

На правах рукописи

Ханова Марьям Юрисовна

**МОДЕЛЬ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО
ПРОТЕЗА СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА:
РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ IN VITRO**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кемерово – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Антонова Лариса Валерьевна

Официальные оппоненты:

Карпенко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом сосудистой и гибридной хирургии института патологии кровообращения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Астрелина Татьяна Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель Центра биомедицинских и аддитивных технологий, заведующая кафедрой регенеративной медицины, гематологии, молекулярной цитогенетики с курсом педиатрии Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «11» июля 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В. И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте www.transpl.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Традиционная сосудистая хирургия основывается на реконструкции окклюзированных сосудов с использованием аутологических трансплантатов, таких как внутренняя грудная артерия, лучевая артерия и подкожная вена [Sanchez P. F. et al., 2018]. Отсутствие донорских сосудов у определенной когорты пациентов делает разработку тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра весьма перспективным направлением [Matsuzaki Y. et al., 2019; Popov G. et al., 2019]. Решением может стать разработка сосудистых протезов из биodeградируемых полимеров с заданной скоростью деградации и, как следствие, возможностью запрограммированного адаптивного роста протеза. Такой полимерный каркас выполняет функцию направляющей матрицы для организации новообразованных тканей пациента с постепенным полным ремоделированием протеза [Song H. G. et al., 2018]. Замещение каркаса новообразованной сосудистой тканью позволяет рассчитывать на то, что оперативное вмешательство будет выполнено единовременно с последующим полным восстановлением структуры собственного нового сосуда [Mallis P. et al., 2020; Radke D. et al., 2018].

Вместе с тем, эффективная эндотелизация является важным аспектом проходимости сосудистых протезов диаметром менее 5 мм в условиях низкой скорости кровотока в протезируемом сосуде [Morgan B. et al., 2016; Niklason L. E. et al., 2020; Yuan H. et al., 2020]. Существуют два подхода к стимулированию эндотелизации: первый основан на биофункционализации поверхности различными молекулами клеточной адгезии и использовании внутренней среды организма в качестве биореактора [Charbonier F. W. et al., 2019]. Такой подход может эффективно ускорить селективное привлечение эндотелиальных клеток. В основу второго подхода легла идея создания сосудистого протеза с готовой к моменту имплантации эндотелиальной выстилкой, сформированной *in vitro*. Разработка клеточнозаселенных сосудистых протезов базируется на трех основных этапах: выбор полимера для изготовления 3D-матрикса, получение культуры эндотелиальных клеток, моделирование механических стимулов. Помимо заселения внутренней поверхности протезов клетками необходимо адаптировать их к потоку, что сможет предотвратить частичное смывание эндотелиальных клеток после имплантации. Как правило, для оптимизации адгезии проводят модифицирование поверхности белками внеклеточного матрикса. Эффективная адгезия также достигается посредством адаптации клеток к внешнему локальному стрессу посредством культивирования клеток в условиях имитации естественного кровотока [Gong X. et al., 2014; Van de Walle A. B. et al., 2020]. Поэтому при моделировании биомеханических стимулов часто используются показатели нижней границы физиологической нормы напряжения сдвига [Xanthis I. et al., 2019; Yuan H. et al., 2020]. Устойчивые механические стимулы адаптируют эндотелиальные клетки к потоку, а в случае использования прогениторных клеток – способствуют дифференцировке к зрелому фенотипу [Gutowski P. et al., 2020].

Степень разработанности темы исследования

Отсутствие эффективных сосудистых протезов малого диаметра для операций по замене или шунтированию окклюзированных сосудов в совокупности с высокой распространенностью сердечно-сосудистых заболеваний привело к развитию тканевой сосудистой инженерии, задачей которой стала разработка сосудистого протеза, эффективного к применению в условиях низкой скорости кровотока и высокого риска развития тромбообразования. Известно, что функционально активная эндотелиальная выстилка обеспечивает тромборезистентные свойства поверхности сосудистого протеза [Antonova L.V., 2019]. Также данная разработка соответствует стратегическим планам Российского научно-технологического комплекса по созданию персонифицированных изделий для нужд медицины с целью снижения потерь от социально значимых заболеваний, в частности, сердечно-сосудистой патологии. Таким образом, сосудистые протезы малого диаметра с воссозданным *in vitro* к моменту имплантации полноценным эндотелиальным монослоем являются многообещающей альтернативой аутологичным сосудам для сердечно-сосудистой хирургии.

На базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» ранее было проведено исследование по подбору метода изготовления биodeградируемого сосудистого протеза, обладающего высокой биосовместимостью. В результате было продемонстрировано, что отдельная подача полимерной смеси и коллагена позволяет создать сосудистый протез с удовлетворительными физико-механическими свойствами, а также сформировать нити таким образом, чтобы коллаген обволакивал волокна, а сайты клеточной адгезии были доступны для эндотелиальных клеток. Разработанные таким образом матрицы продемонстрировали высокий уровень адгезии эндотелиальных клеток пупочной вены человека и сохранность их жизнеспособности [Великанова Е. А. и др., 2017].

Также были разработаны и протестированы сосудистые протезы с пептидами, призванными усиливать адгезию циркулирующих эндотелиальных клеток к внутренней поверхности сосудистых протезов [Ren X. et al., 2015].

Нерешенным вопросом является возможность создания персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза с преколонизацией в условиях пульсирующего биореактора. Для его выполнения необходима аутологичная эндотелиальная клеточная культура, получаемая из доступных источников, и аутологичные белки, способные выступить в качестве фидерного слоя для эндотелиальных клеток.

При этом преколонизация напряжением сдвига новообразованной эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности разрабатываемого сосудистого протеза позволит новообразованному эндотелиальному монослою выдерживать физиологические уровни напряжения сдвига после имплантации клеточнозаселенного сосудистого протеза в сосудистое русло [Dardik A. et al., 1999].

Цель исследования

Разработка и тестирование персонифицированного тканеинженерного сосудистого протеза малого диаметра с воссозданным в условиях пульсирующего потока внутренним эндотелиальным монослоем из колониеформирующих эндотелиальных клеток человека.

Задачи исследования

1. Адаптировать протокол получения и наращивания в условиях *in vitro* аутологичных эндотелиальных клеток, полученных из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, с целью получения большой клеточной массы зрелых эндотелиальных клеток с высокой пролиферативной активностью.

2. Изучить в сравнительном аспекте и в зависимости от условий культивирования морфологическую, фенотипическую и генетическую идентичность колониеформирующих эндотелиальных клеток, полученных из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, с эндотелиальными клетками пупочной вены человека и коммерческой линией эндотелиальных клеток коронарной артерии человека.

3. С целью формирования оптимального фидерного слоя на поверхности биodeградируемого трубчатого каркаса в сравнительном аспекте изучить матриксные свойства фибрина, полученного из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца.

4. Определить оптимальные условия культивирования колониеформирующих эндотелиальных клеток пациентов с ишемической болезнью сердца на внутренней поверхности биodeградируемых трубчатых каркасов в условиях пульсирующего потока и доказать эффективность прекондиционирования данных клеток напряжением сдвига.

5. Разработать протокол изготовления персонифицированного клеточнозаселенного биodeградируемого сосудистого протеза малого диаметра.

Научная новизна исследования

1. Впервые создан адаптированный протокол получения и культивирования аутологичных зрелых эндотелиальных клеток с высоким пролиферативным потенциалом из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, позволяющий получать данные клетки в большом количестве.

2. Впервые посредством полнотранскриптомного секвенирования доказано генетическое соответствие колониеформирующих эндотелиальных клеток, полученных от пациентов с ишемической болезнью сердца, эндотелиальным клеткам пупочной вены человека и коммерческой линии эндотелиальных клеток коронарных артерий человека.

3. Впервые в сравнительном аспекте изучены различия ответной реакции на культивирование в условиях пульсирующего потока эндотелиальных клеток пациентов и коммерческой линии эндотелиальных клеток, что позволит использовать данные знания как при планировании научных экспериментов, так и для прогнозирования поведения клеток в случае имплантации клеточнозаселенных сосудистых протезов в сосудистое русло пациентов.

