

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний»**

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

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Антонова Лариса Валерьевна

Кемерово – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. НЕОБХОДИМОСТЬ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО ПРОТЕЗА СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1 Основные недостатки существующих протезов сосудов малого диаметра.....	16
1.2 Представление о тканеинженерном сосудистом протезе	17
1.2.1 Полимерные матрицы для клеточного заселения.....	18
1.2.2 Биофункционализация поверхности сосудистых протезов с целью эндотелизации	22
1.3 Методы и подходы эндотелизации тканеинженерных сосудистых протезов в условиях <i>in vitro</i> . Клеточные культуры	27
1.4 Биомеханические стимулы, естественная адаптация жизнедеятельности эндотелиальных клеток.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Получение культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека	40
2.2 Получение культуры эндотелиальных клеток коронарной артерии человека .	40
2.3 Получение колониеформирующих эндотелиальных клеток	41
2.4 Иммунофенотипирование эндотелиальных клеток.....	43
2.4.1 Проточная цитометрия	43
2.4.2 Лазерная сканирующая микроскопия	44
2.4.3 Изучение способности эндотелиальных клеток к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связыванию лектина.....	45
2.4.4 Исследование ангиогенной активности эндотелиальных клеток <i>in vitro</i>	45
2.4.5 Изучение пролиферативной активности эндотелиальных клеток.....	46
2.5 Изготовление сосудистых протезов малого диаметра	46
2.5.1 Изготовление трубчатых каркасов протезов малого диаметра методом электроспиннинга.....	46

2.5.2	Методика получения фибрина и модифицирование фибрином трубчатых полимерных каркасов протезов	47
2.5.3	Исследование метаболической активности колониеформирующих эндотелиальных клеток на различных белковых матрицах	48
2.5.4	Физико-механические испытания	49
2.5.5	Изучение структуры поверхности сосудистых протезов с помощью сканирующей электронной микроскопии	50
2.6	Формирование эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока	50
2.6.1	Подготовка сосудистых протезов и заселение эндотелиальными клетками	50
2.6.2	Оценка количества и жизнеспособности эндотелиальных клеток, заселенных на внутреннюю поверхность сосудистых протезов с коллагеном и фибрином в статичных условиях и в условиях пульсирующего потока.....	53
2.6.3	Исследование фенотипа и секреторной активности эндотелиальных клеток, заселенных на поверхность полимерных сосудистых протезов с коллагеном и фибрином	54
2.7	Сравнительная оценка тромборезистентности сосудистых протезов	55
2.8	Полнотранскриптомное секвенирование рибонуклеиновой кислоты	56
2.9	Протеомное профилирование эндотелиальных клеток.....	58
2.10	Статистические методы анализа данных.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ АУТОЛОГИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК		61
3. 1	Прогнозирование итогов культивирования на этапе получения крови или мононуклеарной фракции.....	62
3.2	Результаты получения культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток на этапе культивирования.....	65
3.3	Результаты фенотипирования	67

3.4 Результаты иммунофлуоресцентного фенотипирования колониеформирующих эндотелиальных клеток.....	71
3.5 Способность к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связывание лектина.....	73
3.6 Исследование ангиогенной активности.....	74
3.7 Пролиферативная активность.....	75
3.8 Результаты культивирования колониеформирующих эндотелиальных клеток в зависимости от типа хирургического вмешательства и времени забора крови.....	77
3.9 Сравнительная оценка базового профиля генной экспрессии.....	78
3.10 Сравнительные результаты протеомного профилирования.....	84
ГЛАВА 4. ПОДБОР РЕЖИМОВ КЛЕТОЧНОГО ЗАСЕЛЕНИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ В УСЛОВИЯХ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА.....	91
4.1 Выбор оптимального режима культивирования в условиях пульсирующего потока для формирования и сохранения слоя эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов.....	91
4.1.1 Определение продолжительности культивирования.....	91
4.1.2 Определение оптимальной интенсивности напряжения сдвига.....	93
4.2 Сравнительный анализ эффективности использования различных типов эндотелиальных клеток для создания клеточнозаселенного сосудистого протеза в условиях <i>in vitro</i>	95
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ФИБРИНОМ И КЛЕТОЧНОГО ЗАСЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТИ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ.....	101
5.1 Метаболическая активность эндотелиальных клеток на различных поверхностях.....	101
5.2 Сравнительный анализ структуры поверхности сосудистых протезов до и после модифицирования фибрином.....	102
5.3 Сравнительный анализ физико-механических свойств сосудистых протезов с фибрином.....	104

5.4 Сравнительная характеристика тромборезистентности сосудистых протезов с фибрином	106
5.5 Сравнительная оценка адгезии и жизнеспособности колониеформирующих эндотелиальных клеток на поверхности сосудистых протезов в зависимости от модифицирования фибрином или коллагеном и культивирования в статических или динамических условиях.....	110
5.6 Сравнительные результаты специфического иммунофлуоресцентного анализа поверхности клеточнозаселенных сосудистых протезов с фибрином	113
5.7 Результаты полнотранскриптомного секвенирования колониеформирующих эндотелиальных клеток, культивированных на поверхности протезов с фибрином в статических условиях и в условиях пульсирующего потока.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	129
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Традиционная сосудистая хирургия основывается на реконструкции окклюзированных сосудов с использованием аутологичных трансплантатов, таких как внутренняя грудная артерия, лучевая артерия и подкожная вена [141]. Отсутствие донорских сосудов у определенной когорты пациентов делает разработку тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра весьма перспективным направлением [87, 133, 171]. 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 [36, 191]. Замещение каркаса новообразованной сосудистой тканью позволяет рассчитывать на то, что оперативное вмешательство будет выполнено единовременно с последующим полным восстановлением структуры собственного нового сосуда [87, 180].

Вместе с тем, эффективная эндотелизация является важным аспектом проходимости сосудистых протезов диаметром менее 5 мм в условиях низкой скорости кровотока в протезируемом сосуде [27, 123, 139, 158]. Существуют два подхода к стимулированию эндотелизации: первый основан на биофункционализации поверхности различными молекулами клеточной адгезии и использовании внутренней среды организма в качестве биореактора [43]. 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 [131, 186]. Поэтому при моделировании биомеханических стимулов часто используются показатели нижней границы физиологической нормы напряжения сдвига [158, 200]. Устойчивые механические стимулы адаптируют эндотелиальные клетки к потоку, а в случае использования прогениторных клеток – способствуют дифференцировке к зрелому фенотипу [27].

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 [33]. Также данная разработка соответствует стратегическим планам Российского научно-технологического комплекса по созданию персонализированных 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 раздельная 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 [8].

Также были разработаны и протестированы сосудистые протезы с пептидами, призванными усиливать адгезию циркулирующих эндотелиальных клеток к внутренней поверхности сосудистых протезов [161].

Нерешенным вопросом является возможность создания персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза с прекондиционированием 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 прекондиционирование 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 [55].

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 preconditionирования 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 полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона, модифицированный фибрином и заселенный в условиях прекодиционирования напряжением сдвига колониеформирующими эндотелиальными клетками пациентов с ишемической болезнью сердца.

Практическая значимость работы

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.

Автор сердечно благодарит за понимание, ценные советы, консультативную и организационную помощь, своего научного руководителя д.м.н. Антонову Ларису Валерьевну. Автор также выражает благодарность за профессиональное участие сотрудников отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» к.м.н. В.Г. Матвееву, к.б.н. Е.А. Великанову, к.м.н. В.В. Севостьянову, Е.О. Кривкину, д.м.н. А.Г. Кутихина, к.б.н. Т.В. Глушкову, Т.Н. Акентьеву, к.б.н. Е.А. Сенокосову.

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.

Объём 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.

ГЛАВА 1. НЕОБХОДИМОСТЬ СОЗДАНИЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО ПРОТЕЗА СОСУДА МАЛОГО ДИАМЕТРА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Основные недостатки существующих протезов сосудов малого диаметра

Клинически одобренным трансплантатом для протезирования сосудов малого диаметра является использование аутологичного сосуда (внутренней грудной артерии, большой подкожной вены, лучевой артерии и желудочно-сальниковой артерии), однако 20-30 % пациентов не обладают подходящими для использования в качестве трансплантатов аутологичными сосудами [15, 90, 110, 190]. Факторы, нарушающие качество сосудов, включают сопутствующие заболевания, такие как диабет, а также хроническое заболевание периферических артерий [88]. Более того, в случае выполнения повторного шунтирования возможность найти другой подходящий сосуд резко снижается [133].

Еще одним ограничивающим фактором является биомеханическое несоответствие между артериями и венами, которое может привести к образованию гиперплазии неоинтимы, активации иммунной системы и отторжению трансплантата [114, 133, 193].

Для аорто-коронарного шунтирования (АКШ) наиболее оптимальным трансплантатом является аутологичная внутренняя грудная артерия, которая обеспечивает удовлетворительную долгосрочную проходимость более 85 % через 10 лет [40, 51, 111]. Однако, наиболее часто используемым трансплантатом является подкожная вена, которая продемонстрировала относительно низкую долгосрочную проходимость 61 % через 10 лет. Несмотря на их анатомическое несовершенство, использование венозных трансплантатов сопряжено с меньшей трудозатратностью при извлечении [109, 110, 114, 135, 142, 193]. При шунтировании нижних конечностей в бедренно-дистальной позиции применяется также аутологичная подкожная вена из-за недоступности аутологичного

артериального трансплантата и характеризуется 53 % проходимостью через 3 года [127].

Использование синтетических протезов малого диаметра из биостабильных полимеров (вспененный полиэтилентерефталат (PET, Dacron), политетрафторэтилен (ePTFE, Teflon)) не привело к положительным результатам [8, 15, 168]. Их использование характеризовалось более низкими показателями проходимости < 50 % в течение 1 года из-за плохой эндотелизации, сопровождалось развитием гиперплазии неоинтимы и острым тромбозом зоны реконструкции, что требовало репротезирования [15, 109, 130].

Для снижения тромбогенности синтетических трансплантатов из ePTFE Williams и др. (2017) заселяли их аутологичными клетками стромально-васкулярной фракции, полученными из жировой ткани, и имплантировали в качестве бедренно-большеберцового шунта в фазе клинического исследования. Проходимость трансплантатов в течение 1 года составила 60 % для клеточнозаселенных графтов (3/5 проходимые) и 50 % для контрольных ePTFE графтов [132].

1.2 Представление о тканеинженерном сосудистом протезе

Основной идеей тканевой сосудистой инженерии является развитие живой функциональной структуры в месте имплантации, которая может синхронизироваться в своём адаптивном росте [15, 57]. При создании функционального сосудистого протеза необходимо иметь представление о строении нативной сосудистой стенки. Стенка сосуда состоит из трех основных слоев клеток с несколькими слоями внеклеточного матрикса (ВКМ): интима, медиа, адвентиция. Интима состоит из монослоя эндотелиальных клеток (ЭК), лежащих на базальной мембране, и является границей между кровью и компонентами стенки сосуда. Таким образом, эндотелиальный слой поддерживает гомеостаз артериальной системы, регулируя местные и системные стимулы, и служит средством связи между тканями и компонентами крови. Средний слой

состоит преимущественно из гладкомышечных клеток (ГМК), коллагеновых и эластиновых волокон, которые поддерживают механическую прочность, эластичность и вазоактивный ответ. Самый внешний слой адвентиция состоит из фибробластов, которые отвечают за предотвращение расширения кровеносных сосудов [11, 15, 55].

Современная сосудистая тканевая инженерия основывается на использовании трех компонентов: биосовместимый матрикс, видоспецифичные клетки (предварительно засеянные или рекрутированные из кровотока) и биофункциональные молекулы [8, 10, 15, 171].

1.2.1 Полимерные матрицы для клеточного заселения

Матрица для клеточнозаселенных протезов представляет собой носитель, имитирующий структуру ВКМ, задачей которого является создание микроокружения для клеток, способствующего эффективной адгезии к поверхности матрицы, миграции клеток во внутрь каркаса, а также обеспечивающего транспорт метаболитических веществ [11, 15, 23, 30, 57, 83, 85]. Дополнительное регулирующее действие на функции клеток могут оказывать механические и топологические свойства матрицы.

