

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА В УСЛОВИЯХ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.05

УДК 616.13–77:577.11:691.175

Поступила 10.06.2019 г.



Е.А. Великанова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
В.Г. Матвеева, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
Е.О. Кривкина, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
В.В. Севостьянова, к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
М.Ю. Ханова, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
Ю.А. Кудрявцева, д.б.н., зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии;
Л.В. Антонова, д.м.н., зав. лабораторией клеточных технологий

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Сосновый б-р, 6, Кемерово, 650002

Цель исследования — оценка эффективности использования эндотелиальных колониформирующих клеток (ECFCs) для заселения полимерного сосудистого графта в условиях пульсирующего биореактора.

Материалы и методы. Графты изготавливали методом электроспиннинга из смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата), поли(ε-капролактона) и коллагена I типа. Для проведения экспериментов была использована коммерческая культура первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC), культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и полученные из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца ECFCs. В графты вводили суспензию клеток в концентрации 700 тыс./мл, культивировали 2 сут в статических условиях, затем в пульсирующем биореакторе при напряжении сдвига 1,27 дин/см² в течение одних суток и 2,85 дин/см² — еще 5 сут. Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности графта на выявление маркеров CD31, VEGFR-2, CD144, vWF, F-актина и коллагена IV типа, а также подсчет плотности клеток на 1 мм² поверхности графта.

Результаты. Во всех культурах клеток при культивировании в динамических условиях регистрировали изменения, свидетельствующие об их адаптации к напряжению сдвига, выразившиеся в усилении экспрессии специфических маркеров (VEGFR-2), увеличении секреторной активности в отношении vWF и коллагена IV типа, упорядочивании филаментов F-актина и ориентации клеток вдоль потока, стимуляции образования межклеточных контактов. Однако при этом происходило неизбежное частичное смывание клеток с поверхности графта. Анализ плотности клеточного слоя после окончания динамического культивирования позволил заключить, что ECFCs отличаются наибольшей адгезией к полимеру и устойчивостью к смыванию потоком.

Заключение. С учетом возможности получения из легкодоступного источника (периферическая кровь) и продемонстрированной хорошей адаптации к условиям динамического культивирования ECFCs можно признать наиболее перспективной культурой для заселения тканеинженерных сосудистых протезов. Однако значительное уменьшение плотности клеточного слоя под воздействием напряжения сдвига свидетельствует о недостаточной адгезии клеток к поверхности и требует проведения дальнейших исследований по оптимизации фидерного слоя, покрывающего поверхность полимерного матрикса.

Ключевые слова: тканевая инженерия; полимерные сосудистые графты; эндотелиальные клетки; проточный пульсирующий биореактор.

Как цитировать: Velikanova E.A., Matveeva V.G., Krivkina E.O., Sevostianova V.V., Khanova M.Yu., Kudryavtseva Yu.A., Antonova L.V. Effectiveness of using endothelial colony-forming cells for creating tissue-engineered vascular grafts under *in vitro* conditions. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 44–51, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.05>

Для контактов: Великанова Елена Анатольевна, e-mail: velikanova_ea@mail.ru

Effectiveness of Using Endothelial Colony-Forming Cells for Creating Tissue-Engineered Vascular Grafts under *in vitro* Conditions

E.A. Velikanova, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
 V.G. Matveeva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
 E.O. Krivkina, Junior Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
 V.V. Sevostianova, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
 M.Yu. Khanova, Junior Researcher, Laboratory of Cell Technologies;
 Yu.A. Kudryavtseva, DSc, Head of Experimental and Clinical Cardiology Department;
 L.V. Antonova, MD, DSc, Head of the Laboratory of Cell Technologies

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd, Kemerovo, 650002, Russia

The aim of the investigation was to assess the effectiveness of using endothelial colony-forming cells (ECFCs) for populating polymer vascular grafts under the conditions of a pulsatile bioreactor.

Materials and Methods. Grafts were fabricated by electrospinning from mixture of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), poly(ϵ -caprolactone), and type I collagen. To carry out the experiments, a commercial culture of the primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC), a culture of the human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and ECFCs obtained from the peripheral blood of patients with IHD have been used. A suspension of the cells at a concentration of 700,000 per ml was introduced into the grafts, cultivated for 2 days under static conditions, then in the pulsatile reactor at shear stress of 1.27 dyn/cm² for 1 day, and at 2.85 dyn/cm² for another 5 days. The graft luminal surface underwent immunofluorescent staining for detecting CD31, VEGFR-2, CD144, vWF, F-actin markers and type IV collagen, after that, cell density was also calculated on 1 mm² of the graft surface.