4. Впервые разработан персонифицированный тканеинженерный сосудистый протез малого диаметра из смеси полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона, модифицированный фибрином и заселенный в условиях прекондиционирования

напряжением сдвига колониеформирующими эндотелиальными клетками пациентов с ишемической болезнью сердца.

Практическая значимость исследования

Создание экспериментальной модели персонифицированного клеточнозаселенного биodeградируемого сосудистого протеза из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона и определение оптимальных условий заселения аутологичными эндотелиальными клетками в условиях пульсирующего потока станет основой для разработки эффективных персонифицированных сосудистых протезов, готовых к имплантации в кровеносное русло.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования явились научные труды отечественных и зарубежных авторов в области тканевой сосудистой инженерии и регенеративной медицины, в частности в области разработок протезов малого диаметра. Для решения поставленных задач проведено достаточное количество экспериментальных исследований с помощью комплекса современных методов исследования физико-химических, микроскопических, культуральных, протеомных и генетических:

1. Метод электроспиннинга.
2. Физико-механические испытания.
3. Методы световой, флуоресцентной, лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии.
4. Культуральные методы исследования.
5. Метод оценки тромборезистентности поверхности.
6. Иммуноблоттинг.
7. Дот-блоттинг.
8. Полнотранскриптомное секвенирование.
9. Исследование пролиферативной активности.
10. Метод проточной цитометрии.
11. Методы статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Колониеформирующие эндотелиальные клетки, полученные из мононуклеарной фракции крови пациентов с ишемической болезнью сердца, характеризуются эндотелиальным фенотипом, высокой пролиферативной активностью, соответствуют морфологии и функциональным особенностям зрелых эндотелиальных клеток. Культура колониеформирующих эндотелиальных клеток обладает минимальными различиями в базовом профиле генной экспрессии в сравнении с эндотелиальными клетками пупочной вены человека и эндотелиальными клетками коронарной артерии человека.

2. Фибрин оптимально подходит для формирования фидерного слоя на поверхности биodeградируемого трубчатого каркаса из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона, обеспечивая высокую адгезию и жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях пульсирующего потока на внутренней поверхности сосудистого протеза.

3. Для эффективного формирования и сохранения эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистых протезов оптимальным является предварительное культивирование колониеформирующих эндотелиальных клеток в течение 2 суток в статических условиях и последующим культивированием в течение 5 суток в условиях пульсирующего потока при следующих параметрах: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

4. Клеточнозаселенный сосудистый протез с фидерным слоем из аутологичного фибрина и эндотелиальным монослоем из аутологичных колониеформирующих эндотелиальных клеток, созданным в условиях пульсирующего потока, демонстрирует высокую биосовместимость и функциональную надежность клеточной составляющей, что доказано посредством иммунофлуоресцентного и полнотранскриптомного анализа.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достаточное количество экспериментальных наблюдений, дизайн исследования, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к научному анализу с применением современных методов статистической обработки и программного компьютерного обеспечения может свидетельствовать о высокой достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Выводы, представленные в настоящей работе, не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

Апробация работы состоялась 21 июня 2023 года на заседании проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» в присутствии сотрудников клинических, экспериментальных отделов и лабораторий института.

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: Всероссийский научно-образовательный форум с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2018); IX Всероссийский съезд трансплантологов (Москва, 2018); Инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации – 2018» (Кемерово, 2018); IX научно-практическая сессия молодых ученых «Наука-практике» (Кемерово, 2019); X межрегиональная научно-практическая сессия молодых ученых «Наука-практике» (Кемерово, 2020); Международная научно-техническая конференция «Перспективные материалы конструкционного и функционального назначения» (Томск, 2020); Международная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов «Проблемы фундаментальной медицины и биологии» (Кемерово, 2020); XXVII ежегодная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы кардиологии» (Тюмень, 2021); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний» (Кемерово, 2021); Всероссийская конференция молодых ученых OpenBio (Новосибирск, 2021); Российский национальный конгресс кардиологов (Санкт-Петербург, 2021); X инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, 2022); V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты работы внедрены в исследовательскую деятельность отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в исследованиях по получению культуры аутологичных эндотелиальных клеток, их фенотипированию, в заселении сосудистых протезов различными типами эндотелиальных клеток и в культивировании клеточнозаселенных протезов в условиях пульсирующего биореактора. Лично провела статистическую обработку данных и анализ полученных результатов, подготовила к публикации ряд статей.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, которые представлены 12 статьями, из них 7 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 2 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в Scopus, 5 – в Scopus и Web of Science); 12 работ являются материалами конференций. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав с описанием оригинальных результатов и заключения с последующими выводами и практическими рекомендациями. Список литературы включает 200 литературных источников, из которых 16 – отечественных и 184 – зарубежных авторов. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 26 рисунками и содержит 9 таблиц, 4 формулы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для получения аутологичной культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) у пациентов с ишемической болезнью сердца, направленных для плановой реваскуляризации миокарда с помощью операции аорто-коронарного шунтирования (АКШ) или на чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ), забирали 20 мл периферической крови. У пациентов, направленных для открытого хирургического вмешательства, кровь забирали перед операцией, сразу и через сутки после операции. В случае проведения ЧКВ забор крови производили до процедуры, непосредственно после введения катетера, сразу после завершения баллонной ангиопластики и стентирования и через сутки после вмешательства. Мононуклеарную фракцию крови (МНФ) выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкцией производителя и культивировали на культуральных флаконах покрытых фибронектином в среде EGM-2 MV (Lonza). Фенотип полученной культуры исследовали с помощью проточной цитометрии, иммунофлуоресцентной микроскопии. Также была исследована ангиогенная и пролиферативная активность. Полнотранскриптомное секвенирование КФЭК в сравнении с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) и эндотелиальными клетками коронарной артерии человека (HCAEC). Протеомное профилирование осуществили с помощью иммуноблоттинга и дот-блоттинга.

Для исследования были изготовлены 2 вида полимерных трубчатых каркасов. Первый – из смеси 5 % поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (ПГБВ, Sigma-Aldrich) и 10 % раствора поли(ε-капролактона) (ПКЛ; Sigma-Aldrich) в соотношении 1:2 в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich) и коллагена I типа (Gibco), с конечной концентрацией коллагена 5 мг/мл (ПГБВ/ПКЛ/коллаген). Трубчатые каркасы ПГБВ/ПКЛ/коллаген диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC, Япония) способом отдельной подачи полимера и коллагена в двух отдельных шприцах. Второй вид каркасов выступал в качестве контроля или каркаса для последующего покрытия фибрином, и был выполнен только из полимерной композиции (ПГБВ/ПКЛ). Поверхностную модификацию сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ выполняли путем погружения, пропитывали полученным раствором фибриногена. Далее на поверхность сосудистых протезов наносили раствор тромбина 500 IU/мл и CaCl₂ 40 ммоль/л для полимеризации фибрина. Преципитат фибриногена концентрацией 30-40 мг/мл получали методом осаждения этанолом при 4°C.

В просвет сосудистых протезов вводили суспензию эндотелиальных клеток в количестве 700 тыс/мл до полного заполнения внутреннего канала протеза. Рабочий режим культивирования включал 2 суток предварительного культивирования в статических условиях, затем 5 суток культивирования в системе пульсирующего биореактора (Harvard Apparatus, США). Параметры рабочего режима пульсирующего биореактора: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см². Группу сравнения составили аналогичные

сосудистые протезы, культивируемые в статических условиях в аналогичный по продолжительности промежутки времени с заменой культуральной среды дважды в сутки.