Получение матриц возможно посредством сохранения нативной структуры внеклеточного матрикса, что легло в основу принципа децеллюляризации ткани, или использования белков внеклеточного матрикса в качестве структуры *de novo*, имитирующей нативную, например, методом электроспиннинга. Децеллюляризация нативных кровеносных сосудов основана на удалении антигенного клеточного и генетического материала из ткани с сохранением биологических свойств и специфической нативной структуры кровеносных сосудов. Таким образом, децеллюляризованные трансплантаты способны стимулировать рекрутирование, пролиферацию и дифференцировку клеток. Однако процесс децеллюляризации также может повредить ВКМ, что

отрицательно влияет на целостность и механические свойства сосудистого протеза [15, 23, 30, 36, 64].

Электроспиннинг – это высокотехнологический метод, позволяющий создавать трехмерные 3D-каркасы из полимерных волокон с контролируемыми параметрами, такими как диаметр волокон и пористость материала, и работать как с полимерами, так и с белками [15].

Для создания матриц часто используют синтетические и биологические полимеры, к которым предъявляется ряд требований: физико-механические свойства, соответствующие нативным сосудам; биосовместимость материала и продуктов его деградации; возможность регулирования скорости биodeградации, соответствующей скорости образования новой ткани [15, 87, 118, 123, 158, 171, 180, 191].

Среди биodeградируемых полимеров по происхождению выделяют синтетические и природные. К синтетическим полимерам относят полигликолевую кислоту (ПГК/PGA), полимолочную кислоту (ПМК/PLA), поли-ε-капролактон, полиглицерин себацинат (ПГС/PGS) и др. [15, 171]. Среди природных полимеров могут быть выделены полисахариды (хитозан, целлюлоза, альгинат, гиалуроновая кислота и др.) и белки (фибрин, коллаген, эластин, желатин, кератин, шелк, актин и миозин). Перспективным подходом является создание композитного материала посредством сочетания синтетических и природных полимеров, при котором достигаются желаемые свойства и характеристики, а нежелательные нивелируются [15, 57, 83, 118, 121, 182].

Полигидроксиалканоаты (ПОА) получают путем бактериального или химического биосинтеза. Данная группа полимеров представлена полимолочной и полигликолевой кислотами, поли-ε-капролактоном, полигидроксибутират-валератом и их сополимерами [7, 9]. Данные полимеры отличает целый ряд схожих свойств: способность к биodeградации, распад без образования токсичных составляющих, выгодные физико-механические свойства, биосовместимость, возможность формования различными технологическими методами.

Полигидроксibuтират-валерат (ПГБВ) – сополимер поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат), относится к гетерополимерным полиоксиалканоатам. Среди других типов ПОА-полимеров характеризуется прочностью и эластичностью [174]. Исследование *in vitro* подтвердило биосовместимость ПГБВ. Установлено, что взаимодействие полимерных волокон с остеобластами и фибробластами способствует их миграции и пролиферации [34, 126].

Полигликолевая кислота (ПГК) представляет собой биоразлагаемый полиэфир, который обладает высоким уровнем гибкости и отсутствием воспалительной реакции *in vivo* [15, 181, 182]. Ограничением для клинического применения ПГК является слишком короткий период деградации (6-8 недель), в связи с чем рекомендуется использовать в сочетании с другими полимерами [190].

Полимолочная кислота (ПМК) представляет собой полимер со структурой и механическими свойствами, очень похожими на полигликолевую кислоту, но с более длительным временем разложения [15, 179]. Однако ПМК обладает гидрофобной структурой в сравнении с ПГК, которая препятствует адгезии и пролиферации клеток, и проявляет склонность к ранней тромбогенности [190]. Однако, заселение каркасов из ПМК МСК жирового происхождения позволило улучшить биосовместимость использованного материала [133]. Поли-L-молочная кислота (PLLA) представляет собой изомерную форму ПМК и является наиболее изученным полимером для применения в тканевой сосудистой инженерии. Результаты исследований *in vitro* показали высокую жизнеспособность клеток при культивировании на PLLA-матриксах [15, 179, 181].

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) является наиболее часто используемым полимером в тканевой сосудистой инженерии, благодаря механическим свойствам, превышающим свойства естественных сосудов: максимальному напряжению и прочности при растяжении. Кроме того, ПКЛ обладает хорошей биосовместимостью, медленной биodeградацией и высокой стабильностью при обработке и хранении [95]. Однако его применение ограничивается гидрофобными характеристиками, которые могут препятствовать адгезии и

пролиферации клеток, а также могут вызывать агрегацию тромбоцитов и гиперплазию интимы [15, 121].

С другой стороны, поли(лактид-со-ε-капролактон) (PLCL) представляет собой сополимер полимолочной кислоты и капролактона, обладающий хорошей биосовместимостью, эластичностью и медленной деградацией [100, 181]. Ong и соавторы (2017) использовали комбинацию ПГК с сополимером полимолочной кислоты и капролактона для увеличения времени деградации сосудистого протеза [15, 179].

Группой Jia W. и др. (2020) был разработан трехслойный трубчатый трансплантат изготовленный методом электроспиннинга с целью имитации естественной сосудистой архитектуры. Внутренний слой состоял из поликапролактона, средний слой из поли(лактид-ко-гликолида) (PLGA), а внешний из полиуретана. Подкожная имплантация такого материала мышам на 8 недель установила, что биомиметический трехслойный матрикс активно заселялся клетками с формированием коллагеновых волокон в его толще [57].

В области инженерии сосудистой ткани активно изучается фиброин шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*, являющегося перспективным биополимером для создания матриц методом полива или электроспиннинга [134, 178]. Фиброин шелка обладает хорошей биосовместимостью, медленной биоразлагаемостью и отличными механическими свойствами, что делает его потенциально пригодным материалом для создания изделий сердечно-сосудистого профиля [62, 108, 132]. Фиброин шёлка применяется в сочетании с другими полимерами, такими как ПМК и ПКЛ [113]. Также для изготовления тканеинженерных сосудистых протезов исследуется индийский эндемичный не тутовый шелк *Antheraea assama*, который наследует от природы превосходные механические и биологические свойства (например, мотивы RGD) по сравнению с шелком *Bombyx mori* [15, 37].

1.2.2 Биофункционализация поверхности сосудистых протезов с целью эндотелизации

Эндотелизация сосудистых протезов малого диаметра является решающим фактором как для краткосрочной, так и для долгосрочной проходимости сосудистых протезов [15, 103, 162]. Эндотелий является границей раздела кровяная ткань. Наличие эндотелиальной выстилки в сосудистом протезе определяет его тромбогенные свойства, поскольку каскад свертывания крови запускается моментально при взаимодействии крови с инородным материалом. Таким образом, ранняя эндотелизация предотвращает образование тромба и окклюзию просвета сосуда [20, 36]. Функционально активный эндотелий синтезирует большое количество биологически активных молекул, которые обеспечивают физиологический контроль вазорегуляции и модуляции проницаемости сосудов, участвует в регуляции гемостаза и воспаления [15, 29].

Среди механизмов естественной эндотелизации сосудистых протезов после имплантации выделяют три механизма: трансмуральную инфильтрацию, трансанастомозную миграцию и эндотелизация эндотелиальными клетками-предшественниками (ЭПК), циркулирующими в кровотоке [141].

Трансанастомозная эндотелизация основана на миграции эндотелиальных клеток через анастомоз из окружающего эндотелия, поэтому охватывает только непосредственную перианастомозную область и является недостаточной для формирования монослоя на всей поверхности сосудистого протеза [15, 32, 141].

Исследование Pennel T. (2018) установило, что эндотелиальное покрытие на синтетических поверхностях трансплантатов усиливается за счет трансмуральной эндотелизации посредством врастания неокapилляров из периваскулярной области. Было установлено, что этот процесс происходит преимущественно в трансплантатах с достаточной пористостью [183].

Эндотелизация *in situ* основана на формировании эндотелиальной выстилки путем миграции и захвата эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) непосредственно из кровотока на внутреннюю поверхность сосудистого протеза.

При этом, покрывая небольшую поверхность, подобная эндотелизация требует многоступенчатого процесса: рекрутирования ЭПК, хемоаттракции, адгезии, пролиферации и дифференцировки в зрелые эндотелиальные клетки (ЭК) [96]. Подобная эндотелизация возможна при предшествующем модифицировании внутренней поверхности сосудистых протезов проангиогенными ростовыми факторами, хемоаттрактантными молекулами и интегрин-связывающими пептидами [15, 33].

Широкое распространение получил подход, основанный на модифицировании поверхности сосудистых протезов с помощью различных биоактивных молекул, как правило, это адгезивные пептиды, факторы роста, хемокины, стимулирующие процессы адгезии, миграции и дифференцировки клеток. Данные биомолекулы могут быть химически или физически конъюгированы с каркасом с целью стимулирования миграции клеток к месту имплантации сосудистого протеза [6, 15, 26, 33, 35, 95]. Одним из методов повышения адгезии эндотелиальных клеток является иммобилизация различных пептидных лигандов на внутренней поверхности сосудистых протезов, например: RGD (Arg-Gly-Asp), GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) и DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala) [33, 35, 72].

RGD пептид, представляет собой распространенный мотив аминокислотной последовательности Arg-Gly-Asp, присутствующий во многих белках ВКМ, таких как фибронектин и ламинин [172]. Последовательность RGD является лигандом интегринов, класса молекул, контролирующего множество функций клетки, таких как адгезия и пролиферация [89]. Было показано, что иммобилизация RGD-содержащих пептидов на поверхности полимерного трансплантата усиливает адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток [33, 35].

Процесс эндотелизации возможно стимулировать различными факторами роста. Наиболее часто применяемым в ТСИ является хорошо известный ангиогенный фактор – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который также усиливает продукцию оксида азота и сосудистую проницаемость [29, 161]. В отличие от VEGF основной фактор роста фибробластов (bFGF) способствует

созреванию кровеносных сосудов и стимулирует миграцию, пролиферацию и выживание клеток сосудистой системы, хотя и обладает значимо меньшим проагиогенным эффектом [91].

Стромальный фактор 1α (SDF- 1α) связывается с рекрутируемыми стволовыми клетками через рецептор CXCR4. Кинетика высвобождения хемокина SDF- 1α зависит от свойств полимера и его скорости деградации, в то же время миграция стромальных клеток костного мозга (BMSC) напрямую зависит от уровня высвобождения SDF- 1α [6, 15, 148]. Потенциал трансплантатов ПКЛ/коллаген, нагруженных SDF- 1α , оценивали путем их имплантации в брюшную аорту крыс на 4 недели. К концу эксперимента была установлена 100 % проходимость трансплантатов, а на их внутренней поверхности выявлен эндотелиальный монослой [95].

Помимо иммобилизации биоактивных молекул, исследуется возможность использования белков ВКМ как для создания композитных конструкций с целью улучшения биосовместимости и клеточной инфильтрации, так и в качестве самостоятельного материала для создания каркасов.

Коллаген – основной компонент нативного ВКМ, является базой соединительной ткани и несет на себе сайты клеточной адгезии (RGD-последовательность) [48]. На данный момент выявлено 28 различных типов коллагена, коллаген I типа является самым распространенным белком ВКМ в организме человека [149]. Фибриллярные коллагены наиболее часто используются в производстве биоматериалов. Коллаген I типа получил широкое применение в тканевой сосудистой инженерии, благодаря сочетанию таких физико-механических свойств, как прочность и эластичность, а также высокой биосовместимости, в частности поддержке клеточной адгезии, а также благодаря возможности применения для изготовления матриц методом электроспиннинга [8, 49, 59, 173].