Results. Changes signifying their adaptation to shear stress have been registered in all cell cultures during culturing under dynamic conditions. They manifested themselves in intensified expression of the specific markers (VEGFR-2), increased secretory activity with regard to vWF and type IV collagen, ordered F-actin filaments and orientation of the cells along the flow, stimulation of intercellular junction formation. However, inevitably, the cells were partially washed off from the graft surface. The analysis of cellular layer density after dynamic cultivation allowed us to conclude that ECFCs had the strongest adhesion to the polymer and resistance to washing away with a flow.

Conclusion. ECFCs may be recognized to be the most promising culture for populating tissue-engineered vascular grafts owing to the possibility of being isolated from a readily available source (peripheral blood) and demonstrated good adaptation to the conditions of dynamic cultivation. However, significant reduction of cellular layer density caused by shear stress speaks of insufficient adhesion of the cells to the surface and requires further investigations to optimize a feeder layer covering the surface of a polymer scaffold.

Key words: tissue engineering; polymer vascular grafts; endothelial cells; pulsatile flow bioreactor.

Введение

Одним из направлений тканевой инженерии является разработка способа воссоздания структуры нативного сосуда для использования полученных конструкций в качестве протеза для замещения пораженных сосудов [1]. Как известно, стенка сосуда состоит из трех функционально различных слоев. При этом минимальным требованием к тканеинженерному сосуду является формирование внутреннего эндотелиального слоя, который, как ожидается, будет предотвращать тромбирование протеза — осложнение, препятствующее внедрению тканеинженерных сосудов малого диаметра в клиническую практику [2, 3].

Существуют различные подходы к реализации этой задачи, включающие в себя имплантацию в кровеносное русло графтов, модифицированных с целью привлечения эндотелиальных клеток (ЭК), для выращивания сосуда *in situ*; различные варианты имплантации графта в ткани (например, под кожу) — для выращи-

вания сосуда *in vivo* и предварительное культивирование *in vitro* до получения полноценного эндотелиального монослоя на поверхности графта, готового к имплантации в сосудистое русло [1, 4].

Преимущество последнего подхода по сравнению с выращиванием *in situ* заключается в том, что созданный на поверхности графта функциональный эндотелиальный слой способен выполнять антитромбогенную функцию начиная непосредственно с момента имплантации [5, 6].

Однако данный подход предъявляет определенные требования к предварительному культивированию клеток на графте. Для успешной последующей адаптации к условиям организма и сохранения эндотелиального слоя после имплантации необходимо обеспечить по возможности наиболее физиологические условия культивирования клеток с помощью специализированных проточных биореакторов. Подбор оптимальных биохимических и механических воздействий на клетки в период формирования эндотелиального

слюя *in vitro* — одна из основных задач, которая должна решаться в процессе создания такого протеза [7, 8].

Другой, не менее важной, задачей является выбор оптимального источника клеток для заселения внутренней поверхности. Исследователями был использован большой спектр клеток различного происхождения. Широко применялись зрелые аутологичные ЭК из различных источников, ЭК из вены пуповины человека; также привлекают внимание исследователей эндотелиальные прогениторные клетки, которые могут быть получены из периферической и пуповинной крови, костного мозга, резидентных стволовых клеток тканей [9, 10].

Одним из наиболее перспективных кандидатов для использования в тканевой инженерии являются колониеформирующие эндотелиальные клетки (endothelial colony-forming cells, ECFCs), которые могут быть получены из периферической крови пациентов и сочетают в себе достоинства различных типов эндотелиальных клеток. Преимуществами данного вида клеток являются низкая инвазивность процедуры их получения и достаточная пролиферативная активность для создания эндотелиального монослоя на поверхности сосудистого графта в условиях *in vitro*. Однако вызывает опасение возможность снижения жизнеспособности и пролиферативной активности полученных ECFCs в культуре по причине преклонного возраста пациентов, нуждающихся в тканеинженерных сосудистых протезах, или возможной эндотелиальной дисфункции [10].

Цель нашей работы — оценка возможностей использования ECFCs для заселения полимерного сосудистого графта в условиях пульсирующего потока путем сравнения их характеристик с другими типами эндотелиальных клеток.

Материалы и методы

Изготовление сосудистых графтов. Графты изготавливали методом электроспиннинга на приборе Nanon-01A (MECC Co., Ltd., Япония) из поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (Sigma-Aldrich, США) и поли(ε-капролактона) (Sigma-Aldrich) в соотношении 1:2, растворенных в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанолe (Sigma-Aldrich). Коллаген I типа (Gibco, США) вводился в состав внутренней трети стенки графтов путем отдельной подачи смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) с поли(ε-капролактоном) и раствора коллагена в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанолe в двух отдельных шприцах с конечной концентрацией коллагена 5 мг/мл. Диаметр намочного коллектора составил 4 мм. Для изготовления внутренней трети графтов использовалась игла калибра 27G, для изготовления других двух третей — 22G. Напряжение на игле составило 23 кВ, скорость подачи раствора полимера — 0,3 мл/ч, скорость вращения коллектора — 200 об./мин, расстояние от иглы до намочного коллектора — 15 см.