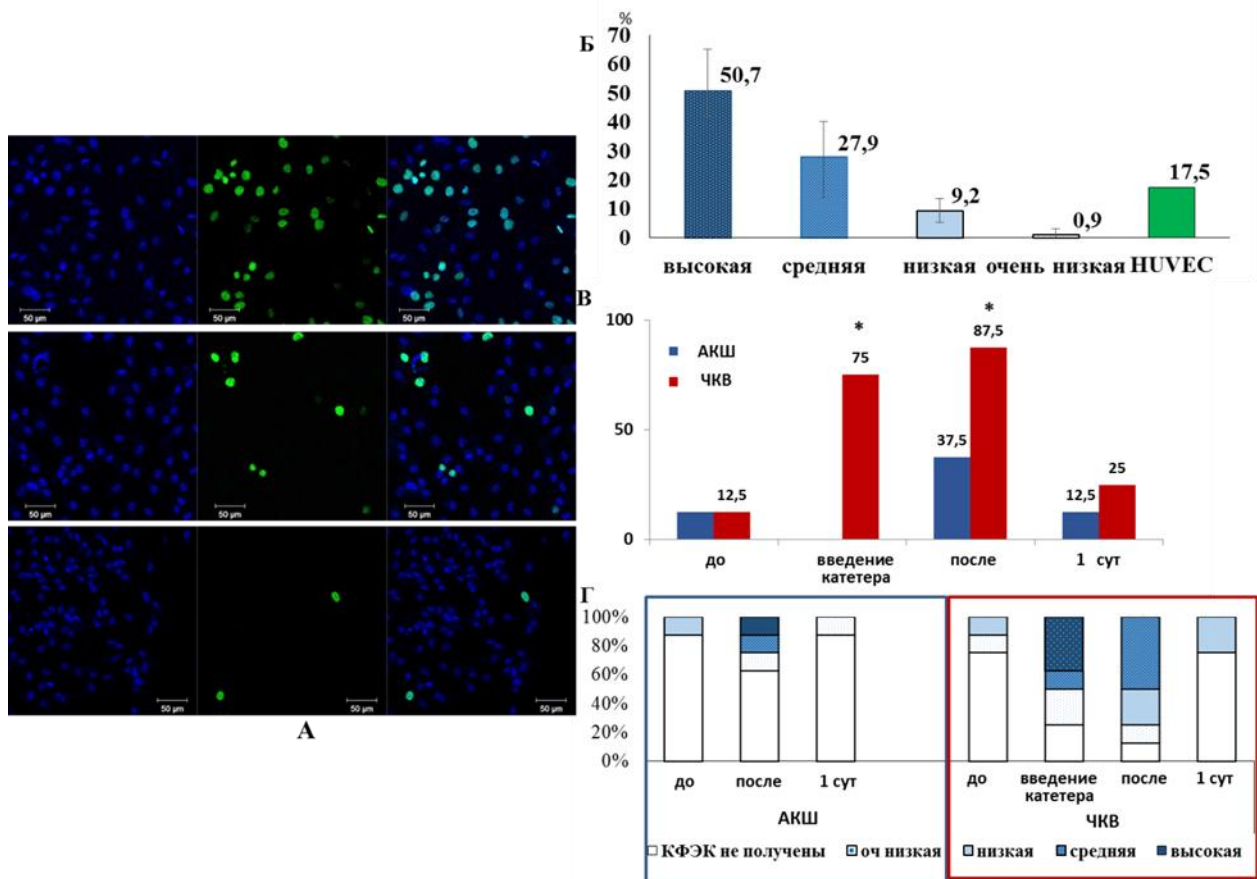
Изучение структуры внутренней поверхности протезов до и после модифицирования выполнено с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония). Механические свойства исследуемых полимерных протезов оценивали в условиях одноосного растяжения образцов, в соответствии с ГОСТ 270-75 на универсальной испытательной машине «Zwick/roell»-2.5N (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Исследование гемосовместимости протезов проводили согласно стандарту ISO 10993.4. Оценку эффективности заселения ЭК выполняли с использованием флуоресцентной и лазерной сканирующей микроскопии. С этой целью предварительно окрашивали клетки на матриксах ядерными красителями этидиумом бромидом (Sigma-Aldrich, США) 0,03 мг/мл и Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США) 2 мкг/мл. Флуоресцентная микроскопия выполнена на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Иммунофлуоресцентное окрашивание полученных образцов проводили к антигенам CD31, CD144, CD 309, vWF, F-actin, Talin, с последующей микроскопией на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Zeiss, Германия). Статистическая обработка полученных данных выполнена в программах «Statistica 6» (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism (GraphPad Software).

Полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq) проводили на платформе HiSeq 2000 (Illumina). Для оценки дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) использовали мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели, используемой в программах EdgeR и DESeq2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика колониеформирующих эндотелиальных клеток

Несмотря на описанную в литературе эндотелиальную дисфункцию у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) выявлена возможность получения аутологичной культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток и наращивая клеточной массы при особенностях забора крови и адаптации протокола культивирования. В случае забора периферической крови у пациентов во время или сразу после процедуры ЧКВ, и последующем культивированием МНФ на фибронектине, сочетающимся с ранним пассажем образующихся колоний, КФЭК удалось получить в 87,5 % случаев, тогда как при стандартной процедуре забора периферической крови частота получения КФЭК не превысила 12,5 %. Наибольшее количество положительных результатов культивирования пришлось на период непосредственного проведения ЧКВ. Забор периферической крови от пациентов во время процедуры аорто-коронарного шунтирования увеличил выделение КФЭК до 37,5 % в сравнении со стандартной процедурой забора крови (рисунок 1).



Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами до вмешательства

Рисунок 1 – Проллиферативная активность: А – фотографии культур с высокой (1), средней (2) и низкой (3) пролиферативной активностью (синее свечение – ядра клеток, зеленое свечение – делящиеся ядра), конфокальная лазерная микроскопия, увеличение $\times 200$; Б – условное разделение всех культур по относительному количеству делящихся ядер на высокую, среднюю, низкую и крайне низкую пролиферативную активность; В – относительное количество положительных результатов культивирования в точках забора крови у пациентов, в зависимости от типа хирургического вмешательства; Г – результаты культивирования и уровень пролиферативной активности культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток в различных точках забора крови

Культивирование МНФ, забранной во время ЧКВ, на поверхности, покрытой фибрином, позволило через 7 суток получить колонии, из которых в последующем выращены клетки с типичной для эндотелиальных клеток морфологией «бульжной мостовой». С помощью проточной цитометрии установлен фенотип полученной культуры клеток: CD146+CD31+CD133–CD309+vWF+CD34+/- . Также культура не экспрессировала антигены гемопоэтических иммунных клеток: CD3, CD14, HLADR, CD45. Результаты сканирующей лазерной микроскопии подтвердили результаты проточной цитометрии. На мембране клеток полученной культуры и культуры HUVEC, взятой в качестве контрольной, выявлены ярко детектируемые межклеточные контакты (CD144) и рецепторы CD31, умеренно детектируемые рецепторы CD309. В цитоплазме HUVEC и культуры CD45– хорошо детектировались тельца Вейбеля-Паладе, а также диффузные и сетчатые скопления vWF (рисунок 2).

Таким образом, клетки, полученные из МНФ периферической крови пациентов с ИБС, являлись КФЭК, поскольку обладали характерной морфологией и фенотипом зрелых ЭК. Забор МНФ во время ЧКВ повысил эффективность получения КФЭК на 75 %.