Фибрин формируется на конечном этапе коагуляционного каскада, в результате расщепления фибриногена, растворимого белка плазмы и представляет собой сеть переплетенных и разветвленных фибриновых волокон, обладает

высокой биосовместимостью и сродством к различным биологическим поверхностям. Биодegradация фибрина происходит посредством фибринолиза, при этом продукты биодegradации нетоксичны [128]. Доказано, что фибриновая сеть имеет нанометрическую волокнистую структуру, которая имитирует внеклеточный матрикс и способствует высокой эффективности при посеве клеток, их адгезии и пролиферации [1, 13, 14, 21, 83]. По результатам исследования Barsotti M. C. и соавторов (2011) было выявлено, что фибриновая матрица аналогично фибронектину поддерживает жизнеспособность, ангиогенную способность и способность к синтезу цитокинов ранних ЭПК [79]. На модели фибробластов показано, что структура фибриновой матрицы обеспечивала миграцию и равномерное распределение клеток в толще матрикса с сохранением жизнеспособности [1]. Волокна фибрина содержат в своей структуре RGD-последовательности, которые связываются с рецептором интегрина $\alpha\beta_3$ эндотелиальных клеток и обеспечивают адгезию [99]. В работе Ardila и др. (2019) установлено, что каркас, изготовленный из смеси ПКЛ, желатина и фибриногена, с последующим термоформованием и покрытием смесью коллагена IV типа и фибронектина, улучшал рост ЭК, полученных из пуповинной крови человека (hCB-EC). Такой гибридный биоматериал содержит пептид RGD из желатина, фибриногена и фибронектина; пептид GRGDSP из фибронектина; пептид DGEA из желатина; и FYFDLR из коллагена IV типа [15, 162].

Фибрин является богатым источником факторов роста, цитокинов и хемокинов, таких как фактор некроза опухоли α (TNF- α), VEGF, bFGF, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), тромбоцитарный фактор роста AA (PDGF-AA), IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8, CCR1 и т. д. [15, 72, 81, 129, 148]. Фибрин поддерживает ангиогенез благодаря своей фибриллярной структуре, множеству адгезивных доменов, восприимчивости к протеазам и способностью высвобождать факторы роста [41]. Различные исследования свидетельствуют, что фибриновый гель в качестве естественного каркаса повышает жизнеспособность клеток, улучшает клеточное взаимодействие и способствует дифференцировке ИПСК в олигодендроциты [80, 156].

При всех своих преимуществах фибрин обладает ограниченными физико-механическими свойствами, в частности, не выдерживает физиологическое давление в сосудистом русле. Данный факт ограничивает использование фибрина в качестве основного биополимера для создания сосудистых протезов [155]. Согласно ряду исследований, создание гибридного материала ПКЛ/фибрин приводит к улучшению механических свойств и биосовместимости [83, 94].

Тем не менее не теряет актуальность технология, в которой фибрин будет использован в качестве самостоятельного каркаса изделия. Исследователям Арег Т. и соавторам (2016) удалось получить полностью аутологичный сосудистый протез, объединив все три составляющие: фибриновую основу, КФЭК и ГМК. Для получения фибринового матрикса с удовлетворительными физико-механическими свойствами использовали сшивание XIIIa фактором, высокоскоростное центробежное формование, заселение КФЭК и ГМК. Данный протез имплантировали овцам сроком на 1 и 6 месяцев. В результате активного ремоделирования клеточнозаселенного сосудистого протеза через 6 месяцев имплантации сформировалась структура ткани, схожая с нативной артерией. Фибрин был замещен вновь синтезированными белками ВКМ, обнаружено врастание клеток и капилляров из окружающей ткани в имплантированные сегменты, в итоге, биомеханические свойства стали соответствовать свойствам нативной артерии. Несмотря на очевидный успех, прочностные свойства протезов до имплантации не соответствовали в полной мере свойствам нативной артерии, поэтому ряд животных погибли от разрыва протеза в процессе операции [124]

В исследовании Syedain Z.H. и соавторов (2017) сосудистые протезы на основе секретлируемого ВКМ, изготовленные из бычьего фибринового геля, заселяли неонатальными фибробластами и подвергали культивированию в биореакторе 2 недели, затем децеллюлизовали и имплантировали павианам. Эксплантированные через 3 и 6 месяцев протезы продемонстрировали 83 % (5/6) и 60 % (3/5) проходимость, соответственно, а также а-актин положительные ГМК и развивающийся эндотелий [17].

1.3 Методы и подходы эндотелизации тканеинженерных сосудистых протезов в условиях *in vitro*. Клеточные культуры

Эндотелизация *in vitro* предполагает заселение сосудистых протезов эндотелиальными клетками перед имплантацией. Несмотря на то, что эндотелизация *in vitro* – это непростая технология, взаимодействие сосудистого протеза с готовым к моменту имплантации эндотелиальным слоем с кровью может значительно сократить риск тромбообразования [15, 16].

Важным критерием перспективности клеточной культуры является доступность источников получения. Достаточно условно все потенциальные источники ЭК можно разделить на 2 категории: доступные и ограниченного доступа. К доступным источникам относится периферическая и пуповинная кровь, жировая ткань. К категории ограниченного доступа относятся источники, получение которых требует дополнительного обширного хирургического вмешательства: эмбриональные стволовые клетки, костный мозг, сосудистая стенка. Доступность источника также определяет возможность развития персонафицированного подхода. Несмотря на то, что применение первичных ЭК в целом доступно, количество и качество клеток с точки зрения функциональности и стабильности кариотипа ограничено [15, 39]. Достаточно обширное развитие получил подход, основанный на использовании различных прогениторных или стволовых клеток, например, эндотелиальных прогениторных клеток, мезенхимальных стволовых клеток (МСК), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [12, 162].

Эндотелиальные клетки (hCB-ECs) были получены при культивировании моноклеарной фракции (МНФ) пуповинной крови на коллагеновой подложке в полной питательной среде EGM-2 plus. Полученная культура hCB-ECs дифференцированная в ЭК, характеризуется фенотипом: CD31+CD105+CD45–; высокой пролиферативной активностью и рассматривается как неаутологичный источник клеток [15, 162].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) также могут рассматриваться для эндотелизации сосудистых протезов *in vitro*, так как способны дифференцироваться в эндотелиальном направлении. МСК могут быть получены из различных источников, таких как жировая ткань, костный мозг и пуповинная кровь [12, 133, 180, 181]. МСК, полученные из костного мозга, представляют собой стандарт в области биологии взрослых стволовых клеток, однако стволовые клетки жирового происхождения являются привлекательной альтернативой из-за минимально инвазивной доступности [15, 92, 116]. Иммунофенотипически данные клетки экспрессировали (>95 %) CD73, CD90 и CD105, но не экспрессировали CD34, CD45 и HLA-DR, как было указано комитетом МСК Международного общества клеток и Генной терапии (ISCT) [115]. Эффективную дифференцировку МСК в ЭК осуществляли посредством культивирования в индуцирующей среде, содержащей VEGF, bFGF, инсулиноподобный фактор роста (IGF), эпидермальный фактор роста (EGF), аскорбиновую кислоту и гепарин, при этом полученные ЭК обладают полноценной ангиогенной активностью [15, 63].

Другой кандидатной популяцией стволовых клеток для сосудистой инженерии могут быть индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). В 2006 году Yamanaka S. впервые удалось получить плюрипотентное состояние терминально дифференцированных клеток путем введения набора специфических генов, получивших название факторы Яманаки: OCT4, SOX3, KLF4 и C-MYC [165]. В настоящее время разработаны различные стратегии получения ИПСК, без использования известного онкогена C-MYC. В литературе представлена информация об эффективной дифференцировке ИПСК в различные клеточные популяции, такие как нервные клетки, кардиомиоциты, гепатоциты, ЭК, ГМК и т.д. [166, 177, 197]. Однако эта технология еще не получила одобрения FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для клинического применения на людях, и поэтому ее применимость ограничена даже в сосудистой инженерии [53, 176].

Группа Generali M. и др. (2019) предложила разработку аутологичного сосудистого протеза на основе полимерного биodeградируемого каркаса из

ПГК/поли-4-гидроксibuтирата и клеток. ИПСК дифференцировали в ГМК и ЭК, затем клетки совместно высевали в фибриновом геле на биоразлагаемый каркас и культивировали в условиях пульсирующего потока (2,5 мл/мин) для индуцирования образования ткани *in vitro*. Полученный сосудистый протез показал большое количество ВКМ, содержащего гладкомышечный альфа-актин (α SMA) в интерстиции и тонкий люминальный слой vWF-положительных эндотелиальных клеток, приближающихся к архитектуре нативных сосудов [28].

Тканевая сосудистая инженерия по-прежнему нуждается в эндотелиальной культуре, которая бы обладала всеми необходимыми характеристиками, в том числе неиммуногенностью. В контексте персонифицированной медицины применение аутологичной культуры, полученной из доступных источников, является наилучшим вариантом.

В качестве аутологичной культуры ЭК рассматривается возможность применения колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК), так как выявлено их прямое участие в процессе неоваскуляризации путем включения в сосудистую сеть [31, 119, 137, 198]. Эта культура формируется из эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), которые могут быть получены из МНФ периферической и пуповинной крови при культивировании в селективных эндотелиальных средах, содержащих факторы роста [15, 159]. Также описан способ получения ЭПК основанный на предварительной стимуляции выхода этих клеток в периферическую кровь посредством гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) [12].

Возросший интерес к ЭПК привел к тому, что результаты различных исследований несопоставимы из-за гетерогенности ЭПК. Первоначально, выделяли две субпопуляции ранних и поздних ЭПК, в зависимости от времени их появления в культуре: ранние ЭПК появляются через 3–5 дней в культуре, тогда как поздние ЭПК появляются через 2–3 недели культивирования [163]. Консенсус в отношении гипотезы происхождения, фенотипа, единообразия маркеров идентификации не достигнут, что затрудняет интерпретацию множества исследований. Тем не менее научное сообщество попыталось преодолеть

путаницу и развести субпопуляции [69]. Ранние ЭПК являются миелоидными ангиогенными клетками, определяются как культивируемые клетки, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови, выращенных в условиях культивирования эндотелиальных клеток, и характеризуются иммунофенотипом: CD45+CD14+CD31+CD146–CD133–Tie2–. Данные клетки не дифференцируются в эндотелиальные, но способствуют ангиогенезу не напрямую, а паракринно, активно синтезируя проангиогенные факторы VEGF, CXCL1, CXCL12, G-CSF и IL-8, что усиливает миграцию, индуцирует пролиферацию и дифференцировку [15, 42, 120] «Поздние» ЭПК (LEPC – late endothelial progenitor cells) в настоящее время более известны как КФЭК и представляют собой эндотелиальные клетки, определяемые по совокупности поверхностных маркеров CD34+CD31+CD133+CD309+CD144+CD45–CD14–CD115–. Данные клетки отличает высокая ангиогенная активность и способность непосредственно встраиваться в сосудистую стенку, что вносит значительный вклад в образование кровеносных сосудов *de novo* [31, 69, 164]. Также было показано, что при длительной экспансии культуры КФЭК *in vitro* (от 3,5 до 4,5 месяцев) сохраняется стабильный фенотип с высокой экспрессией маркеров дифференцированного эндотелия, что является важным требованием в перспективе использования КФЭК для аутологичной клеточной трансплантации [15, 86].

По ряду характеристик именно поздние ЭПК являются перспективными кандидатами для регенеративной медицины. Содержание ЭПК в периферической крови в зависимости от способа идентификации (посредством проточной цитометрии) крайне низкое, практически единичное менее – 0,01 % в мононуклеарной фракции, содержание «поздних» в 10 раз меньше, чем «ранних». Изоляция ЭПК сложна из-за их низкого содержания, отсутствия стандартизированных методов выделения и отсутствия единообразия идентификации [15, 138].

Эндотелиальная гетерогенность тесно связана со специфическими функциями органов и тканей. Выделяют 4 типа спецификации эндотелиальных клеток: артериальные, венозные, микрососудистые и лимфатические [45]. В свою

очередь, микрососудистый эндотелий детерминируется при органоспецифической дифференцировке [125, 151]. В целом неоднородность между артериальной и венозной спецификацией эндотелиальных клеток (на уровне транскрипции ниже, чем гетерогенность микрососудистых эндотелиальных клеток в тканях), вероятно, в значительной степени может быть обусловлена органоспецифичностью микроокружения [19, 152].

Маркерами артериальной спецификации являются экспрессия *EFNB2*, нейропилина-1 (*NRP1*), маркеров семейства Notch, таких как *Notch1-4* и их рецепторов, тогда как венозный эндотелий характеризуется присутствием *EphrinB4*, *NRP2* и фактора транскрипции *COUP-TFII* (также известный как *NR2F2*) [22].