Культивирование клеток. Данное исследование одобрено Этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово). У пациентов было получено информированное согласие на применение биологического материала в научном исследовании.

Для проведения экспериментов использована коммерческая культура первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) (Cell Applications, США), культура эндотелиальных клеток из вены пуповины человека (HUVEC) и полученные из периферической крови пациентов с ИБС колониеформирующие эндотелиальные клетки (ECFCs).

Согласно информации производителя, первичные эндотелиальные клетки человека были получены из артерий здоровых доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток в базальной среде Mesoendo cell basal medium (Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида). Клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя, в среде для роста клеток Mesoendo cell growth medium (Cell Applications).

Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека выделяли согласно адаптированному протоколу E.A. Jaffe с соавт. [11], пуповины забирали после благополучного родоразрешения от неосложненной беременности. Клетки культивировали в среде MCDB 131 (Gibco, США) с добавлением комплексной добавки для роста эндотелиальных клеток Microvascular growth supplement (Gibco).

Колониеформирующие эндотелиальные клетки получали по протоколу M. Kolbe с соавт. [12]. Мононуклеарную фракцию периферической крови пациентов с ИБС выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich).

Полученную суспензию клеток ресуспендировали в питательной среде EGM-2MV (Lonza, Швеция), заселяли в покрытые бычьим коллагеном I типа (Thermo Fisher, США) культуральные матрасы 25 см² и культивировали в течение недели в условиях CO₂-инкубатора. Затем клетки пересевали, снимая с поверхности матрасов с помощью аккутазы (Sigma-Aldrich) и культивировали на планшетах, покрытых фибронектином человека (Sigma-Aldrich). Дальнейший пересев культуры проводили по достижении 70–80% конfluenceнтности.

Для заселения графтов использовали клетки 6–8-го пассажей. Все эксперименты с клетками выполняли в стерильных условиях, культивировали их в условиях CO₂-инкубатора при 37°C, 5% CO₂.

Подготовка графтов и заселение в биореакторе. Полимерные графты стерилизовали замачиванием в 70% этиловом спирте в течение 60 мин. Затем с целью улучшения адгезивных свойств внутренней поверхности их помещали на 12 ч в раствор фибронектина человека (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкг/мл.

В подготовленные таким образом графты вводили суспензию клеток в концентрации 700 тыс./мл. В первые 8 ч после заселения графты переворачивали каждые 30 мин для равномерного расселения клеток по поверхности. Через сутки проводили замену культуральной среды. Общее время культивирования графтов в статических условиях составило 2 сут. После этого протезы подключали к системе пульсирующего биореактора (рис. 1) и культивировали на предварительных настройках, обеспечивающих напряжение в 1,27 дин/см² в течение суток. Затем постепенно увеличивали напряжение, доводя его до значений рабочего режима — 2,85 дин/см². В таком режиме культивировали еще 5 сут.

Часть графтов, составлявших контрольную группу, продолжали культивировать в статических условиях аналогичный промежуток времени с заменой культуральной среды дважды в сутки.

Проведение анализа. После окончания эксперимента выполняли иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности графта. Для этого его 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 выявление маркеров эндотелиальных клеток: CD31, VEGFR-2, CD144, vWF, маркера адгезии F-актина и на коллаген IV типа. Перед окрашиванием на внутриклеточные маркеры (vWF, F-актин) проводили пермеабиллизацию 0,1% раствором Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США). На наличие маркера F-актина выполняли окрашивание фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher, США), в соответствии с инструкцией производителя. Для остальных маркеров использовали первичные антитела: mouse anti-CD31 (ab119339), rabbit anti-VEGFR-2 (ab2349), rabbit anti-CD144 (ab33168), sheep anti-vWF — FITC (ab8822), rabbit anti-collagen IV (ab8866) (Abcam, Великобритания) 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). Инкубацию с первичными антителами проводили при 4°C в течение 16 ч, с вторичными — при комнатной температуре в течение часа. Для блокировки неспецифического связывания использовали раствор 1% бычьего сывороточного альбумина. Образцы докрасивали красителем DAPI (Sigma-Aldrich). Готовые стекла заключали в реагент ProLong (Life Technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Дополнительно проводили анализ на плотность заселения поверхности графта клетками. На окрашенных DAPI препаратах подсчитывали количество ядер в поле зрения, анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении в 20 раз.