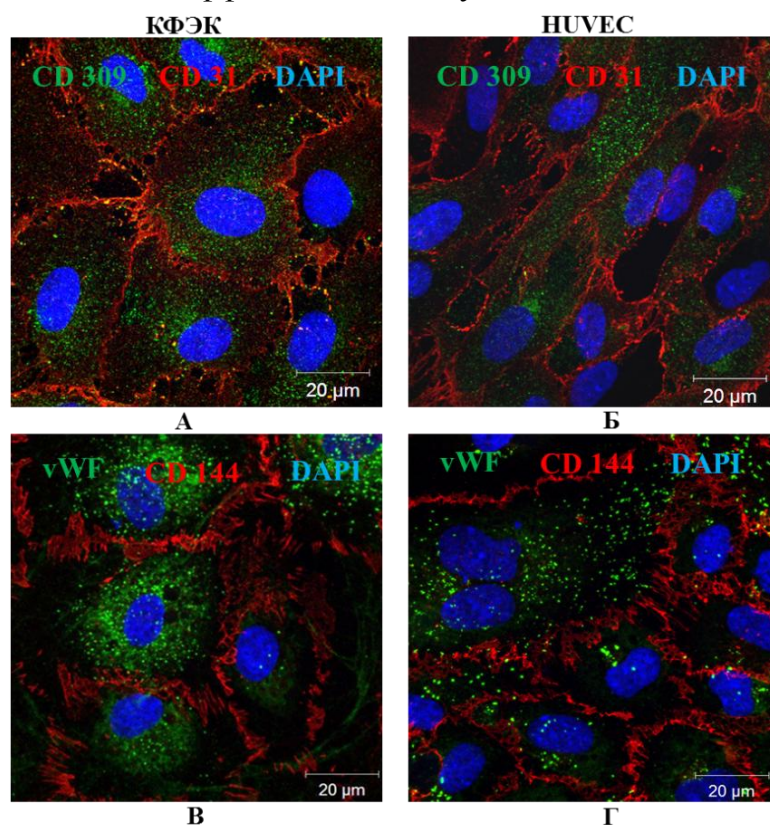


Рисунок 2 – Конфокальная лазерная микроскопия эндотелиальных культур: А, В – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток; Б, Г – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека. А, Б – CD309 (зеленое свечение), CD31 (красное), DAPI (синее); В, Г – vWF (зеленое), CD144 (красное), DAPI (синее), увеличение x 630

При исследовании функциональных характеристик КФЭК в сравнительном аспекте с HUVEC, у КФЭК выявлена способность к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой и связыванию лектина, схожая с таковой у HUVEC. Ангиогенная активность исследована с помощью специфического теста *in vitro* для ЭК на Матригеле, который показал способность обеих культур формировать полноценные капилляроподобные структуры по истечению 16 часов.

Культура КФЭК характеризовалась повышенной продукцией белков ВКМ и базальной мембраны (коллагена I и IV типов), и обладала минимальными различиями уровня генной экспрессии в сравнении с HCAEC и HUVEC. Выборочный анализ панэндотелиальных маркеров методом традиционного иммуноблоттинга подтвердил эндотелиальный фенотип КФЭК, представленный высоким уровнем CD31, VE-кадгерина, CD309, CD34 и нейропилина-1. Профиль экспрессии маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода свидетельствовал о переходном фенотипе КФЭК с точки зрения промежуточного уровня маркера артериальной спецификации HEY2, маркеров лимфатической спецификации LYVE1 и VEGFR3, и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода Snail и Slug по сравнению с HCAEC, которые гиперэкспрессировали HEY2, и HUVEC, которые гиперэкспрессировали маркер венозной спецификации COUP-TFII, соответственно. Таким образом, КФЭК можно отнести к истинным зрелым эндотелиальным клеткам и, как следствие, использовать для заселения внутренней поверхности сосудистых протезов из биodeградируемых полимеров с целью формирования аутологичного эндотелиального монослоя.

В соответствии с концепцией персонализированной медицины для улучшения адгезивных свойств протеза в сравнительном аспекте исследован один из самых доступных белков ВКМ – фибрин, также получаемый из периферической крови пациентов с ИБС, с другим широко используемым в тканевой сосудистой инженерии белком – коллагеном.

Фибриновое покрытие характеризовалось мелкопористой нанометрической структурой. Диаметр волокон составил 0,13 (0,09; 0,15) мкм, что в 18 раз тоньше волокон ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$) (рисунок 3). При этом размер пор на поверхности фибрина составил 0,27 (0,18; 0,33) мкм, что в 29,6 раза меньше пор на поверхности сосудистого протеза ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$).

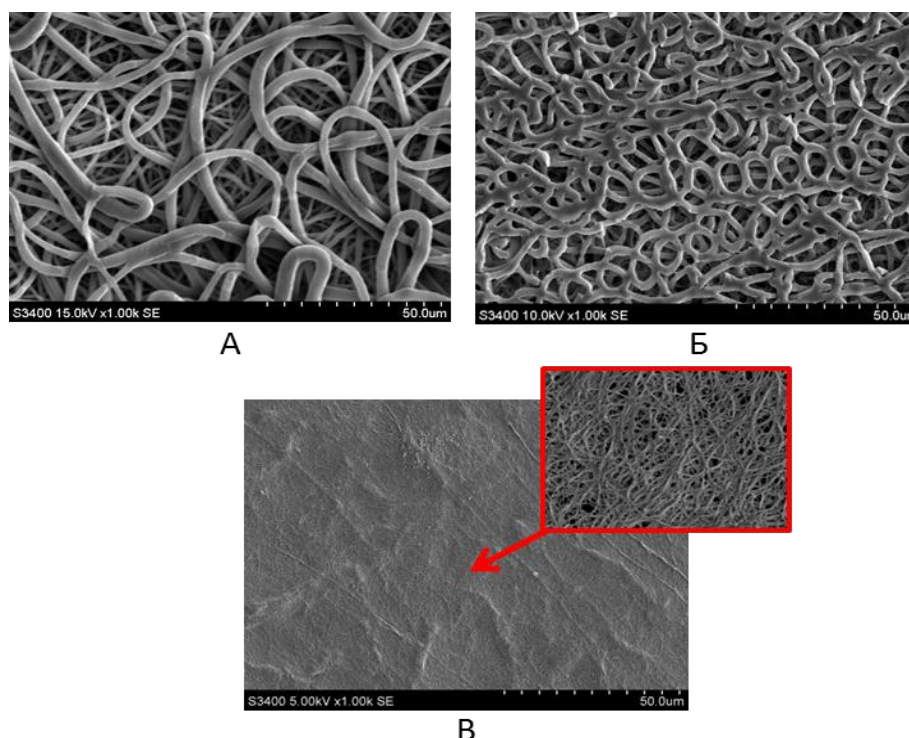


Рисунок 3 – Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов: А – полимерные протезы; Б – протезы с коллагеном; В – протезы с фибрином. Увеличение $\times 1000$

Сравнительный анализ физико-механических свойств сосудистых протезов с фибрином

Механические свойства исследуемых сосудистых протезов были изучены в сравнении с *Arteria mammaria* человека. Все виды сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ (без модифицирования и с модифицированием фибрином и коллагеном) от нативного сосуда отличала высокая жесткость (таблица 1).

Таблица 1 – Физико-механические свойства различных сосудистых протезов и *arteria mammaria*

Вид образца	Предел прочности, Мпа Me [25 %; 75 %]	Относительное удлинение, % Me [25 %; 75 %]	Модуль Юнга, Мпа Me [25 %; 75 %]
<i>Arteria mammaria</i> (n=5)	2,8 (1,7; 3,2)	59,8 (51,9; 73,7)	2,4 (2,2; 2,7)
ПГБВ/ПКЛ/коллаген (n=8)	3,4 (3,1; 4,2)	197,7 (154,5; 209,6) [*]	43,6 (32,5; 50,6) [*]
ПГБВ/ПКЛ (n=6)	3,9 (3,7; 4,3)	107,9 (100,4-115,1) ^{*/**}	21,8 (18; 25,1) [*]
ПГБВ/ПКЛ/фибрин (n=6)	2,3 (1,9; 2,4)	111 (102,3-122,4) ^{*/**}	22,4 (19,8; 26,1) [*]

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно *a.mammaria*, ** – $p < 0,05$ относительно ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ПГБВ – полигидроксibuтират/валерат, ПКЛ – поликапролактон

Максимальной жесткостью обладали сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/коллаген, у которых модуль Юнга был в 18,2 раза выше, чем у *a. mammaria*, ($p < 0,05$). Покрытие поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ фибрином не приводило к увеличению жесткости и оставалось на уровне немодифицированных протезов, у которых жесткость была в 9 раз выше, чем у *a. mammaria*, ($p < 0,05$). При этом прочность всех разновидностей сосудистых протезов достоверно не отличалась от таковой у *a. mammaria*, ($p > 0,05$). Относительное удлинение ПГБВ/ПКЛ и ПГБВ/ПКЛ/фибрин не отличалось между собой и в 1,8 раз превысило аналогичный показатель *a. mammaria*, ($p < 0,05$). Относительное удлинение протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген оказалось самым высоким, превысив в 3,3 раза аналогичный показатель *a. mammaria* и в 1,8 раза – значения относительного удлинения сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин и ПГБВ/ПКЛ, ($p < 0,05$). Таким образом, сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/фибрин обладали физико-механическими характеристиками, более приближенными к свойствам нативных сосудов.