Анализ единичных клеток *RNA-seq* сердца человека также выявил несколько подтипов ЭК, включая артериальные ЭК (экспрессирующие *HEY1*, *DKK2* и *EFNB2*), венозные ЭК (экспрессирующие *ACKR1* и *NR2F2*), капиллярные ЭК (экспрессирующие *BTNL9* и *CD36*), лимфатические ЭК (экспрессирующие *CCL21* и *PROX1*) и эндокардиальные ЭК (экспрессирующие *NRG3* и *PCDH15*) [154]. С помощью одноклеточного секвенирования рибонуклеиновой кислоты (РНК) (*scRNA-seq*) была совершена попытка выявить специфические маркеры КФЭК. Были выявлены высокие уровни экспрессии костного морфогенетического белка 2 и 4 (*BMP2* и *BMP4*) и *EphrinB2* (*EFNB2*) по сравнению с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (*HUVEC*) [153]. Эти молекулы важны для эмбрионального ангиогенеза, клеточной адгезии и миграции [75]. КФЭК и *HUVEC* обладают высокой экспрессией нейропилина 1 (*NRP1*) и сосудистого эндотелиального фактора роста С (*VEGF-C*), важных факторов для дифференцировки эндотелиальных предшественников [73, 153]. Было продемонстрировано, что как *BMP2*, так и *BMP4* экспрессируются исключительно КФЭК, и они необходимы для ангиогенного потенциала КФЭК [38]. Под влиянием напряжения сдвига у ЭПК выявлена активация экспрессии мРНК маркеров артериальных эндотелиальных клеток *NOTCH1*, *NOTCH3*, *HEY1*

и EPHB2 и снижение экспрессии мРНК маркеров венозных эндотелиальных клеток EPHB4 и NRP2 [84].

Несоответствие применения фенотипически и функционально различных клеток при разработке биомедицинских изделий может повлиять на клиническую эффективность. Такое предположение основывается на результатах реконструкции артериального русла венозным трансплантатом. Несмотря на то, что трансплантаты подкожной вены являются аутологичными и иммунологически совместимыми, они претерпевают аномальное ремоделирование, что отражается в развитии чрезмерной гиперплазии неоинтимы, приводящая к ухудшению клинической эффективности. Предположительно это связано с ограниченной способностью адаптации терминально дифференцированных венозных ЭК в артериальной среде [114, 193].

Помимо общих требований (возможность получения достаточной клеточной массы, неимунногенность) применения аутологичной культуры ЭК для заселения, необходимо поддерживать соблюдение соответствия имплантируемых ЭК и сосудистым руслом, в которое выполняется протезирование. Так как правильный выбор идеального источника клеток для заселения считается ключевым фактором успешного процесса преэндотелизации сосудистого протеза [143].

1.4 Биомеханические стимулы, естественная адаптация жизнедеятельности эндотелиальных клеток

Статические методы культивирования сосудистых клеток *in vitro* не соответствуют физиологии и условиям функционирования данных клеток в организме. Помимо биохимических сигналов, представленных биологически активными молекулами, такими как цитокины, ростовые факторы, в организме на клетки воздействуют биомеханические стимулы. Пассивные биомеханические стимулы определяют физическую среду, в которой находятся клетки, такие как морфология субстрата, включая жесткость и формирование пространственного

паттерна [11, 85, 167]. В физиологических условиях сосудистые клетки постоянно подвергаются сложному воздействию различных активных гемодинамически обусловленных стимулов, напрямую воздействующих на сосудистую стенку, среди которых можно выделить напряжение сдвига, окружное напряжение, циклическое растяжение и остаточное напряжение [11, 15, 25, 131, 139, 187].

Напряжение сдвига представляет собой трение, создаваемое при скольжении одного слоя относительно другого, возникающих в потоке крови на просветной поверхности стенки. Данному явлению в большей степени подвергаются ЭК. Напряжение сдвига колеблется от 1 до 6 дин/см² в венах и от 10 до 70 дин/см² в артериях, в среднем 20 дин/см² [68]. В зависимости от стимулов микроокружения, ЭК могут повышать уровень эндотелиальной синтетазы оксида азота (eNOS), что приводит к выработке NO, что ниже по течению индуцирует зависимую от ГМК вазодилатацию.

Интенсивность напряжения сдвига (τ) рассчитывается на основе уравнения Пуазейля (1):

$$\tau = \frac{4 \mu Q}{\pi r^3} \quad (1),$$

где τ – напряжение сдвига, μ – вязкость жидкости, Q – скорость потока крови, r – радиус кровеносного сосуда.

Два следующих механических стимула оказывают воздействие (деформация, напряжение) на ЭК со стороны субстрата, к которому они прикреплены. Окружное напряжение приводит к деформации сосудистой стенки по окружности в поперечном направлении, обуславливая механические свойства внеклеточного матрикса сосудистой ткани, зависит от артериального давления и отношения толщины стенки к диаметру.

Остаточное напряжение определяется как напряжение, которое все еще сохраняются в отсутствие активно приложенных нагрузок. Ряд исследований продемонстрировали при эксплантации сегмента артерии, что остаточное напряжение проявляется через ретракцию сосуда в продольном направлении, а также появление угла раскрытия при радиальном разрезе стенки по всей ее оси.

Предполагается, что благодаря остаточному напряжению, которое опосредуется ВКМ, обеспечивается однородность деформации/напряжения, что в дальнейшем способствует достижению биомеханического равновесия.

Пульсирующее напряжение сдвига представляет собой периодическое ламинарное течение, возникающее преимущественно в прямой части кровеносного сосуда; оно имеет положительную среднюю скорость потока и скорость жидкости, которые колеблются с частотой сердечного ритма.

В физиологических условиях характеристики кровотока оказывают атеропротективный или атерогенный эффект на ЭК. В прямой части сосуда однонаправленные напряжение сдвига и циклическое растяжение способствуют поддержанию сосудистого гомеостаза и оказывают атеропротективный эффект [56, 70]. В сосудистой сети сложной геометрии возникают разнонаправленные механические стимулы, которые инициируют риск атерогенеза в этих областях [61]. Различия в характере кровотока обуславливают различие фенотипов ЭК (провоспалительный / противовоспалительный) в сосудистом русле [15, 144].

Напряжение сдвига стимулирует эндотелиальные клетки посредством активации множества механосенсоров: интегриновых рецепторов, межклеточных контактов (VE-кадгерин, окклюдин), тирозинкиназных рецепторов (например, VEGFR2), белков фокальной адгезии, молекул адгезии тромбоцитов/эндотелиальных клеток 1 (PECAM-1/CD31), G-белков и рецепторов, связанных с G-белками (GPCR), стрейч-активированных ионных каналов, кавеолина-1 и кавеол, мембранных липидов, актинового цитоскелета и гликокаликса [64, 104, 107, 112, 157]. Множественные сигнальные пути координируются для формирования механочувствительных сетей для модуляции фенотипа и функций эндотелиальных клеток [131]. Актиновый цитоскелет клеток связан с ВКМ интегриновыми рецепторами. В свою очередь, интегрины связаны с цитоскелетом адаптерными белками, такими как талин [32, 104, 146].

В процессе ангиогенеза эндотелиальные клетки подвергаются механическому напряжению, создаваемому субстратом матрикса, напряжению сдвига жидкости, сократимости актина и напряжению межклеточных соединений.

Адаптация к локальному стрессу способствует экспрессии винкулина, усиливает связь VE-кадгерина с актиновым цитоскелетом, и тем самым регулирует адгезию между соседними клетками и позволяет эндотелиальным клеткам мигрировать и перестраиваться, что в целом, поддерживает целостность эндотелия [46, 194].

При создании функционального клеточнозаселенного сосудистого протеза для моделирования физиологических механических стимулов применяют системы динамического культивирования *in vitro*, обеспечивающие условия для дифференцировки и пролиферации клеток с последующим формированием тканевых структур [10, 15, 60, 70, 182]. Пульсирующая циркуляция представляет собой модель кровообращения человека, обуславливая необходимое прекондиционирование заселенной матрицы и стимуляцию дифференциации и пролиферации клеток [60, 76]. Подход прекондиционирования ЭК напряжением сдвига основывается на формировании устойчивого к сдвигу конфлюэнтного эндотелиального монослоя перед имплантацией, а также стимуляции клеток к синтезу ВКМ [15, 147].

Ремоделирование структуры цитоскелета ЭК является следствием адаптации к устойчивым механическим стимулам, для минимизации внутриклеточного стресса [170]. Многочисленные исследования подтвердили, что при сдвиговом напряжении ЭК вытягиваются и ориентируются в направлении потока, усиливают секрецию внеклеточного матрикса и увеличивают количество F-актиновых стрессовых волокон, способствуя адгезии клеток к поверхности матрикса [32, 64, 66, 67]. Нарастание напряжения в цитоскелете, по-видимому, уравнивается зависимым от фосфоинозитид 3-киназой (PI) ингибированием сократительной способности актомиозина, которая предотвращает перерастяжение ЭК и способствует внутриклеточным перестройкам [67].

Использование биореактора может повысить эффективность заселения клеток, облегчить их фиксацию и инфильтрацию, тем самым улучшать эндотелизацию сосудистого протеза. Существуют различные способы заселения клетками поверхности тканеинженерных сосудистых протезов, такие как статические, динамические, электростатические и магнитные методы. Наиболее

распространенный метод – динамический посев клеток, который обеспечивает однородность распределения и проникновение в матрикс за счет использования ротационного посева, вакуумного посева и напряжения сдвига жидкости [15, 144, 169].

Существует достаточно доказательств *in vitro*, которые могут свидетельствовать о возможном влиянии напряжения сдвига и окружного напряжения на многие существенные признаки как ЭК, так и стволовых клеток. Например, было продемонстрировано, что напряжение сдвига влияет на экспрессию генов, морфологию и адгезию, секрецию внеклеточного матрикса, механические свойства и способность к ангиогенезу ЭК и стволовых клеток [44, 54, 93, 106, 147]. Комплекс механических стимулов оказывал большее влияние на экспрессию генов эндотелиальной спецификации в HUVEC, чем применение одного вида механического воздействия [15, 24].

Продемонстрировано, что биохимическая стимуляция, представленная VEGF, и механическая, представленная циклическим напряжением сдвига (0–2,5 дин/см², 1 Гц) и циклическим растяжением (0–10%, 1 Гц в течение 24 часов), являются значимыми факторами в дифференцировке МСК в сторону эндотелиального фенотипа, о чем свидетельствует увеличение экспрессии эндотелиальных маркеров VEGFR2, VE-кадгерин и CD31 [177]. Культивирование МСК на трубчатых каркасах при напряжении сдвига 2,5 дин/см² и циклическом растяжении привело к увеличению уровней мРНК маркеров ЭК (vWF, CD31, VE-кадгерин и E-селектин) [145]. В исследовании Cheng (2014) продемонстрировано усиление дифференцировки ЭПК, полученных из пуповинной крови человека, в эндотелиальном направлении и ингибирование дифференцировки гладкомышечных клеток, под воздействием ламинарного потока с напряжением сдвига 12 дин/см². Более того, была показана взаимосвязь эндотелиальной дифференцировки, основанной на увеличении экспрессии vWF и CD31, с цитоскелетными перестройками посредством механочувствительных молекул, включая интегрин $\beta 1$, Ras, ERK1/2, паксиллин и FAK [117]. Таким образом, показано влияние напряжения сдвига на дифференцировку ЭПК в зрелые ЭК [15].

В исследовании Melchiorri A. и др. (2016) успешно продемонстрировали усиленную пролиферацию, инфильтрацию и дифференцировку ЭПК, заселенных на полимерный каркас из полигликолевой кислоты и поликапролактон-молочной кислоты, и подвергнутых культивированию в многоканальной перфузионной биореакторной системе с применением низкого значения напряжения сдвига ($0,6 \text{ дин/см}^2$), характерного для венозного русла [97].

Группа исследователей под руководством Dahl S. L. (2011) разработали трансплантат с использованием метода децеллюляризации на основе биodeградируемых каркасов. Каркасы из полигликолевой кислоты заселяли аутологичными ГМК и культивировали в биореакторе, генерирующем циклическое радиальное растяжение, тем самым стимулировали синтез ВКМ. Затем клеточнозаселенный трансплантат децеллюляризовали, полученный каркас, характеризовался устойчивостью к высокому давлению. Перед имплантацией бабуинам в качестве артериовенозных шунтов полученные трансплантаты заселяли аутологичными ЭК. Тестирование на модели бабуинов на срок 6 месяцев показало 88 % проходимость (7/8), ни в одном трансплантате не наблюдалось образование аневризмы и кальцификации [136].