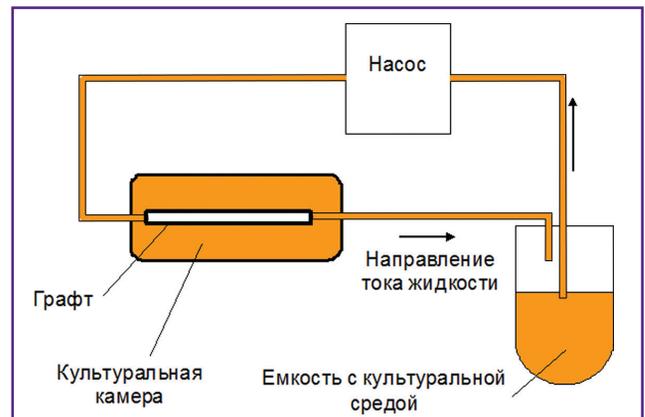


Рис. 1. Схема проточного биореактора

Полученные результаты пересчитывали на единицу площади и представляли как ед./мм².

Обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Соответствие распределения данных нормальному оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены как медиана и квартили (Me [25%; 75%]). Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Оценка плотности заселения поверхности графтов клетками. Микроскопический анализ показал различную тенденцию в заселении поверхности графта разными типами клеток. Для культуры HCAEC характерно образование локальных скоплений клеток с плотными межклеточными контактами. ECFCs более равномерно расселялись по поверхности графта. Культура HUVEC демонстрировала наиболее оптимальное заселение, обеспечивая достаточно полное покрытие поверхности с выраженными контактами между клетками.

Для культуры ECFCs было характерно умеренное заселение поверхности графта (161,35 [110,93; 252,11]) в ходе культивирования в течение 7 сут при статических условиях (рис. 2). При этом при культивировании в течение аналогичного срока в условиях динамической нагрузки данный показатель оказался статистически значимо ($p < 0,05$) выше и составил 252,11 [201,69; 312,62].

Клетки коммерческой линии HCAEC в целом также продемонстрировали умеренное заселение поверхности графта, при этом не было обнаружено различия при культивировании в статических или динамических условиях — 211,77 [161,35; 262,20] и 201,69 [141,18; 211,77] соответственно. Однако плотность заселения HCAEC в динамике была значимо ниже ($p < 0,05$), чем

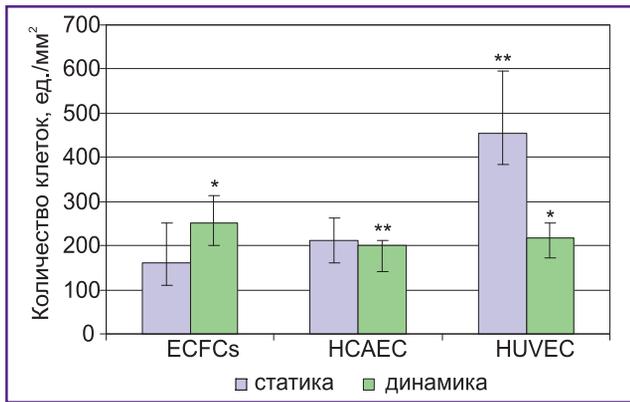


Рис. 2. Количество клеток на внутренней поверхности графта на единицу площади

* — статистически значимые отличия от графтов, культивированных в статике, $p < 0,05$; ** — от графтов, заселенных ECFCs, $p < 0,05$

в аналогичных условиях при использовании для заселения ECFCs (см. рис. 2).

На культуре HUVEC была получена максимальная плотность покрытия поверхности при культивировании в статике — 453,80 [383,21; 594,99] ($p < 0,05$ при сравнении с ECFCs и HCAEC). Однако полученный эндотелиальный монослой не был достаточно устойчивым к воздействию напряжения сдвига: при культивировании в динамике плотность клеток составила 216,82 [171,44; 252,11] ($p < 0,05$ при сравнении со статикой), что сравнимо с данными, полученными на ECFCs и HCAEC.

Иммунофлюоресценция. На основе результатов окраски специфическими антителами был выполнен анализ влияния пульсирующего потока на фенотип

клеток, межклеточные контакты, функциональную активность, адгезию клеток к поверхности. Выявлено, что для всех типов клеток, используемых в эксперименте, характерен высокий уровень экспрессии маркеров, специфичных для эндотелиальных клеток CD31, VEGFR-2, CD144. При этом фенотип клеток сохранялся при культивировании как в статических условиях, так и в условиях пульсирующего потока.

Культура ECFCs очень интенсивно экспрессировала маркеры эндотелиальных клеток CD31, CD144 как в статических, так и динамических условиях культивирования (рис. 3). Клетки синтезировали vWF и коллаген IV типа. В статике была отмечена умеренная экспрессия VEGFR-2, значительно усилившаяся под воздействием напряжения сдвига. Как в статике, так в динамике в клетках обнаруживали выраженные филаменты F-актина, при этом в случае культивирования в динамических условиях отмечали их большую упорядоченность и тенденцию к ориентированию по направлению потока.