Сравнительная характеристика тромборезистентности сосудистых протезов с фибрином

Максимум агрегации тромбоцитов в спонтанном режиме и с индуктором агрегации аденозин 5`-дифосфатом (АДФ) после контакта тромбоцитов с поверхностью протезов с коллагеном был, соответственно, в 1,7 и 1,2 раза выше аналогичных показателей интактной обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП), ($p < 0,05$). Модифицирование поверхности протезов фибрином способствовало снижению максимума агрегации тромбоцитов в спонтанном режиме, поэтому данный показатель отличался от значений интактной ОТП в 1,5 раза, ($p < 0,05$). При этом максимум агрегации тромбоцитов с индуктором агрегации АДФ перестал достоверно отличаться от аналогичного показателя интактной ОТП (таблица 2).

Таким образом, модифицирование фибрином является более выигрышным в плане сохранения тромборезистентных свойств поверхности протезов.

Таблица 2 – Максимум агрегации тромбоцитов после контакта с биодеградируемыми сосудистыми протезами в сравнении с интактной обогащенной тромбоцитами плазмой

Вид образца	Максимум агрегации тромбоцитов, %	
	В спонтанном режиме (M ± σ)	С индуктором агрегации (АДФ) (M ± σ)
Интактная ОТП	6,5 ± 0,4	78,32 ± 0,9
ПГБВ/ПКЛ	7,3 ± 0,2	86,0 ± 0,6
ПГБВ/ПКЛ/фибрин	9,5 ± 0,7 *	84,0 ± 1,5
ПГБВ/ПКЛ/коллаген	10,8 ± 0,5 *	93,0 ± 0,8 *

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно интактной ОТП, ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма, АДФ – аденозин 5'-дифосфат, ПГБВ – полигидроксibuтират/валерат, ПКЛ – поликапролактон

Аналогичная ситуация наблюдалась с показателями степени деформации тромбоцитов после контакта с поверхностью сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ до и после модифицирования фибрином и коллагеном. По причине крупных пор тромбоциты выявлялись на полимерных нитях протезов ПГБВ/ПКЛ. При этом встречались тромбоциты всех степеней деформации с преобладанием III степени (таблица 3). Индекс деформации составил 3,04.

Таблица 3 – Процентное соотношение степеней деформации тромбоцитов и индекс деформации

Вид сосудистого протеза	Соотношение степеней тромбоцитов, %					Индекс деформации	Количество тромбоцитов в 1 мм ² Me [25 %; 75 %]
	I	II	III	IV	V		
ПГБВ/ПКЛ	1,3	20,8	45,5	29,9	2,6	3,04 [2,8-3,3] *	4238 [1541-5394] *
ПГБВ/ПКЛ/ фибрин	0	42,2	24,1	20,7	12,9	2,53 [2,1-3,1] *	2119 [963-12619] *
ПГБВ/ПКЛ/ коллаген	0	8,3	32,1	40,4	19,2	3,7 [3,5-3,9]	15490 [11281-20356]

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ПКЛ – поликапролактон, ПГБВ – полигидроксibuтират/валерат

На поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин тромбоциты выявлены в каждом поле зрения, что обусловлено более плотным расположением фибриновых нитей. Преобладали тромбоциты II степени деформации, а индекс деформации был самым низким среди всех групп сравнения и составил 2,53. По индексу деформации и количеству адгезированных тромбоцитов на 1 мм² достоверных различий между протезами ПГБВ/ПКЛ и ПГБВ/ПКЛ/фибрин, не выявлено, ($p > 0,05$). Наиболее высокий индекс деформации тромбоцитов в совокупности с наибольшим количеством адгезированных тромбоцитов выявлен на поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$). Преобладали тромбоциты с IV степенью деформации, а значения индекса деформации достигали уровня 3,7. Таким образом, модифицирование фибрином полимерной поверхности ПГБВ/ПКЛ достоверно улучшило тромборезистентные свойства сосудистых протезов в сравнении с использованием коллагена. По совокупности полученных результатов можно заключить, что протезы ПГБВ/ПКЛ/фибрин не уступают таковым с коллагеном по физико-механическим свойствам, обладают лучшей тромборезистентностью, и, следовательно, могут быть использованы в качестве основы для создания клеточнозаселенного сосудистого протеза.

Выбор оптимального режима пульсирующего потока в биореакторе для формирования и сохранения слоя эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов

Изучена скорость заселения зрелыми ЭК внутренней поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген с целью определения общего оптимального срока культивирования, который должен включать этап предсиддинга в статических условиях и продолжение культивирования в условиях пульсирующего потока. Доказано, что уже спустя 7 суток культивирования ЭК в статических условиях на внутренней поверхности протезов формировался практически непрерывный клеточный слой. При культивировании клеток на поверхности протезов более 7 суток (14 и 21 сутки) наблюдали гибель части клеток с нарушением клеточного монослоя. Вероятно, это связано с тем, что зрелые ЭК обладают умеренной пролиферативной активностью. Таким образом, общая продолжительность культивирования ЭК на поверхности протезов не должна превышать 7 суток.

Для определения оптимальной интенсивности напряжения сдвига оценена эффективность заселения внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген с использованием культуры НСАЕС в условиях проточного пульсирующего биореактора при использовании параметров, находящихся на нижней границе физиологической нормы:

Режим 1: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

Режим 2: объем выброса – 1,0 мл; частота выброса – 30 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 5,74 дин/см².

Выявлено, что при Режиме 2 адгезивных свойств протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген оказалось недостаточно для полноценного удержания на внутренней поверхности ЭК.

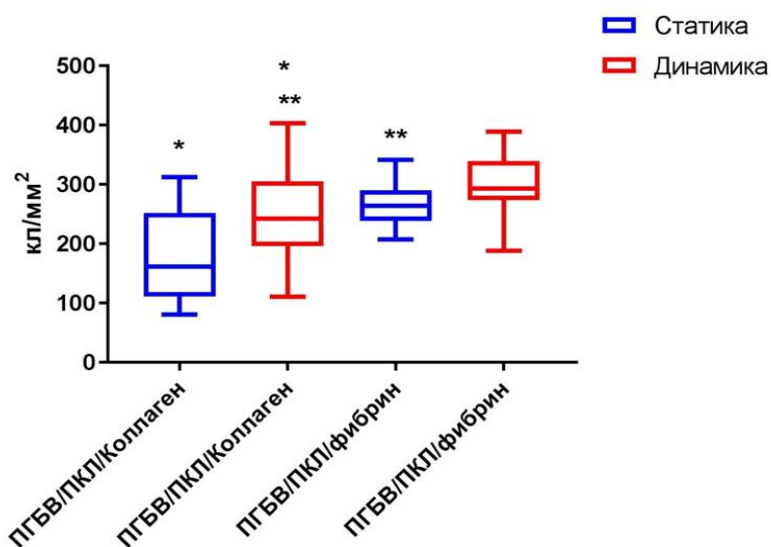
При одинаковой продолжительности культивирования ЭК (7 суток) в статических условиях и в условиях пульсирующего потока при Режиме 1, включающего 2-суточный этап предсиддинга, синтез Talin, CD31, CD144 происходил интенсивнее. Также в условиях потока значительно повышался синтез vWF, коллагена IV типа и F-актина, обеспечивающего элонгацию клеток.

