизации и формированию гладкомышечного слоя, обеспечивающих высокую первичную проходимость.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «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».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int. J. Artif. Organs*. 2014; 37 (7): 503–512.
2. Tara S, Rocco KA, Hibino N, Sugiura T, Kurobe H, Breuer CK, Shinoka T. Vessel bioengineering. *Circ. J.* 2014; 78 (1): 12–19.
3. Севостьянова ВВ, Головкин АС, Антонова ЛВ, Глушкова ТВ, Барбараш ОЛ, Барбараш ЛС. Модификация матриц из поликапролактона сосудистым эндотелиальным фактором роста для потенциального применения в разработке тканеинженерных сосудистых графтов. *Гены & Клетки*. 2015; X (1): 84–90. Sevostyanova VV, Golovkin AS, Antonova LV, Glushkova TV, Barbarash OL, Barbarash LS. Modification of polycaprolactone scaffolds with vascular endothelial growth factors for potential application in development of tissue engineered vascular grafts. *Genes & Cells*. 2015; X (1): 84–90. [English abstract].
4. Antonova LV, Sevostyanova VV, Kutikhin AG, Mironov AV, Krivkina EO, Shabaev AR et al. Vascular Endothelial Growth Factor Improves Physico-Mechanical Properties and Enhances Endothelialization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Poly(ϵ -caprolactone) Small-Diameter Vascular Grafts in vivo. *Front. Pharmacol.* 2016; 7: 230. doi: 10.3389/fphar.2016.00230.
5. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Matveeva VG, Velikanova EA et al. Conjugation with RGD Peptides and Incorporation of Vascular Endothelial Growth Factor Are Equally Efficient for Biofunctionalization of Tissue-Engineered Vascular Grafts. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (11): 1920. doi:10.3390/ijms17111920.
6. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44 (15): 5680–5742.
7. Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology. *Rep Biochem Mol Biol.* 2014; 2 (2): 59–69.
8. Yang X, Liaw L, Prudovsky I, Brooks PC, Vary C, Oxburgh L, Friesel R. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2015; 17 (6): 509.
9. Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ et al. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials*. 2006; 27 (30): 5242–5251.
10. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*. 2003; 10 (3–4): 359–370.
11. Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Сергеева ЕА, Севостьянова ВВ, Бураго АЮ, Бурков НН и др. Тканеинженерный матрикс, модифицированный биологически активными молекулами для направленной регенерации тканей. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2016; (1): 18–25. Antonova LV, Krivkina EO, Sergeeva EA, Sevostyanova VV, Burago AY, Burkov NN i dr. Tissue engineered scaffold modified by bioactive molecules for directed tissue regeneration. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2016; (1): 18–25. [English abstract].
12. Schober A, Zerneck A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 2007; 97 (5): 730–737.
13. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Eng. Part. B. Rev.* 2014; 20 (6): 628–640.
14. Talacua H, Smits AI, Muylaert DE, van Rijswijk JW, Vink A, Verhaar MC et al. In situ Tissue Engineering of Functional Small-Diameter Blood Vessels by Host Circulating Cells Only. *Tissue Eng. Part. A.* 2015; 21 (19–20): 2583–2594.

15. Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc. Res.* 2002; 64 (3): 384–397.
16. Osidak MS, Osidak EO, Akhmanova MA, Domogatsky SP, Domogatskaya AS. Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21 (9): 1124–1133.
17. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2016; 14 (3): 438–448.
18. Zheng W, Wang Z, Song L, Zhao Q, Zhang J, Li D et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials.* 2012; 33 (10): 2880–2891.
19. Kurobe H, Maxfield MW, Tara S, Rocco KA, Bagi PS, Yi T et al. Development of small diameter nanofiber tissue engineered arterial grafts. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0120328.
20. Mirensky TL, Hibino N, Sawh-Martinez RF, Yi T, Villalona G, Shinoka T, Breuer CK. Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? *J. Pediatr. Surg.* 2010; 45 (6): 1299–1305.
21. Ingavle GC, Leach JK. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng. Part. B. Rev.* 2014; 20 (4): 277–293.
22. Sankaran KK, Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Nanoarchitecture of scaffolds and endothelial cells in engineering small diameter vascular grafts. *Biotechnol. J.* 2015; 10 (1): 96–108.
23. Wei K, Li Y, Mugishima H, Teramoto A, Abe K. Fabrication of core-sheath structured fibers for model drug release and tissue engineering by emulsion electrospinning. *Biotechnol. J.* 2012; 7 (5): 677–685.
24. Spano F, Quarta A, Martelli C, Ottobrini L, Rossi RM, Gigli G, Blasi L. Fibrous scaffolds fabricated by emulsion electrospinning: from hosting capacity to in vivo biocompatibility. *Nanoscale.* 2016; 8 (17): 9293–9303.
25. Yu J, Wang A, Tang Z, Henry J, Li-Ping Lee B, Zhu Y et al. The effect of stromal cell-derived factor-1 α /heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration. *Biomaterials.* 2012; 33 (32): 8062–8074.
26. Muylaert DE, van Almen GC, Talacua H, Fledderus JO, Kluin J, Hendrikse SI et al. Early in situ cellularization of a supramolecular vascular graft is modified by synthetic stromal cell-derived factor-1 α derived peptides. *Biomaterials.* 2016; (76): 187–195.

*Статья поступила в редакцию 7.11.2017 г.
The article was submitted to the journal on 7.11.2017*