Культура HUVEC также демонстрировала высокую экспрессию эндотелиальных маркеров (CD31, CD144) в статике и динамике (рис. 4). Выраженность формирования межклеточных контактов (по окраске на CD144) была самой высокой среди всех исследуемых культур. Отмечалось значительное усиление синтеза vWF в динамических условиях культивирования. В статике клетки характеризовались низкой экспрессией VEGFR-2, значительно усилившейся в динамике. Наблюдали очень интенсивный синтез коллагена IV и сборку F-актина в статике и динамике.

В отношении экспрессии специфических маркеров для культуры HCAEC в целом сохранялась вышеописанная тенденция (рис. 5). Особенностью их явилась слабая выраженность межклеточных контактов

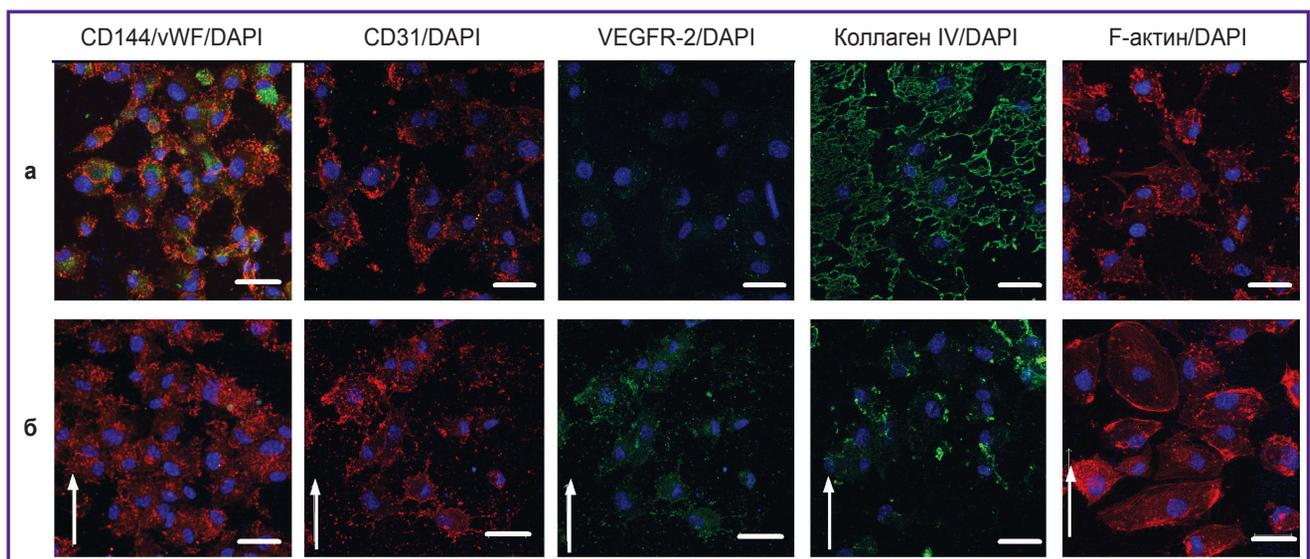


Рис. 3. Иммунофлюоресцентное окрашивание внутренней поверхности графтов, заселенных ECFCs:

а — образцы, культивированные в статике; б — образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелками указано направление потока; $\times 630$; бар — 50 мкм