Таким образом, был определен оптимальный рабочий режим заселения ЭК внутренней поверхности сосудистых протезов: продолжительность предварительного заселения и культивирования в статических условиях – 2 суток, продолжительность последующего культивирования в условиях проточного биореактора – 5 суток при следующих параметрах пульсирующего потока: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

В сравнительном аспекте (в Режиме 1 пульсирующего потока и в статических условиях) была изучена эффективность воссоздания эндотелиального монослоя из КФЭК на внутренней поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген и ПГБВ/ПКЛ/фибрин.

На поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген выявлено увеличение клеточной плотности с 110,9 (161,4; 252,1) кл/мм² в статических условиях до 242,3 (196,6; 305,4) кл/мм² – в условиях потока, $p < 0,05$ (рисунок 4). Более позитивная тенденция наблюдалась при культивировании клеточнозаселенных протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин, где количество адгезированных клеток в статических условиях составило 264,2 (239,1; 290,1) кл/мм², увеличившееся под влиянием пульсирующего потока до 293 (273,6; 339,6) кл/мм², ($p > 0,05$). Таким образом, под влиянием пульсирующего потока клеточная плотность увеличивалась,

однако на поверхности протезов с фибрином клеточная плотность была в 1,2 раза выше в сравнении с протезами с коллагеном.



Примечание: * – относительно сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин, культивированных в условиях пульсирующего потока, $p < 0,05$; ** – относительно сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген, культивированных в статических условиях, $p < 0,05$

Рисунок 4 – Количественный анализ клеточной плотности культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов, кп/мм²

Под влиянием потока на поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген наблюдали достоверное увеличение жизнеспособности с 69,2 % до 83,8 %, ($p < 0,05$). Процент жизнеспособных КФЭК, культивированных на внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин как в статике, так и в динамике, близился к 100 % (рисунок 5).

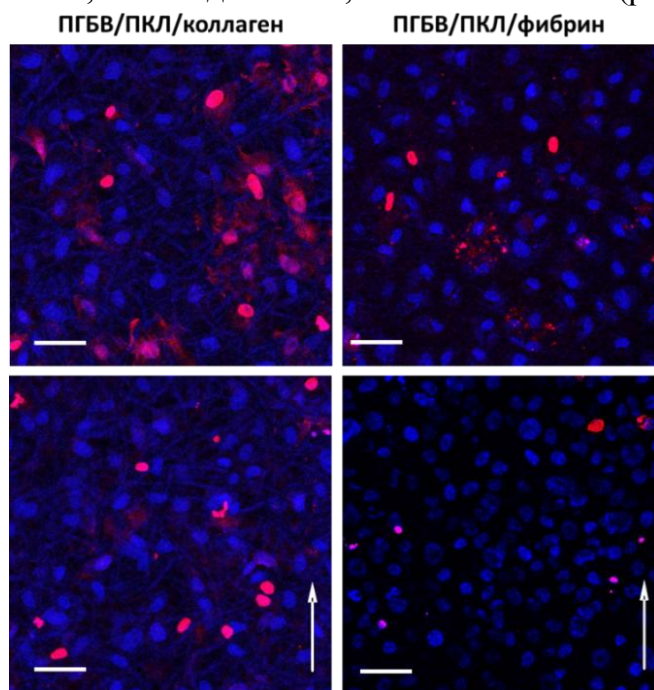


Рисунок 5 – Жизнеспособность культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов с коллагеном и фибрином. Сочетанная окраска флуоресцентными красителями DAPI (синее свечение) и этидиумом бромидом (красное свечение). Конфокальная лазерная микроскопия, увеличение $\times 630$. Стрелкой обозначены образцы, культивированные в пульсирующем потоке

Таким образом, пульсирующий поток оказал позитивное влияние на увеличение клеточной плотности на внутренней поверхности сосудистых протезов, а использование фибрина в качестве фидерного слоя позволило значительно увеличить интенсивность заселения клетками поверхности протезов с сохранением эндотелиального монослоя к окончанию 7-дневного срока культивирования в условиях пульсирующего потока и повышением клеточной жизнеспособности до 100 %.

Сравнительные результаты специфического иммунофлуоресцентного анализа поверхности клеточнозаселенных сосудистых протезов

На основе результатов окраски специфическими антителами проводили анализ влияния пульсирующего потока интенсивностью 2,85 дин/см² на фенотип КФЭК, межклеточные контакты, функциональную активность, организацию цитоскелета, адгезию клеток к поверхности.

Уровень экспрессии специфических эндотелиальных маркеров: CD309, CD144, CD31 и vWF был выше на протезах с фибриновым покрытием, что может быть косвенным свидетельством более качественной адгезии клеток, ($p < 0,05$), (рисунок 6).

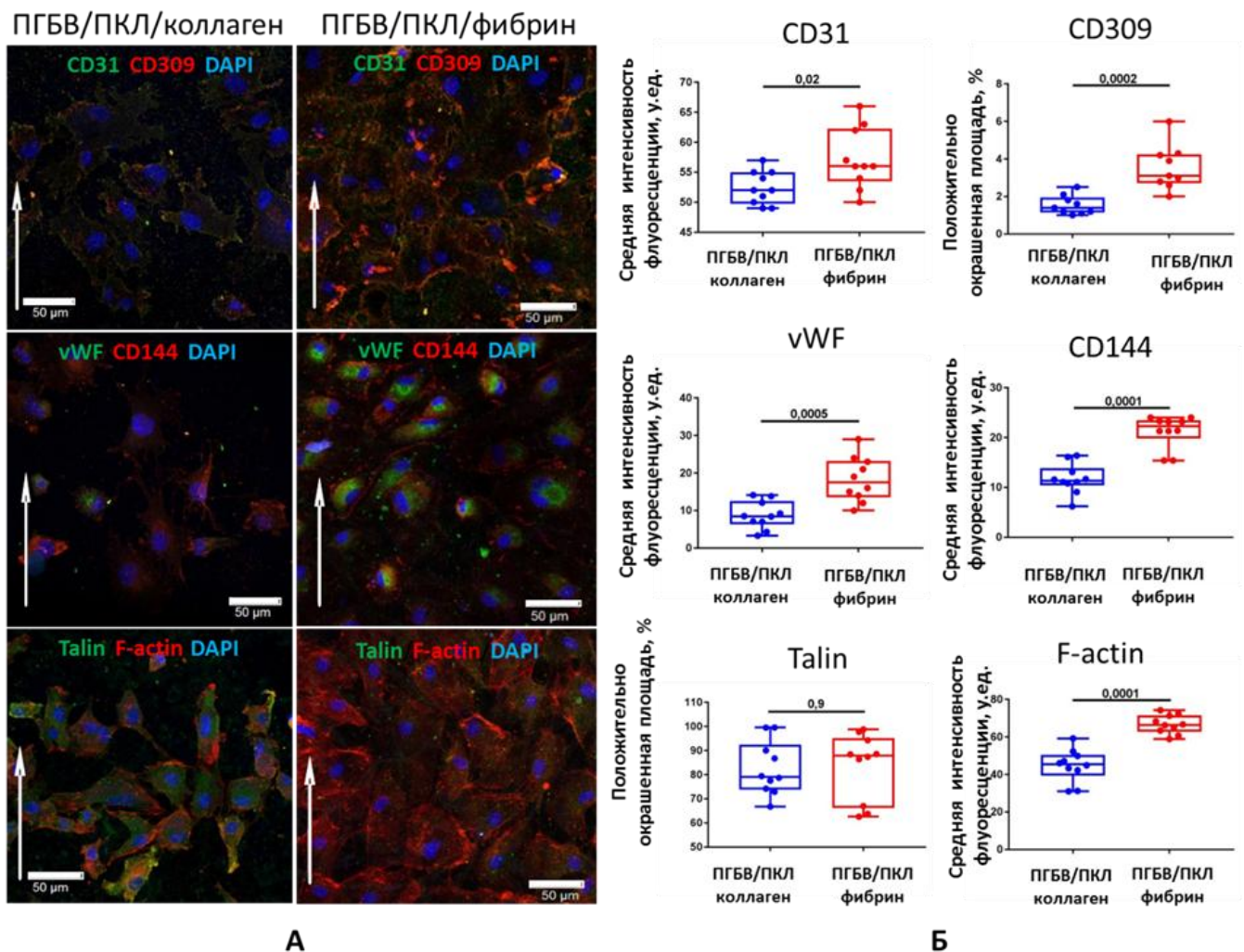


Рисунок 6 – Сочетанное иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности сосудистых протезов, заселенных культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока: CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. А – репрезентативные фотографии, сканирующая конфокальная микроскопия, увеличение $\times 200$. Б – количественный анализ изображений