Децеллюляризованные свиные сонные артерии заселяли МСК. Дифференцировку МСК в артериальные ЭК осуществляли напряжением сдвига, создаваемым биореактором, увеличивали ступенчато каждые 30 мин и достигли $12,9 \text{ дин/см}^2$ через 7 дней. При динамическом культивировании наблюдали статистически значимое увеличение экспрессии белков механорецепторов CD31 и VEGFR-2, CD144, увеличение экспрессии функционального белка тромбомодулина (CD141) и винкулина, более плотный F-актин и фибронектин в эндотелиальных клетках, в сравнении со статикой ($p < 0,05$). Для сравнения степени дифференцировки МСК в ЭК при различной величине напряжения сдвига уровни экспрессии мРНК механорецепторов ЭК (CD31 и VEGFR2) анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. Маркерные гены CD31 и VEGFR2 были значительно выше после динамического культивирования по сравнению со статической культурой [64].

Min Ju и др. (2017) разработали двухслойные трубчатые каркасы, состоящие из ПКЛ и коллагена I типа, изготовленные методом электроспиннинга. Затем на трубчатые каркасы высеивали ЭК и ГМК, полученные от овец Дорпер Кросс, с последующим созреванием в биореакторе в пульсирующем потоке. Клеточнозаселенные сосудистые трансплантаты были имплантированы на срок 6 месяцев в качестве заменителей сонных артерий на модели овец. Сосудистые протезы оставались проходимыми, а гистологический анализ выявил коллаген, эластин и гликозаминогликаны на месте полимерного каркаса в течение 6 месяцев после имплантации [65].

Joseph J. и соавторы (2022) разработали гибкий и механически прочный сосудистый трансплантат (NanoGraft) диаметром 4 мм путем переплетения нановолоконных нитей полимолочной кислоты с дополнительной предварительной обработкой аутологичным фибрином с целью снижения пористости. С целью оценки биосовместимости в условиях артериального потока проводили заселение графтов HUVEC и последующее культивирование в физиологических условиях (давление 120 мм рт. ст., ~ 72 циклов/мин) в течение 24 и 48 часов. На поверхности трансплантатов обнаружено равномерное распределение ЭК через 24 и 48 часов, а также увеличение количества HUVEC с 24 до 48 часов, что указывает на экспансию/пролиферацию ЭК. При краткосрочном тестировании (2 и 4 недели) трансплантата NanoGraft in vivo на модели свиньи с имплантацией в сонную артерию показало 100 % проходимость через 2 (3/3) и 4 недели (3/3) по сравнению с 67 % ePTFE (2/3) через 2 недели, составивших контрольную группу. Гистологическое исследование образцов после 4-недельной имплантации выявило минимальное утолщение неоинтимы, с однородным и полным эндотелиальным покрытием, что можно объяснить транслюминальным врастанием капилляров [20].

Резюме

Воспроизведение биомеханической нагрузки является физиологически обоснованной технологией создания сосудистых протезов с эндотелиальной выстилкой. Заселение высокопористых матриц в условиях динамической нагрузки может повлиять на равномерность заселения клеток и проникновения в стенку матрицы, в случае заселения ЭПК – способствовать дифференцировке. Воспроизведение физиологических реологических условий представляет собой многообещающую эффективную стратегию модуляции клеточных процессов, которые необходимы для развития и поддержания стабильного эндотелия. Стабильный и сливающийся эндотелий обеспечивает двойную защиту. Во-первых, он способен предотвратить прямой контакт между кровью и материалом изделия, а во-вторых, снизить вероятность возникновения местных воспалительных реакций. Формирование эндотелиальной выстилки в условиях пульсирующего потока усиливает адгезию ЭК к субстрату посредством прямой модуляции созревания белков фокальной адгезии и рекрутирования адапторных белков, опосредующих взаимодействие с актиновым цитоскелетом. Созревание межклеточных контактов ЭК, опосредованных сосудистым эндотелиальным кадгерином, способствует сохранности целостности эндотелия при воздействии напряжения сдвига.

Таким образом, важным моментом создания персонифицированных сосудистых протезов с эндотелиальной выстилкой, помимо поиска и использования аутологичных биологических составляющих, является воспроизведение критических механических сигналов и параметров культивирования клеток для стимулирования роста в соответствии с иерархической организацией сосудистой ткани.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека

Пуповины забирали после благополучного родоразрешения от неосложненной беременности здоровых рожениц, ознакомленных с протоколом информированного согласия на забор материала и давших своё согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) были выделены с использованием коллагеназы (Thermo Scientific, США) и высеяны на культуральные флаконы, покрытые коллагеном по адаптированному протоколу Jaffe E.A. и соавторов [52]. Клетки культивировали в полной питательной среде EGM-2 (Lonza, Швеция) с 10 % содержанием фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Hyclone, США) в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5 % CO₂. Смена среды производится 1 раз в 2-3 дня. Культуру выращивают до формирования 80 % от монослоя [16].

2.2 Получение культуры эндотелиальных клеток коронарной артерии человека

Для проведения экспериментов была использована коммерческая культура первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) (Cell Applications, США). 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, США), содержащей 10 % ФБС и 10 % диметилсульфоксида. Клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США) [16].

2.3 Получение колониеформирующих эндотелиальных клеток

Периферическая кровь была забрана у 16 пациентов с ИБС, направленных для плановой реваскуляризации миокарда с помощью операции аорто-коронарного шунтирования (АКШ) (n=8) или на чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) (транслюминальная баллонная ангиопластика и стентирование коронарных артерий) (n=8). К критериям включения были отнесены возраст пациентов до 60 лет и первичные вмешательства на сердце. К критериям исключения отнесены возраст пациентов старше 70 лет и постинфарктный кардиосклероз, острые ишемические и активные воспалительные процессы, гематологические, аутоиммунные и онкологические заболевания, согласно принятому протоколу НИИ КПССЗ (таблица 1).

Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Выписка из протокола ЛЭК № 20 от 09.12.2020 г. Все пациенты подписали протокол добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

У пациентов, направленных на открытое хирургическое вмешательство, 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.

Для стандартизации результатов во всех группах и во всех точках кровь из периферической вены забирали в пробирки гепарином в равном объеме 20 мл. Мононуклеарную фракцию выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя [3].

Отбирали интерфазу и дважды промывали в избытке фосфатно-солевого буфера (ФСБ, Gibco, США) с последующим центрифугированием. Культивирование производили по протоколу, предложенному Kolbe и соавторами [74]. МНФ ресуспендировали в полной питательной среде EGM-2 MV (Lonza, Швейцария) с 5 % ФБС (Hyclone, США), 2 % раствором

пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, США) и 0,25 г/мл амфотерицина В (Invitrogen, США) и вносили на культуральные планшеты 25 см² с бычьим коллагеном I типа (0,1 %) (Collagen I Bovine Protein, Invitrogen, A10644, США) использованным в качестве белковой подложки [3].

Таблица 1 – Основные характеристики групп пациентов

Характеристика	Операция аорто-коронарного шунтирования	Чрескожное коронарное вмешательство
Количество пациентов	8	8
Возраст	55,8 (50-64)	61,0 (51-70)
Пол	м	м
Ишемическая болезнь сердца	100 %	100 %
Мультифокальный атеросклероз	25%	25 %
Стенокардия	75 %	75 %
Кардиосклероз	12,5 %	62,5
Фракция выброса более 50 %	100 %	100 %
Гипертоническая болезнь III степени	87,5 %	100 %
Хроническая сердечная недостаточность I	87,5 %	75 %
Хроническая сердечная недостаточность IIa	12,5 %	25 %
Диабет II типа	0	25 %
Дислипидемия	25 %	0 %
Церебральный атеросклероз	50 %	37,5 %
Искусственное кровообращение	62,5 %	-
Время искусственного кровообращения, мин	81,4 (67-90)	-
Время пережатия аорты, мин	55,4 (43-70)	-
Длительность процедуры	-	38 мин (20-80)
Баллон	-	100 %
1 стент/2/3	-	75/12,5/12,5
Осложнения	12,5 % (острое нарушение мозгового кровообращения)	0 %

МНФ культивировали в контролируемых условиях CO₂-инкубатора при 37°C и 5 % CO₂. Смену среды первые 2 суток проводили ежедневно, в последующие дни с интервалом 2-3 суток. Первый пассаж клеток проводили через неделю, клетки переносили на планшеты, покрытые фибронектином (5 мкг/см²) (Sigma-Aldrich, США) продолжая культивировать в среде EGM-2MV до формирования 70-80 % конфлюентной культуры, после чего выполняли пассаж. Пассирование проводили с использованием аккутазы (Sigma-Aldrich, США). Визуальный контроль роста культуры осуществляли ежедневно. Иммунофенотипирование и оценка функциональных свойств клеток проводились на 3 неделе культивирования [3].

Адаптированный протокол основан на посеве МНФ крови сразу на фибронектин, минуя коллагеновое покрытие. Ранний пассаж первых колоний выполняется на 7 сутки культивирования на флаконы, покрытые фибронектином. Дальнейшее культивирование соответствовало вышеописанному протоколу.

2.4 Иммунофенотипирование эндотелиальных клеток

2.4.1 Проточная цитометрия

Иммунофенотипирование осуществляли с помощью проточной цитометрии. Для окрашивания во время пассажа отбирали $0,5-1 \times 10^5$ мононуклеаров или клеток культуры и отмывали ФСБ. В работе использовали комбинацию конъюгированных моноклональных антител (Biolegend, США) (если не указано иное): флуоресцеин-изоцианат (FITC) – CD3, CD34, фактор фон Виллебранда (vWF) (abcam, Англия); фикоэритрин (PE) – CD309 (BD, США), CD14; аллофикоцианин (APC) – CD133, CD31; фикоэритрин-цианин 7 (PC7) CD146; Pacific Blue 450 (PB 450) HLA DR; Krome Orange (KrOr) – CD45 (BC, США). Пробоподготовку выполняли согласно протоколам фирм производителей по следующим маркерам: CD45, CD3, CD14, HLA DR, CD34, CD309, CD146, CD133.

Культуру клеток с морфологией «булыжной мостовой» дополнительно окрашивали на vWF, CD31 [3, 14, 71].

В пробу вносили от 2 до 20 мкл соответствующих антител с дальнейшей инкубацией 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Контролем служило внесение в образец равного объема антител соответствующего изотипического контроля, дальнейшую пробоподготовку выполняли аналогично основной пробе [3]. Пробоподготовка образцов крови включала дополнительный этап лизирования эритроцитов раствором VersaLyse (BC, A09777, США) и с последующей отмывкой образцов ФСБ. Окрашивание внутриклеточного белка vWF выполняли с использованием набора IntraPrep (BC, A07803, США) с последующим анализом на проточном лазерном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) в программе CytExpert 2.1. При анализе оценивалась средняя интенсивность флуоресценции и процент позитивных клеток в популяции для каждого исследуемого маркера [3, 14].

2.4.2 Лазерная сканирующая микроскопия

Подтверждение эндотелиального фенотипа получали с помощью лазерной сканирующей микроскопии. Предварительно клетки культивировали на покровных стеклах, покрытых фибронектином, после чего проводили сочетанное окрашивание на vWF и CD144, CD31 и CD309. Для этого клетки фиксировали 10 мин в 4 % растворе параформальдегида. Перед окрашиванием внутриклеточного белка vWF клетки пермеабелизировали 0,1 % раствором Тритон X-100 15 мин. Для всех образцов выполняли блокирование неспецифического связывания антител 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) на протяжении 1 часа. Затем вносили первичные антитела (Abcam, Великобритания): anti-CD31, anti-CD144, anti-CD309, инкубировали во влажной камере 16 часов при температуре +4°C, отмывали и добавляли вторичные антитела (Abcam, Великобритания) (donkey to rabbit IgG Alexa Fluor 555, goat to mouse IgG Alexa Fluor 568, donkey to rabbit IgG Alexa Fluor 488) и антитела к vWF,

конъюгированные с FITC, с дальнейшей инкубацией 1 час при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкг/мл. Пробоподготовку контрольных образцов выполняли в соответствии с описанной процедурой, но вместо первичных антител использовали 1 % БСА. Готовые образцы заключали в ProLong (Life technologies, США) под покровное стекло. Контрольные образцы окрашивали в соответствии с описанной процедурой, но вместо первичных антител использовали 1 % БСА (Sigma, A3059, США). Препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия) [3].