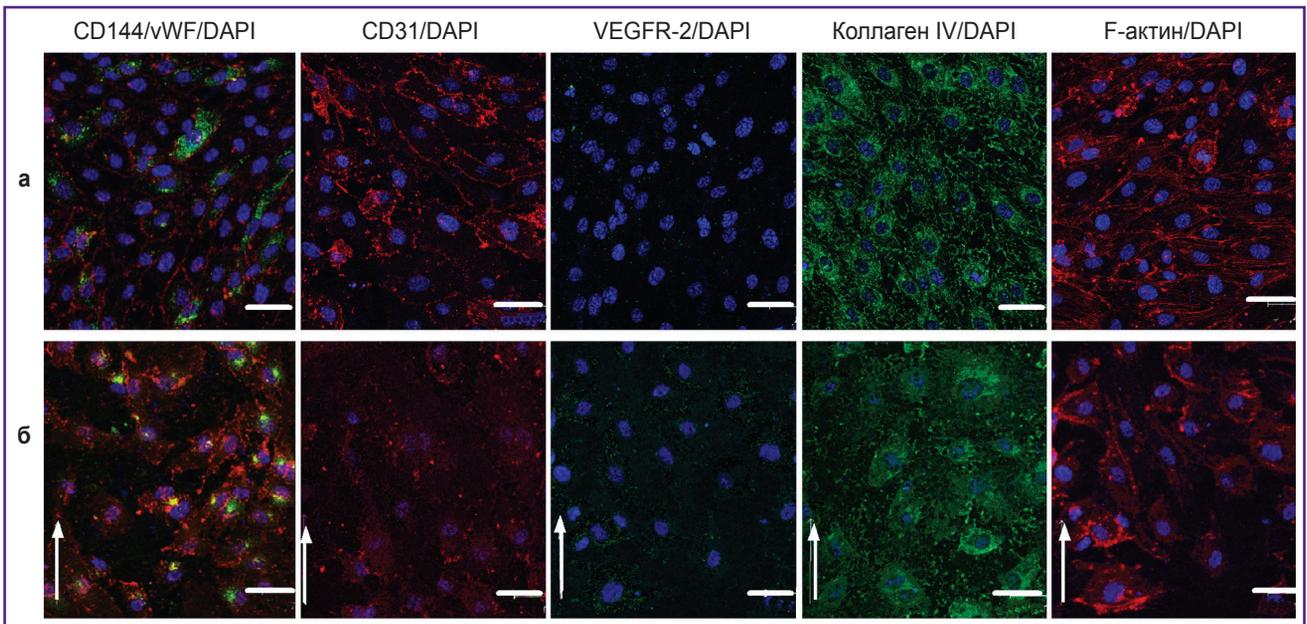


Рис. 4. Иммунофлюоресцентное окрашивание внутренней поверхности графтов, заселенных HUVEC:
 а — образцы, культивированные в статике; б — образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелками указано направление потока; $\times 630$; бар — 50 мкм

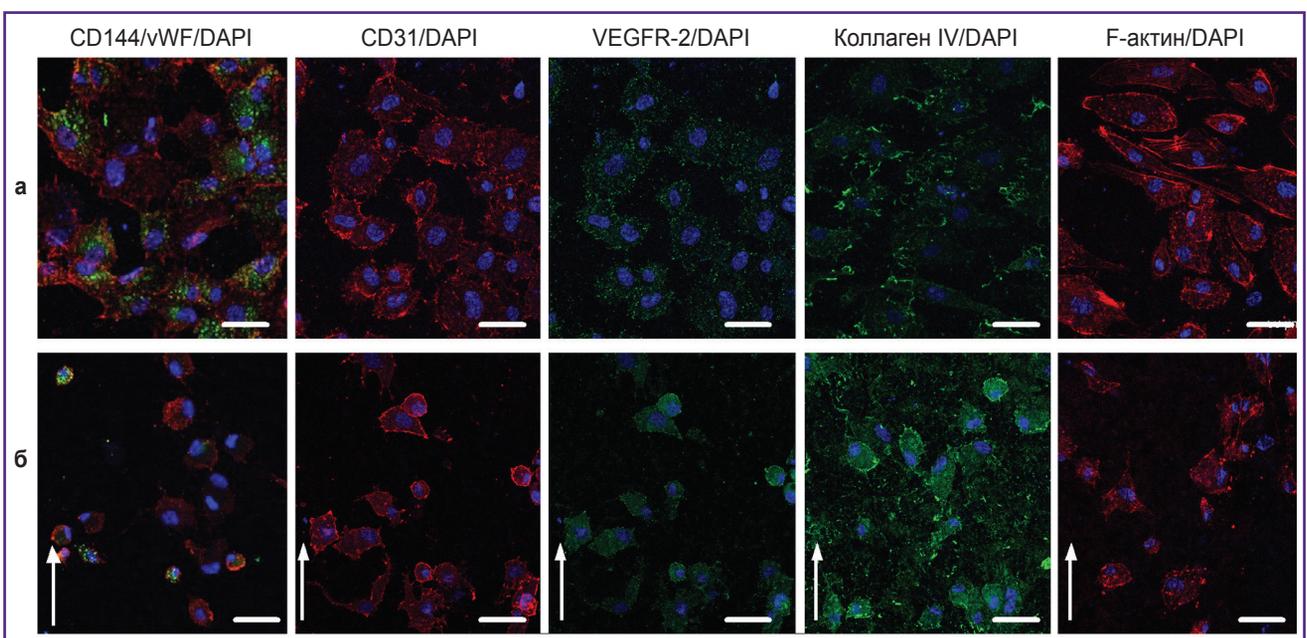


Рис. 5. Иммунофлюоресцентное окрашивание внутренней поверхности графтов, заселенных HSAECs:
 а — образцы, культивированные в статике; б — образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелками указано направление потока; $\times 630$; бар — 50 мкм

в связи с низкой плотностью слоя клеток. Умеренная экспрессия VEGFR-2 отмечена как в статике, так и в динамике. Воздействие пульсирующего потока значительно усиливало синтез клетками коллагена IV. При культивировании в статических условиях внутри клеток обнаруживали упорядоченные филаменты F-актина, тогда как в условиях пульсирующего потока клетки

становились значительно менее распластанными, а филаментная структура нарушалась.