Средняя интенсивность флуоресценции CD31 была выше на фибрине, чем на коллагене, и составила 56 (53,5; 62,3) у. ед. и 52 (49,8; 55,0) у. ед. соответственно, ($p > 0,05$). Процент положительно окрашенной площади CD309 при культивировании на протезах с фибриновым покрытием был статистически значимо выше в сравнении с коллагеном и равен 3,1 (2,7; 4,3) % и 1,4 (1,2; 2,0) %, соответственно. Что касается синтетической активности ЭК в отношении vWF, то на фибрине она превысила в 2 раза данный показатель на коллагене и составила 17,7 у. ед. (13,5; 23,3) против 8,5 (6,3; 12,5) у. ед., соответственно, ($p < 0,05$). Было выявлено увеличение в 2 раза средней интенсивности флуоресценции CD144 при культивировании на протезах с фибрином, в сравнении с протезами с коллагеном, что вероятно способствовало целостности эндотелиальной выстилки, ($p < 0,05$). Так на протезах ПГБВ/ПКЛ/коллаген этот показатель был равен 11,4 (10,4; 13,9) у. ед., в то время как на протезах ПГБВ/ПКЛ/фибрин – 22,3 (19,8; 23,5) у. ед. Средняя интенсивность флуоресценции F-actin была в 1,5 выше при культивировании КФЭК на протезах с фибрином и составила 66,5 (62,2; 71,6) у. ед., в то время как на протезах с коллагеном – 45,5 (39,5; 92,5) у. ед., ($p < 0,05$). Помимо более активного синтеза F-actin, мы наблюдали выраженную адаптацию ЭК клеток, что выразалось в переориентации волокон F-actin в направлении потока. Не выявлено статистически значимых отличий процента положительно окрашенной площади белка Talin, в зависимости от типа сосудистого протеза ($p > 0,05$).

Таким образом, совокупность клеточных маркеров демонстрирует отличную адаптацию клеток к условиям пульсирующего потока в случае использования фибрина в качестве белкового покрытия сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ.

Подтверждением этому явилось обнаружение различий в транскриптомах КФЭК, культивируемых на внутренней поверхности ПГБВ/ПКЛ/фибрин в статических условиях и в условиях пульсирующего потока. Всего у культуры КФЭК было идентифицировано 185 значимых ДЭГов, в соответствии с предложенными базой Gene Ontology терминами, раскрывающими молекулярные характеристики генов. ДЭГ были разделены на 125 категорий, которые можно условно разделить на 2 обширные группы: эндотелиальный метаболизм (62) и процессы, участвующие в биологии эндотелия (63).

Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов, показал, что воздействие пульсирующего потока активирует метаболизм в КФЭК. В категории «эндотелиальный метаболизм» выявлено 39 ДЭГ в динамике против 23 ДЭГ в статике. Дальнейшее обогащение систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов при помощи укрупнения категорий Gene Ontology (при помощи мануального аннотирования) показало, что в ответ на пульсирующий поток наблюдается повышенная экспрессия генов, кодирующих: 1) белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (3 ДЭГ в условиях пульсирующего потока (в динамике) против 2 ДЭГ в статических условиях (в статике)); 2) белки, ответственные за регуляцию целостности эндотелия (9 ДЭГ в динамике против 6 ДЭГ в статике); 3) стимулирующие ангиогенез белки (48 ДЭГ в динамике против 33 ДЭГ в статике); 4) белки, определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток (17 ДЭГ в динамике против 12 ДЭГ в статике); 5) белки, способствующие миграции эндотелиальных клеток (21 ДЭГ в динамике против 15 ДЭГ в статике); 6) белки, ответственные за регуляцию воспаления (20 ДЭГ в динамике против 16 ДЭГ в статике).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на теорию сосудистого происхождения КФЭК, доказано, что количество предшественников КФЭК в моноклеарной фракции периферической крови и, тем более, в крови находится за пределами возможностей их детекции с помощью проточной цитометрии, что подтверждают мировые исследования. Поэтому была изучена не только возможность обогащения моноклеарной фракции периферической крови предшественниками эндотелиальных клеток негемопозитического происхождения посредством изменения подходов к забору периферической крови пациентов, но и возможность стимулирования колонизации, дифференцировки и высокой пролиферации КФЭК в ответ на изменение условий культивирования МНФ периферической крови. Было доказано, что в случае забора периферической крови у пациентов во время или сразу после ЧКВ, способствующего увеличению слушивания сосудистых клеток с внутренней поверхности сосудов и выхода их в кровоток, получение КФЭК при последующем культивировании МНФ периферической крови, забранной во время ЧКВ, удалось получить в 87,5 % случаев, тогда как частота получения КФЭК из МНФ при стандартной процедуре забора периферической крови не превысила 12,5 %. Высев МНФ крови сразу на фибронектин, минуя посев на коллаген, культивирование и ранний пассаж формирующихся колоний привели к ранней селекции пролиферирующих колоний эндотелиальных прогениторных клеток.

Доказано, что максимальной эффективностью в качестве фидерного слоя, покрывающего поверхность биodeградируемого сосудистого протеза, обладал фибрин, который также возможно получить из периферической крови пациентов, что обеспечивает снижение иммуногенности фидерного покрытия в связи с отсутствием в нем чужеродного белка.

Свойства фибрина, использованного в качестве фидерного слоя, способны влиять на физико-механические свойства и тромборезистентность, создаваемой конструкции. Доказано, что создание фибринового покрытия на поверхности сосудистых протезов не ухудшило физико-механических свойств и позволило в 2 раза сократить жесткость протезов, ($p < 0,05$). При этом создание фибринового покрытия на полимерной поверхности ПГБВ/ПКЛ способствовало уменьшению на 12 % максимума агрегации тромбоцитов и снижению в 1,5 раза индекса деформации тромбоцитов в сравнении с немодифицированными протезами ПГБВ/ПКЛ, ($p < 0,05$).

Оптимальный режим культивирования клеток на внутренней поверхности протеза ПГБВ/ПКЛ с фибриновым покрытием сочетал в себе следующие параметры пульсирующего потока: объем выброс – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см²; общая продолжительность культивирования клеток – 7 суток: председдинг клеток в статических условиях – 2 суток, культивирование в системе пульсирующего биореактора – 5 суток. Формирование эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин в условиях напряжения сдвига привело к повышению не только адгезии КФЭК, но и средней интенсивности флуоресценции колониеформирующими эндотелиальными клетками CD31, CD144, CD309 и F-актина на 7,7 %, в 2, 2,2, и 1,5 раза, соответственно, относительно аналогичных

показателей КФЭК, культивируемых в условиях потока на поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген. Дополнительно в КФЭК, культивируемых в условиях пульсирующего потока на внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин, наблюдали увеличение экспрессии генов, кодирующих белки с проангиогенными свойствами. В ответ на пульсирующий поток в колониеформирующих эндотелиальных клетках выявлена повышенная экспрессия генов, кодирующих белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов, регуляцию целостности эндотелия, стимуляцию ангиогенеза, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, регуляцию воспаления.