2.4.3 Изучение способности эндотелиальных клеток к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связыванию лектина

В лунки с адгезированными клетками вносили 2,4 мкг/мл ацетилированных липопротеинов низкой плотности (Ac LDL) меченых DiI (Molecular Probes, США) в полной питательной среде EGM-2 и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После удаления реагента клетки фиксировали 2 % параформальдегидом 15 мин и инкубировали 1 час с лектином Ulex Europaeus Agglutinin-1, конъюгированным с FITC (FITC-UEA lectin, Sigma-Aldrich, США), в концентрации 1,5 мкг/мл. Ядра клеток окрашивали DAPI и препарат заключали в ProLong. Полученные образцы исследовали на конфокальном микроскопе LSM 700 [3, 71].

2.4.4 Исследование ангиогенной активности эндотелиальных клеток in vitro

Лунки 24-луночного планшета покрывали 200 мкл Матригеля (Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning, США) и оставляли на 30 мин при комнатной температуре для полимеризации. С целью создания одинаковых условий (концентрация ростовых факторов) для культивирования HUVEC и колоний, полученных из МНФ, использовали единую среду EGM-2 (Lonza, Швеция) с 5 %

ФБС. В каждую лунки с Матригелем вносили по 1×10^5 клеток, ресуспендированных в полной питательной среде. Образование капилляроподобных структур наблюдали через 4 и 16 часов методом фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе Carl Zeiss Observer.Z1, с использованием программы AxioVisionRel.4.8 [3, 71].

2.4.5 Изучение пролиферативной активности эндотелиальных клеток

Флуоресцентное окрашивание клеток проводили набором Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Время экспозиции культуры с EdU (5-Ethynyl-2-deoxyUridine) реагентом составляло 6 часов. Готовые образцы докрашивали ядерным красителем DAPI и заключали в ProLong под стекло. Препараты анализировали с помощью микроскопа LSM 700. В 10 случайно выбранных полях зрения проводили подсчет позитивно-окрашенных делящихся ядер (зеленое окрашивание) и общего количества ядер (синее окрашивание), далее подсчитывали процентное отношение делящихся к общему количеству ядер [3].

2.5 Изготовление сосудистых протезов малого диаметра

2.5.1 Изготовление трубчатых каркасов протезов малого диаметра методом электроспиннинга

Ранее было доказано, что изготовление сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген с использованием отдельной подачи полимерного раствора ПГБВ/ПКЛ и коллагена I типа значительно улучшает матричные свойства протезов, увеличивая доступность сайтов адгезии для клеток, по сравнению совместной подачей раствора полимеров и коллагена [8].

Для исследования изготовили 2 вида полимерных трубчатых каркасов. Первый – из смеси 5 % поли(3-гидроксипропаната-ко-3-гидроксивалерата) (ПГБВ,

Sigma-Aldrich, США) и 10 % раствора поли(ε-капролактона) (ПКЛ; Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:2 в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich, США) и коллагена I типа (Gibco, США) с концентрацией коллагена 5 мг/мл (ПГБВ/ПКЛ/коллаген) [3]. Трубочатые ПГБВ/ПКЛ/коллаген-каркасы диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC, Япония) способом отдельной подачи полимера и коллагена. Для изготовления внутренней трети полимерных протезов использовались иглы калибра 27 G, для изготовления других двух третей – 22 G. Напряжение на игле – 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора – 15 см [16].

Второй вид каркасов выступал в качестве контроля или каркаса для последующего покрытия фибрином, и был выполнен из аналогичной полимерной композиции (ПГБВ/ПКЛ) с применением неполярного органического растворителя хлороформ ХЧ (Вектон, Россия) [16]. Для изготовления каркасов использовали иглы калибра 22 G. Напряжение на игле – 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора – 15 см, диаметр намоточного коллектора – 4 мм [14].

2.5.2 Методика получения фибрина и модифицирование фибрином трубчатых полимерных каркасов протезов

Полимерные трубчатые каркасы ПГБВ/ПКЛ стерилизовали замачиванием в 70 % этиловом спирте в течение 60 минут [5].

Преципитат фибриногена получали методом осаждения этанолом. Для этого кровь пациентов с ИБС забирали в пробирки с цитратом натрия. Пациенты были ознакомлены и подписали протокол добровольного информированного согласия. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Выписка из протокола ЛЭК № 20 от 09.12.2020 г. Для получения плазмы кровь центрифугировали 2000

Г 10 мин, полученную плазму охлаждали до 4°C. В плазму при постоянном перемешивании добавляли холодный этанол (70 об. %, 4°C) в соотношении 4:1 (плазма/этанол). Сразу после этого раствор плазма/этанол центрифугировали при 600 g при 4°C в течение 5 минут. Надосадочную плазму декантировали и осадок фибриногена растворяли в 0,9 % NaCl₂ с HEPES при 37°C (до концентрации фибриногена 30-40 мг/мл) [14, 18].

Полимеризацию фибрина выполняли с помощью тромбина и хлорида кальция. Стенки сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ путем погружения пропитывали полученным раствором фибриногена. Далее на поверхность сосудистых протезов наносили раствор тромбина 500 IU/мл (Thrombin from human plasma, T7009, Sigma-Aldrich, США) и CaCl₂ 40 ммоль/л (Sigma-Aldrich, США) для полимеризации фибрина. Для сохранения просвета протеза свободным от фибрина перед полимеризацией во внутренний канал помещали тефлоновую спицу диаметром 3,5 мм. После полимеризации сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин погружали в ФСБ с ε-аминокапроновой кислотой 2 мг/мл (Гортекс, Россия) до последующего заселения клетками [14].

2.5.3 Исследование метаболической активности колониеформирующих эндотелиальных клеток на различных белковых матрицах

Метаболическая активность ЭК исследована с помощью МТТ-теста. Для этого проводили покрытие лунок 96-луночного планшета коллагеном I типа 5 мкг/см² (Gibco, США), фибронектином 5 мкг/см² (Sigma-Aldrich, США) и фибрином с концентрацией фибриногена 30 мг/мл (n=6 для каждого вида покрытия). В каждую подготовленную лунку вносили КФЭК в количестве 5×10³. Контролем служили заселенные ЭК лунки без покрытия (n=6). Для исключения влияния белкового покрытия на оптическую плотность (ОП) дополнительно заливали лунки (n=3) с каждым видом белка и последующим проведением всех манипуляций культивирования, но без клеток. Культивирование КФЭК проводили в течение 3 суток в полной питательной среде EGM-2MV с

добавлением 5 % ФБС. После окончания срока культивирования выполняли МТТ-тест с помощью набора МТТ Assay Kit (abcam, Великобритания) по протоколу производителя. Считывание результатов проводили на анализаторе Униплан (Пикон, Россия) при λ 595/650 нм.

Для каждого образца рассчитывали значение Δ ОП по формуле (2):

$$\Delta\text{ОП} = \text{ОПК} - \text{ОПбк} \quad (2),$$

где, ОПк – оптическая плотность клеточного образца, ОПбк – средняя оптическая плотность соответствующих бесклеточных образцов.

2.5.4 Физико-механические испытания

Сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ (n=6), ПГБВ/ПКЛ/коллаген (n=6) и ПГБВ/ПКЛ/фибрин (n=6) в виде трубок подвергались одноосному растяжению во влажном состоянии для надлежащей оценки уникальных свойств гидрогеля в составе сосудистых протезов согласно стандарту ГОСТ Р ИСО 7198-2013. Контрольную группу составили сегменты внутренней грудной артерии, которая является клинически одобренным шунтом для проведения операций АКШ [196]. Образцы внутренней грудной артерии (n=6) забирали во время проведения операции АКШ у пациентов, ознакомленных с протоколом добровольного информированного согласия на забор материала. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Изучение механических основным физико-механическим свойств, таких как предел прочности (МПа), относительное удлинение (%) и модуль Юнга (Мпа) проводили на универсальной испытательной машине серии Zwick/Roell (Zwick Roell Group, Германия) с применением усиления 50 Н, скорость перемещения траверсы 50 мм/мин.

2.5.5 Изучение структуры поверхности сосудистых протезов с помощью сканирующей электронной микроскопии

Структуру внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ диаметром 4 мм до и после модифицирования, а также после заселения клетками ($n=6$ в каждой группе) исследовали на микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума. Подготовка образцов заключалась в фиксации в 2 % растворе глутарового альдегида в течение 24 часов с постфиксацией в 1 % растворе OsO₄, после чего снова промывали ФСБ и обезвоживали в серии спиртов с восходящей концентрацией от 30 % до 100 % в течение 15 минут в каждой с последующим досушиванием при комнатной температуре. После этого образцы монтировали на специальные столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее золото-паладиевое покрытие толщиной 7 нм на установке EM CE200 (Leica Mikro-systeme GmbH, Австрия) [14].

2.6 Формирование эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока

2.6.1 Подготовка сосудистых протезов и заселение эндотелиальными клетками

Система пульсирующего биореактора Harvard (Harvard Apparatus, США) включала в себя три основных компонента: перильстатический насос Harvard Rodent Blood Pump model 1407 (Harvard Apparatus, США) (1). В основе работы насоса лежит шаровой клапанный механизм, который имитирует систолу и диастолу сердечных сокращений и генерируют пульсирующий поток с заданной частотой и объемом выброса; перфузионная культуральная камера (2), в которую устанавливался сосудистый протез; сборочный контейнер (3) для отвода и возврата культуральной среды к насосу (рисунок 1). Культуральная камера и

контейнер для отвода и возврата культуральной среды размещали в CO₂ - инкубаторе при 37°C и 5 % CO₂.

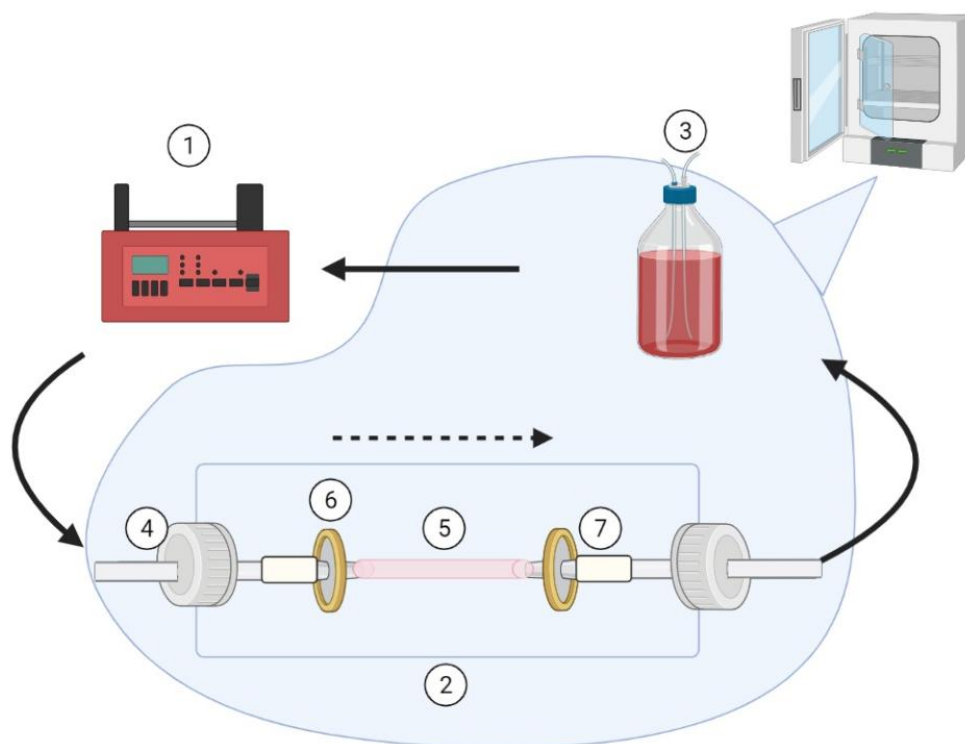


Рисунок 1 – Схема системы пульсирующего биореактора: 1 – перильстатический насос, 2 – перфузионная культуральная камера, 3 – стеклянные трубки, соединяющие сосудистый протез и контур, 5 – место размещения сосудистого протеза, 6 – коннекторы, 7 – отрезок силиконовой трубки

Культуральная камера представлена внутренним продолжением контура и внешним цилиндром – рубашкой. Внутренняя часть камеры представлена 2 стеклянными трубками (4), между которыми закреплен сосудистый протез (5) посредством коннекторов (6). Чтобы добиться плотного прилегания без нарушения целостности контура протез на коннектор закрепляли с использованием хирургических нитей. Коннектор крепили к стеклянной трубке отрезком силиконовой трубки (7). Далее стеклянные трубки соединяли с контуром.