Обсуждение

Напряжение сдвига, которому подвергаются эндотелиальные клетки, выстилающие сосудистую стенку,

играет центральную роль в регулировании их жизнедеятельности. Воздействие данного фактора стимулирует ориентацию клеток относительно друг друга и относительно направления потока, способствует формированию межклеточных контактов, регулирует активацию механосенсоров, внутриклеточных сигнальных путей, специфических транскрипторных факторов и экспрессию генов и белков [13, 14]. Поэтому учитывать данное условие культивирования — ключевой момент при создании клеточно-заселенных тканеинженерных сосудистых протезов *in vitro*.

В организме эндотелиальные клетки подвергаются напряжению сдвига в диапазоне значений 5–20 дин/см² [15]. При этом исследователями используются различные значения этого показателя для моделирования условий выращивания тканеинженерных сосудистых протезов. Так, было показано, что для успешной адаптации заселенных эндотелиальных клеток к воздействию потока необходимо постепенное увеличение уровня напряжения сдвига [16]. Также отмечена успешная эндотелизация протезов в условиях *in vitro* при воздействии низких значений напряжения сдвига [17, 18]. Поэтому в своей работе мы использовали два различных режима работы: адаптационный, предполагающий воздействие в течение суток напряжения сдвига величиной 1,27 дин/см², и рабочий, с напряжением сдвига 2,85 дин/см² и культивированием в течение 5 сут. Подобные режимы культивирования были выбраны с целью адаптации клеток к потоку и для улучшения удержания их на поверхности, что свойственно этим режимам.

Анализ плотности заселения клетками графтов в статических и динамических условиях показал, что наилучшая адаптация к динамическим условиям была характерна для культуры ECFCs. После культивирования в статических условиях в течение недели графты, заселенные ECFCs, демонстрировали относительно невысокую плотность клеточного слоя, сравнимую с таковой у HCAEC, и значительно ниже — в 2,8 раза, чем у HUVEC. Однако на графтах с ECFCs, культивированных в условиях пульсирующего потока, данный показатель был в 1,5 раза выше ($p < 0,05$), чем в статике. При этом плотность клеточного слоя на графтах с HCAEC после динамического культивирования осталась практически на одном уровне со статикой (и значимо ниже, чем на графтах с ECFCs), а на графтах с HUVEC — значительно снизилась, до одного уровня с ECFCs.

Полученные нами результаты о влиянии пульсирующего потока на физиологию клеток в целом соответствуют данным литературы [14]. Культуры всех выбранных клеточных линий (ECFCs, HUVEC, HCAEC) продемонстрировали увеличение синтетической активности и механотрансдукции при культивировании в динамических условиях.

Все культуры независимо от условий культивирования сохраняли выраженную экспрессию маркера эндотелиальных клеток CD31. Для культуры HCAEC как зрелых эндотелиальных клеток была характерна

экспрессия VEGFR-2 как в статике, так и в динамике. При этом клетки линий ECFCs и HUVEC при культивировании в статике демонстрировали низкую экспрессию этого маркера, однако воздействие напряжения сдвига стимулировало усиление экспрессии VEGFR-2, что рассматривается некоторыми исследователями как часть механизма, способствующего поддержанию жизнеспособности эндотелиальных клеток в кровеносном сосуде [19].

Активный синтез vWF свидетельствует о функциональной активности эндотелиальных клеток. В нашем исследовании все типы клеток усиливали синтез vWF в динамических условиях по сравнению со статическими, что служит стандартным ответом эндотелиальных клеток на воздействие напряжения сдвига [20].

Было отмечено, что под воздействием потока увеличивается синтез коллагена IV типа, являющегося компонентом внеклеточного матрикса и базальной мембраны сосудов. Его накопление представляется необходимым процессом для формирования стабильного эндотелиального слоя.

Таким образом, во всех культурах клеток при культивировании в динамических условиях регистрировали изменения, свидетельствовавшие об их адаптации к напряжению сдвига. Однако при этом происходило неизбежное частичное смывание клеток с поверхности графта. По данным плотности клеточного слоя после окончания динамического культивирования можно утверждать, что ECFCs проявляют наибольшую адгезию к полимеру и устойчивость к смыванию потоком. Напротив, при использовании HCAEC по причине их относительно низкого пролиферативного потенциала и меньшей адгезии к полимеру не удалось получить достаточного слоя даже при культивировании в статике. С учетом того, что получение аутологичных зрелых эндотелиальных клеток сопряжено с высокой инвазивностью и представляет значительные сложности, а также того, что у данного вида клеток снижена пролиферирующая активность, эту культуру можно признать малоприспособленной для использования в тканевой инженерии. На культуре HUVEC были получены достаточно хорошие результаты по заселению графтов в статических условиях, однако полученный эндотелиальный слой оказался недостаточно устойчивым к действию потока. Одним из преимуществ HUVEC считается высокая пролиферативная способность, позволяющая получать большое количество клеточной массы. Однако эта культура не подразумевает возможности аллогенного использования. Напротив, аутологичные ECFCs можно выделить из крови пациентов, и они обладают достаточным пролиферативным потенциалом для использования при создании персонализированных тканеинженерных сосудистых протезов [21].