По совокупности полученных результатов сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/фибрин обладали оптимальными структурными, физико-механическими, тромборезистентными, адгезионными и фидерными свойствами. Выбранный режим прекондиционирования напряжением сдвига оказал на КФЭК адаптивное влияние, которое отразилось на фенотипе, синтетической активности, цитоскелетных перестройках и экспрессии генов, кодирующих белки с проангиогенными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Забор периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца во время и сразу после процедуры чрескожного коронарного вмешательства и последующий посев полученной мононуклеарной фракции крови на фибронектин с введением этапа раннего пассирования первых колоний через 7 суток позволили повысить продуктивность получения колониеформирующих эндотелиальных клеток на 75 %.

2. Колониеформирующие эндотелиальные клетки имели фенотип зрелых эндотелиальных клеток негемопоэтического происхождения: CD45–CD146+CD31+CD144+CD309+vWF+CD133–CD34+/-; типичную для эндотелиальных клеток морфологию и ангиогенную активность, а также минимальные различия в базовом профиле генной экспрессии в сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека и эндотелиальными клетками пупочной вены человека.

3. Покрытие поверхности сосудистых протезов аутологичным белком фибрином, полученным из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, позволило в 2 раза сократить жесткость протезов и улучшить тромборезистентность поверхности протезов за счет снижения на 12 % максимума агрегации тромбоцитов и в 1,5 раза – индекса деформации тромбоцитов относительно аналогичных показателей сосудистых протезов с коллагеном.

4. Оптимальными условиями формирования и сохранения монослоя колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов из смеси полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона с фибрином или коллагеном являются: предварительное культивирование колониеформирующих эндотелиальных клеток в течение 2 суток в статических условиях с последующим культивированием в течение 5 суток в условиях пульсирующего потока при следующих параметрах: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

5. Сеть разветвленных нановолокон и высокая биосовместимость фибринового покрытия привели к улучшению удержания эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистого протеза с фибрином в статических условиях культивирования колониеформирующих эндотелиальных клеток – в 2,4 раза, в условиях пульсирующего потока – на 21 % в сравнении с протезами с коллагеном. На фоне сохранения клеточной жизнеспособности в 100 % случаев средняя интенсивность флуоресценции колониеформирующими эндотелиальными клетками CD31, CD144, CD309 и F-актина превысила аналогичную у клеток, культивируемых в условиях пульсирующего потока на поверхности сосудистых протезов с коллагеном, на 7,7 %, в 2, 2,2, и 1,5 раза, соответственно, сопровождавшееся увеличением экспрессии генов, кодирующих белки с проангиогенными свойствами.

6. Разработанный протокол изготовления клеточнозаселенного сосудистого протеза с фидерным слоем из аутологичного фибрина и эндотелиальным монослоем из аутологичных колониеформирующих эндотелиальных клеток, воссозданным в условиях пульсирующего потока, является пригодным для создания персонализированного тканеинженерного сосудистого протеза малого диаметра.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью получения моноклеарной фракции периферической крови, обогащенной предшественниками эндотелиальных клеток негемопозитического происхождения, забор периферической крови у пациентов с ишемической болезнью сердца необходимо осуществлять во время и сразу после процедуры чрескожного коронарного вмешательства.

2. Посев полученной моноклеарной фракции крови необходимо проводить на поверхности, покрытые фибронектином. Спустя 7 суток культивирования клеток – выполнять пассирование первых колоний.

3. Для создания персонифицированного сосудистого протеза с эндотелиальным слоем их аутологичных эндотелиальных клеток поверхность протеза необходимо покрывать фибрином, полученным их периферической крови пациентов, а культивирование эндотелиальных клеток осуществлять в условиях пульсирующего потока со следующими параметрами: выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood / V. Matveeva, M. Khanova, E. Sardin, L. Antonova, O. Barbarash // International Journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19. – № 11. – P. 3453.

2) **Возможность получения и характеристика колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца / В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова, Л. В. Антонова, Е. С. Сардин, С. С. Крутицкий, О. Л. Барбараш // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 8. – С. 598–608.**

3) Development of a polymeric scaffold for vascular tissue engineering / E. A. Velikanova, V. G. Matveeva, E. O. Krivkina, V. V. Sevostianova, M. Yu. Khanova, T. V. Glushkova, Yu. A. Kudryavtseva, L. V. Antonova // AIP Conference Proceedings. – 2019. – Vol. 2167. – № 1. – P. 020381.

4) **Эффективность использования эндотелиальных колониеформирующих клеток для создания тканеинженерного сосудистого протеза в условиях in vitro / Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, Е. О. Кривкина, В. В. Севостьянова, М. Ю. Ханова, Ю. А. Кудрявцева, Л. В. Антонова // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 44–51.**

5) Модификация поверхности полимерных сосудистых графтов фибрином не уменьшает их тромборезистентность Т. В. Глушкова, Т. Н. Акентьева, В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Е. О. Кривкина, Ю. А. Кудрявцева, Л. В. Антонова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2020. – Т. 5. – № 2. – С. 22–29.

6) **Фибрин – перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии / В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова, Л. С. Барбараш // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. XXII. – № 1. – С. 196–208.**

7) **Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза малого диаметра в условиях потока / М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, Е. О. Кривкина, Т. В. Глушкова, В. В. Севостьянова, А. Г. Кутихин, Л. В. Антонова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Том XXIII. – № 3. – С. 101–114.**

8) **Создание персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза in vitro / Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний / М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова, Т. В. Глушкова, В. Г. Матвеева // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – Т. 10. – №2S. – С. 89–93.**

9) Основные аспекты создания in vitro клеточнозаселенных сосудистых протезов / М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. – Т. 7. – № 4. – С. 100-109.

10) **Оценка возможности использования колониеформирующих эндотелиальных клеток для разработки тканеинженерных сосудистых графтов на основании анализа профиля генной экспрессии / Е. А. Великанова, М. Ю. Сеницкий, А. В. Сеницкая, В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова // Современные технологии в медицине. – 2022. – Т. 14. – № 3. – С. 15–21.**

11) **Влияние напряжения сдвига на свойства колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий / Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2022. – Т. 11. – № 4. – С. 90–97.**

12) Колониеформирующие эндотелиальные клетки – кандидатная культура для тканевой сосудистой инженерии: паспорт генного и протеомного профиля / Ханова М. Ю., Кутихин А. Г., Матвеева В. Г., Великанова Е. А., Кривкина Е. О., Антонова Л. В. // *Фундаментальная и клиническая медицина.* – 2023. – Т. 8. – № 4. – С. 37–53.

ПАТЕНТЫ

1. Пат. RU № 2758260 Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина / Антонова Л. В., Глушкова Т. В., Матвеева В. Г., Ханова М. Ю., Барбараш О. Л., Барбараш Л. С.; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) (RU). – № 2020143003, дата регистрации: 27.10.21; опубл. 24.12.2020.

2. Пат. RU 2764051 Способ изготовления *in vitro* персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза / Антонова Л. В., Матвеева В. Г., Ханова М. Ю., Барбараш О. Л., Барбараш Л. С., Севостьянова В. В., Великанова Е. А.; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) (RU). – № 2021112402, дата регистрации: 13.01.2022; опубл. 28.04.2021.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКШ – аорто-коронарное шунтирование

ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КФЭК – колониеформирующих эндотелиальных клеток человека / endothelial colony-forming cells

МНФ – моноклеарная фракция

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма

ПГБВ – полигидроксibuтират/валерат

ПКЛ – поликапролактон

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство

ЭК – эндотелиальные клетки

CD – cluster of differentiation / кластер дифференцировки

НСАЕС – human coronary artery endothelial cells/ эндотелиальные клетки коронарной артерии человека

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells/ эндотелиальные клетки пупочной вены человека