Для сохранности культуры ЭК первым этапом в культуральной камере фиксировали протез, затем проводили заселение клетками.

В просвет сосудистых протезов вводили суспензию эндотелиальных клеток в количестве 700 тыс/мл до полного заполнения внутреннего канала протеза. Для равномерного раасселения клеток по поверхности первые 8 часов после заполнения клеточной суспензией протезы переворачивали каждые 30 мин. Через сутки проводили замену культуральной среды [16].

Общее время культивирования протезов в статических условиях составило 2 суток. После этого заселенные сосудистые протезы подключали в систему пульсирующего биореактора и культивировали на предварительных настройках, обеспечивающих напряжение в $1,27 \text{ дин/см}^2$ в течение суток [14].

Затем постепенно увеличивали напряжение, доводя до показателей рабочего режима (режим 1): объем выброса 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – $2,85 \text{ дин/см}^2$. В таком режиме культивировали еще 5 суток. Группу сравнения составили аналогичные сосудистые протезы, культивируемые в статических условиях в аналогичный по продолжительности промежуток времени с заменой культуральной среды дважды в сутки [16].

Тестовый режим (режим 2) культивирования был выполнен с целью оценки устойчивости адгезированных клеток к повышению напряжения сдвига до $5,74 \text{ дин/см}^2$. Параметры тестового режима были следующие: объем выброса – 1,0 мл; частота выброса – 30 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – $5,74 \text{ дин/см}^2$ [14].

Для обозначения условий культивирования использовали следующие термины: культивирование в условиях пульсирующего потока – «динамика», «динамическое культивирование», «динамическая среда», культивирование в статических условиях – «статика», «статическая среда», «статическое культивирование».

2.6.2 Оценка количества и жизнеспособности эндотелиальных клеток, заселенных на внутреннюю поверхность сосудистых протезов с коллагеном и фибрином в статических условиях и в условиях пульсирующего потока

Выполнена оценка количества и жизнеспособности КФЭК, заселенных на внутреннюю поверхность протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген и ПГБВ/ПКЛ/фибрин в статических условиях и в условиях пульсирующего потока. Проведено сочетанное окрашивание КФЭК ядерными красителями Hoechst и бромистым этидием (EtBr). Первым этапом клетки окрашивали Hoechst 33342 (14533, Sigma Aldrich, США) в концентрации 2 мкг/мл в течение 10 минут, затем вносили 10 мкг/мл этидиум бромида (46067, Sigma Aldrich, США) инкубировали 1 минуту с последующей трехкратной отмывкой ФСБ. Образцы окрашенных сосудистых протезов анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Германия) в 10 случайных полях зрения при х 200 увеличении. Полученные результаты пересчитывали и представляли как кл/мм² [14].

Жизнеспособность клеток (ЖК) вычисляли по формуле (3):

$$\text{ЖК (\%)} = \frac{\text{количество живых клеток}}{\text{общее количество клеток}} \times 100 \% \quad (3),$$

Также с помощью флуоресцентной микроскопии исследовали жизнеспособность КФЭК на внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген на разных сроках культивирования (7, 14 и 21 сутки) в статических условиях. Для определения продолжительности культивирования проводили аналогичное окрашивание Hoechst 33342 и бромистым этидием, по описанной выше методике.

2.6.3 Исследование фенотипа и секреторной активности эндотелиальных клеток, заселенных на поверхность полимерных сосудистых протезов с коллагеном и фибрином

Для исследования фенотипа, секреторной активности и способности к адгезии эндотелиальных клеток, заселенных на внутреннюю поверхность полимерных сосудистых протезов, проводили иммунофлуоресцентное окрашивание. Протез фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в течение 10 мин, затем разрезали вдоль и фиксировали в раскрытом состоянии на предметных стеклах внутренней поверхностью вверх. Клетки на внутренней поверхности сосудистых протезов окрашивали на маркеры эндотелиальных клеток: CD31, VEGFR2, CD144, vWF, маркер адгезии F-actin и на коллаген IV типа. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (vWF, F-actin) проводили пермеабиллизацию 0,01 % раствором Triton X-100. На F-actin окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor 568 Phalloidin, A12380, Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для остальных маркеров использовали первичные антитела: Mouse anti-CD31 (ab119339), Rabbit anti-VEGFR2 (ab2349), Rabbit anti-CD144 (ab33168), Sheep anti-vWF – FITC (ab8822), Rabbit anti-CollagenIV (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, США). Инкубацию с первичными антителами производили при 4°C в течение 16 часов, с вторичными – при комнатной температуре в течение часа. Для блокировки неспецифического связывания использовали раствор 1 % бычьего сывороточного альбумина. Образцы докрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). Готовые стекла заключали в ProLong (Life technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Дополнительно проводили анализ на плотность заселения поверхности сосудистых протезов клетками. На препаратах, окрашенных DAPI, подсчитывали

количество ядер в поле зрения, анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении $\times 20$. Полученные результаты пересчитывали и представляли, как ед/мм² [14].

2.7 Сравнительная оценка тромборезистентности сосудистых протезов

Тромборезистентность биodeградируемых сосудистых протезов была изучена до и после модифицирования фибрином. Настоящее исследование проводили согласно международным стандартам ISO 10993, в частности ISO 10993-4 [101]. Для исследования из свежей донорской цитратной крови путем центрифугирования получали обогащенную (ОТП) и бедную тромбоцитами плазму (БТП). В качестве положительного контроля использовали интактную ОТП. Время инкубации исследуемых образцов составило 3 мин. Измерения проводили как в спонтанном режиме, так и с индуктором агрегации тромбоцитов – аденозин 5'-дифосфатом (АДФ). Соотношение индуктора и ОТП составило 25 мкл + 250 мкл соответственно. Измерение степени агрегации осуществляли с помощью анализатора агрегации тромбоцитов – 4004 (АРАСТ, Германия) [5].

Поверхность исследуемых образцов до и после контактирования с тромбоцитами изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума, при ускоряющем напряжении 5 кВ [5].

Для оценки степени адгезии тромбоцитов и степени деформации адгезированных тромбоцитов образцы ($n=3$) размером 0,5 см² инкубировали в течение 2 ч при 37°C в 300 мкл обогащенной тромбоцитами плазме. Исследуемые образцы отмывали ФСБ с целью удаления неадгезированных компонентов плазмы [5].

Все образцы после контакта с кровью фиксировали в растворе в 2 % растворе глутарового альдегида с постфиксацией в 1 % растворе OsO₄, после чего снова промывали ФСБ и дегидратировали в серии спиртов с восходящей концентрацией от 30 % до 100 % в течение 15 минут в каждом с последующим

досушиванием при комнатной температуре. Затем образцы монтировали на специальные столики с помощью углеродного скотча и на их поверхности формировали токопроводящее золото-паладиевое покрытие при помощи вакуумной установки EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия). Для исследования использовали 8 полей, выбранных случайным образом. Адгезивную способность поверхности материалов оценивали по индексу деформации тромбоцитов, который рассчитывали по формуле (4) [5, 101]:

$$\text{ИД} = \frac{n \text{ I типа} \times 1 + n \text{ II типа} \times 2 + n \text{ III типа} \times 3 + n \text{ IV типа} \times 4 + n \text{ V типа} \times 5}{\text{общее } n} \quad (4),$$

где ИД – индекс деформации тромбоцитов, n – количество тромбоцитов.

Степени деформации тромбоцитов:

I – Тромбоцит дискообразной формы, недеформированный,

II – Тромбоцит увеличен в размере с зачатками псевдоподий в виде выпячиваний,

III – Тромбоцит значительно увеличен в размере, неправильной формы, с ярко-выраженными псевдоподиями, скопления тромбоцитов,

IV – Распластывание тромбоцита, цитоплазма распространяется между псевдоподиями,

V – Тромбоцит в виде пятна с гранулами, за счет распространения цитоплазмы псевдоподии не могут быть идентифицированы [5].

2.8 Полнотранскриптомное секвенирование рибонуклеиновой кистоты эндотелиальных клеток

Полнотранскриптомное секвенирование РНК (RNA-seq) культур КФЭК, HCAEC и HUVEC, культивированных в статических и динамических условиях, проведено на базе ЦКП «Геномика» (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск). Клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, лизировали тризолом (15596018, Invitrogen, Thermo

Fisher Scientific, США) и выделяли тотальную рибонуклеиновую кислоту (РНК) с использованием набора Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen, США) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich, США) [4, 14]. Проверку качества РНК выполнили с использованием набора RNA 6000 Pico Kit (5067–1513, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США), ориентируясь на индекс целостности РНК (RNA integrity number, RIN). Оценку количества выделенной РНК осуществляли спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и флуорометре Qubit 4 (Invitrogen, США). Деплецию рРНК проводили с использованием набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen, США) и дальнейшим формированием ДНК-библиотек с помощью набора SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit (042.96, Lexogen, США). Для каждого образца РНК использовался определенный баркод. Качество полученных ДНК-библиотек анализировали с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067–4626, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). Концентрацию ДНК-библиотек определяли посредством количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). В дальнейшем ДНК-библиотеки смешивались эквимолярно и секвенировались на платформе HiSeq 2000 (Illumina, США) с длиной парно-концевых прочтений 2×125 нуклеотидов. Полученные прочтения фильтровали по качеству ($QV > 20$), длине (> 20), с удалением адаптерных последовательностей в программе TrimGalore v.0.4.4 (Vabraham Bioinformatics, Vabraham Institute, Великобритания). Итоговое среднее количество ридов превысило 10 млн. Их картирование на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проведено в программе CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: Similarity fraction=0.8, Length fraction=0.8, Mismatch cost=2, Insertion cost=3, Deletion cost=3; в итоге получены файлы в формате «.bam». Для оценки дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) использован мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели [4, 14].

2.9 Протеомное профилирование эндотелиальных клеток

Культуры КФЭК, HCAEC и HUVEC (по 2 планшета 75 см² на группу) отмывали от питательной среды ледяным ФСБ, клетки лизировали буфером RIPA (89901, Thermo Scientific, США) и измеряли общую концентрацию белка с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Scientific, США). Образцы белка (15 мкг на образец) смешивали с буфером для образцов NuPAGE LDS (NP0008, Invitrogen, США) и восстанавливающим агентом для образцов NuPAGE (NP0004, Invitrogen, США), денатурировали при 99°C в течение 5 минут, загружали в 10-луночный гель NuPAGE 4-12 % Bis-Tris толщиной 1,5 мм (NP0335, Invitrogen, США). Разделение белков проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в буфере NuPAGE MES SDS (NP000202, Invitrogen, США), содержащем антиоксидант NuPAGE (NP0005, Invitrogen, США), при 150 В в течение 1,5 часов. Смесь 1:1 предварительно окрашенного белкового стандарта Novex Sharp (LC5800, Invitrogen, США), смешанного с MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602, Invitrogen, США), использовали в качестве маркера размера молекулярной массы [4].