Заключение

Доступность источника (периферическая кровь) и хорошая адаптация к условиям динамического куль-

тивирования позволяют признать ECFCs наиболее перспективной культурой для заселения тканеинженерных сосудистых протезов. Однако значительное уменьшение плотности клеточного слоя под воздействием напряжения сдвига свидетельствует о недостаточной адгезии клеток к поверхности и требует проведения дальнейших исследований по оптимизации фидерного слоя, покрывающего поверхность полимерного матрикса.

Финансирование исследования. Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №17-75-20004 «Разработка физиологически обоснованной технологии изготовления персонализированного тканеинженерного сосудистого имплантата малого диаметра *in vitro* в условиях имитации естественного кровотока с использованием клеточных технологий»).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Benrashed E., McCoy C.C., Youngwirth L.M., Kim J., Manson R.J., Otto J.C., Lawson J.H. Tissue engineered vascular grafts: origins, development, and current strategies for clinical application. *Methods* 2016; 99: 13–19, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.014>.
2. Drews J.D., Miyachi H., Shinoka T. Tissue-engineered vascular grafts for congenital cardiac disease: clinical experience and current status. *Trends Cardiovasc Med* 2017; 27(8): 521–531, <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.06.013>.
3. Melchiorri A.J., Hibino N., Fisher J.P. Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(4): 292–307, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0577>.
4. Hoch E., Tovar G.E., Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014; 46(5): 767–778, <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu242>.
5. Wang X., Lin P., Yao Q., Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg* 2007; 31(4): 682–689, <https://doi.org/10.1007/s00268-006-0731-z>.
6. Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human endothelial cell models in biomaterial research. *Trends Biotechnol* 2017; 35(3): 265–277, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.09.007>.
7. Couet F., Meghezi S., Mantovani D. Fetal development, mechanobiology and optimal control processes can improve vascular tissue regeneration in bioreactors: an integrative review. *Med Eng Phys* 2012; 34(3): 269–278, <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2011.10.009>.
8. van Haaften E.E., Bouten C.V.C., Kurniawan N.A. Vascular mechanobiology: towards control of in situ regeneration. *Cells* 2017; 6(3): E19, <https://doi.org/10.3390/cells6030019>.
9. Kirton J.P., Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* 2010; 79(3): 193–199, <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.02.009>.
10. Lee P.S., Poh K.K. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells* 2014; 6(3): 355–366, <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.355>.
11. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52(11): 2745–2756, <https://doi.org/10.1172/jci107470>.
12. Kolbe M., Dohle E., Katerla D., Kirkpatrick C.J., Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(5): 877–886, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0492>.
13. Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W.B., Dejana E., Schultz D.A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005; 437(7057): 426–431, <https://doi.org/10.1038/nature03952>.
14. Nayak L., Lin Z., Jain M.K. “Go with the flow”: how Krüppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(5): 1449–1461, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3647>.
15. Fisher A.B., Chien S., Barakat A.I., Nerem R.M. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(3): L529–L533, <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.3.L529>.
16. Liu H., Gong X., Jing X., Ding X., Yao Y., Huang Y., Fan Y. Shear stress with appropriate time-step and amplification enhances endothelial cell retention on vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(11): 2965–2978, <https://doi.org/10.1002/term.2196>.
17. Tondreau M.Y., Laterreur V., Gauvin R., Vallières K., Bourget J.M., Lacroix D., Tremblay C., Germain L., Ruel J., Auger F.A. Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater* 2015; 18: 176–185, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.026>.
18. Wang X., Cooper S. Adhesion of endothelial cells and endothelial progenitor cells on peptide-linked polymers in shear flow. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(9–10): 1113–1121, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0653>.
19. dela Paz N.G., Walshe T.E., Leach L.L., Saint-Geniez M., D’Amore P.A. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *J Cell Sci* 2012; 125(4): 831–843, <https://doi.org/10.1242/jcs.084301>.
20. Gogia S., Neelamegham S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology* 2015; 52(5–6): 319–335, <https://doi.org/10.3233/bir-15061>.
21. Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Антонова Л.В., Сардин Е.С., Крутицкий С.С., Барбараш О.Л. Возможность получения и характеристика колониформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. *Цитология* 2018; 60(8): 598–608. Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Antonova L.V., Sardin E.S., Krutitsky S.S., Barbarash O.L. Isolation and characteristics of colony-forming endothelial cells from peripheral blood in patients with ischemic heart disease. *Tsitologiya* 2018; 60(8): 598–608.