Перенос сухого белка проводили по стандартному 7-минутному протоколу с использованием поливинилиденфторида iBlot 2 Transfer Stacks (IB24001, Invitrogen, США) и устройства для переноса геля iBlot 2 (Invitrogen, США). Затем мембраны инкубировали в блокирующем растворе iBind Flex (SLF2020×4, Invitrogen, США) в течение 2 часов, а затем обрабатывали в iBind Western Device (Invitrogen, США) в течение ночи с рекомендованными первичными и вторичными разведениями антител (раствор iBind Flex). Были использованы следующие первичные антитела: мышинные анти-CD31 (ab9498, Abcam, 1:1000), кроличьи анти-VE-кадгерин (36-1900, Invitrogen, 1:100), кроличьи анти-vWF (ab6994, Abcam, 1:500), кроличьи анти-VEGFR2/KDR (ab39256, Abcam, 1:1000), кроличьи анти-CD34 (ab81289, Abcam, 1:1000), кроличьи анти-нейропипин 1 (ab81321, Abcam, 1:1000), кроличьи антитела-HEY2 (ab221931, Abcam, 1:200),

мышинное антитело против NR2F2/COUP-TFII (ab41859, Abcam, 1:200), кроличьи анти-LYVE1 (ab14917, Abcam, 1:200), кроличьи анти-VEGFR3 (ab27278, Abcam, 1:100), кроличьи антитела против Snail+Slug (ab180714, Abcam, 1:500), мышинные антитела против N-кадгерина (MA5-15633, Invitrogen, 1:500) и козий анти- β -тубулин (контроль нагрузки, ab21057, Abcam, 1:1000). Конъюгированные с пероксидазой хрена козы антимышинные (AP130P, Sigma-Aldrich, 1:1000), козы антикроличьи (7074S, Cell Signaling Technology, 1:200) или ослиные антимышинные (ab205723, Abcam, 1:400) были использованы в качестве вторичных антител. Детектирование хемилюминесценции проводили путем инкубации мембраны в хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Scientific, США) в течение 1 мин с последующей 12-минутной экспозицией в сканере блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Денситометрию полученных данных проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health) [4].

Для дот-блоттинга выделяли белок аналогично с помощью RIPA-буфера (89901, Thermo Scientific, США). Анализ 55 секретлируемых белков, связанных с ангиогенезом, выполняли с использованием профилей протеомных массивов ангиогенеза человека (ARY007, R&D Systems, США), поставляемым с набором для анализа (Human Angiogenesis Array Kit, ARY007, R&D Systems, США), в соответствии с протоколом производителя [4].

2.10 Статистические методы анализа данных

Статистический анализ проводили в программах «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Характер распределения в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Данные, имеющие нормальное распределение, представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$), а в случае распределения отличного от нормального – в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (25 %; 75 %). Статистическую значимость различий между двумя независимыми

группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для определения присутствия различий при сравнении трех и более независимых групп использовали критерий Краслела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Значения $p < 0,05$ признавали статистически значимыми.

Статистически значимые различия ДЭГ оценивали по кратности изменения ≥ 2 и скорректированному с учетом средней доли ложных отклонений гипотез (False discovery rate, FDR) значению $p < 0,05$. Анализ обогащения набора генов на основе «Gene Ontology» выполнен в категориях молекулярных функций (Molecular function), биологических процессов (Biological process) и клеточных компонентов (Cellular component) с использованием Gene Set Test в CLC GW. Учитывались категории с поддержкой достоверности $p < 0,05$ (FDR) и отношением ДЭГ к общему количеству генов более 50 % [14].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ АУТОЛОГИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

При попытке выделить прогениторные клетки из мононуклеарной фракции крови периферической крови пациентов с ИБС и получить культуру эндотелиальных клеток с высоким пролиферативным потенциалом в количестве, достаточном для формирования эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности сосудистого протеза, был использован протокол Kolbe M. и соавторов (2010) [74]. Данный протокол культивирования клеток предусматривает посев МНФ на коллаген с последующим пассированием на поверхность, покрытую фибронектином. Однако данный протокол оказался малоэффективным в плане получения большого количества колоний и, как следствие, недостаточное количество получаемых из них ЭК.

Основанием для адаптации протокола явились работы, подтверждающие значение белкового покрытия для стимулирования дифференцировки предшественников эндотелиальных клеток различной степени зрелости. Показано, что фибронектин лучше использовать для поддержания дифференцировки культивируемой мононуклеарной фракции периферической крови в ранние ЭПК, а коллаген – для дифференцировки МНФ в КФЭК [42, 119]. При этом понятно, что чем больше в процессе культивирования МНФ крови будет получено ЭПК, тем больше в итоге получится нарастить клеточной массы КФЭК.

Адаптированный нами протокол основан на высаживании МНФ периферической крови сразу на фибронектин, минуя высев на коллаген. Также был включен этап раннего пассирования первых колоний на ранней стадии ведения культуры – через 7 суток культивирования МНФ периферической крови, что позволило улучшить рост пересейанных колоний за счет отсутствия соседства с клетками МНФ крови, не способными к дифференцировке в эндотелиальном направлении. Таким

образом, осуществлена ранняя селекция пролиферирующих ЭПК и индуцирование деления частично дифференцированных клеток, с последующим их преобразованием до состояния предшественников. Правомерность и эффективность подобного преобразования протокола Kolbe M и коллег (2010) косвенно подтверждают исследования Colombo E. с соавторами (2013), в котором также доказано значение фидерного слоя из фибронектина в стимуляции раннего появления колоний [50]. Было показано, что фибронектин в качестве субстрата способствовал более раннему появлению колоний КФЭК (из МНФ периферической венозной крови на EGM-2), чем коллаген. Колонии КФЭК от здоровых доноров, чьи МНФ были высеяны на фибронектин, появлялись на несколько дней раньше, чем колонии, высеянные на коллаген 1 типа ($16,6 \pm 1,7$ дня против $23,1 \pm 1,4$ дня, $p = 0,009$). Таким образом, фибронектин поддерживает изоляцию колоний КФЭК более эффективно, чем коллаген, тогда как коллаген в качестве субстрата был более эффективен в плане поддержания продолженного роста клеток КФЭК [50].

3.1 Прогнозирование итогов культивирования на этапе получения крови или моноклеарной фракции

С помощью проточной цитометрии исследована возможность прогнозирования итогов культивирования на этапе получения крови или МНФ. Для этого в цельной крови и выделенной на градиенте МНФ изучены популяции клеток, описанные в литературе как предшественники КФЭК или ЭПК. Проведена детекция клеток с фенотипом: CD34+ (относительное количество (%)) среди лимфоцитов), CD34+CD45- (% среди CD34+), CD34+45-133+, CD34+45-146+, CD34+45-CD309+ (% среди CD34+CD45-); и предшественников КФЭК с фенотипом: CD34+45-146+133- (% среди CD34+CD45-). Данные фенотипирования сгруппированы в соответствии с результатами культивирования (получены

или нет колонии) (таблица 2), Анализ не выявил связи между результатами культивирования и относительным содержанием изучаемых популяций клеток в материале. Во всех образцах крови и МНФ нами не обнаружены клетки CD45–34+146+ и CD45–34+133–146+, которые по данным литературы соответствуют фенотипу предшественников КФЭК. Так же не зарегистрирована популяция CD34+45–309+.

Таблица 2 – Относительное количество клеток интереса в мононуклеарной фракции и цельной крови при различных результатах культивирования

Результат	CD34+ Me [25 %; 75 %]		CD34+45– Me [25 %; 75 %]		CD34+45–133+ Me [25 %; 75 %]		CD34+45–146+ Me [25 %; 75 %]		CD34+45–309+ Me [25 %; 75 %]		CD34+45– 146+133– Me [25 %; 75%]	
	МНФ	Цельная кровь	МНФ	Цельная кровь	МНФ	Цельная кровь	МНФ	Цельная кровь	МНФ	Цельная кровь	МНФ	Цельная кровь
отрицательный (n=35)	0,05 [0,03- 0,08]	0,04 [0,03-0,05]	85,9 [73,3- 93,8]	74,2 [65,3-86,5]	59,1 [55,7- 62,5]	50,0 [44,4-70,0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]
положительный (n=21)	0,05 [0,04- 0,08]	0,045 [0,035- 0,06]	86,4 [76,0- 94,6]	66,9 [63,4-69,6]	60,75 [59,3- 62,3]	54,4 [49,3-61,2]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-1,27]	0 [0-0]	0 [0-0]

Примечание: МНФ – мононуклеарная фракция.

3.2 Результаты получения культуры колониоформирующих эндотелиальных клеток на этапе культивирования

Проведено культивирование всех образцов МНФ, полученной в различные точки процедуры ЧКВ или операции АКШ. Из отдельных образцов колонии КФЭК не были получены и, в этом случае, результат считался отрицательным. Из других образцов выделены культуры КФЭК и, в этом случае, результат считался положительным. Полученные культуры в положительных и отрицательных результатах культивирования были схожими и поэтому далее их характеристики представлены общим описанием.

В случае отрицательных результатов на поверхности культурального пластика наблюдали отдельные клетки вытянутой и округлой формы, слабо и частично адгезированные, в некоторых случаях формировались единичные группы полиморфных клеток удлиненной, извитой и округлой формы (рисунок 2 А, В), которые постепенно распадались и исчезали. Результат признавали отрицательным при отсутствии клеток с характерными признаками КФЭК в течение 21 дней культивирования [3, 71].

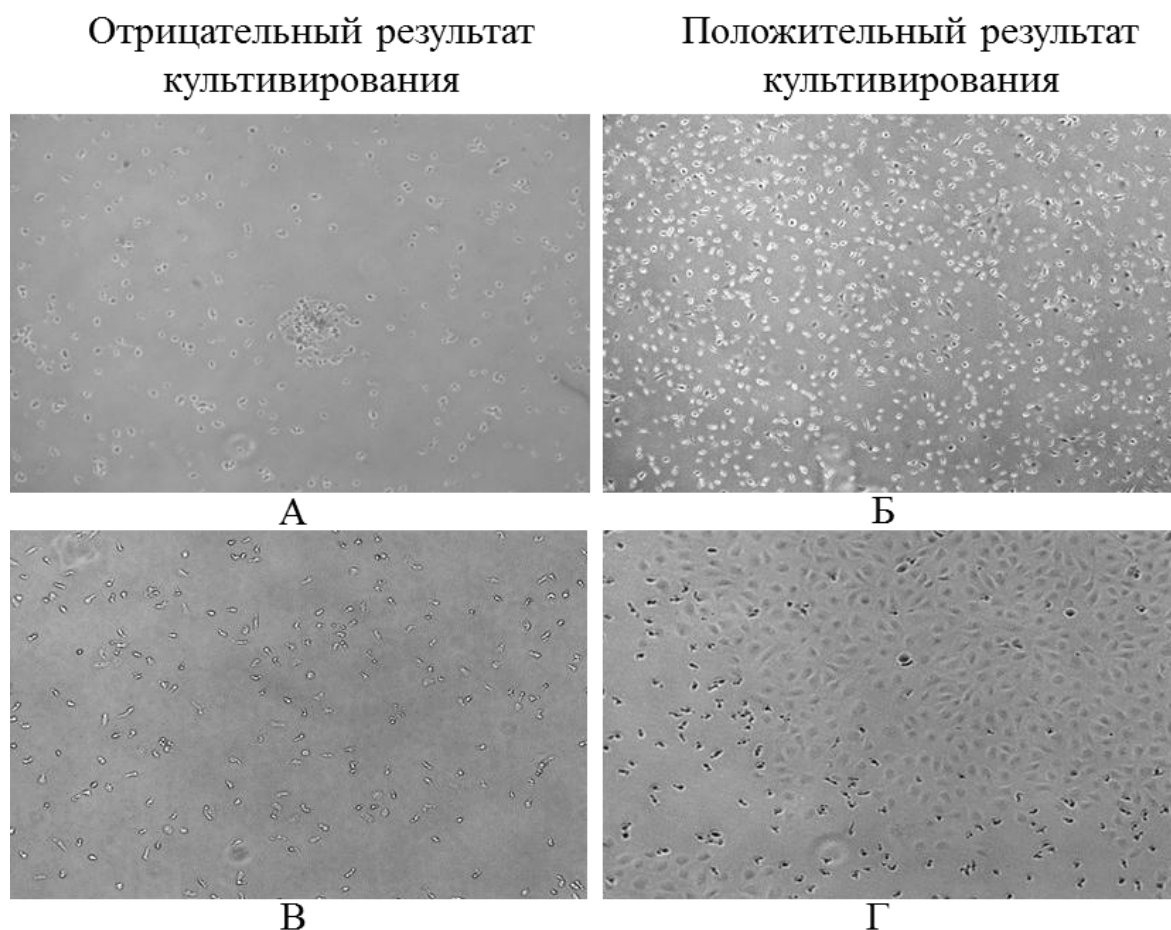


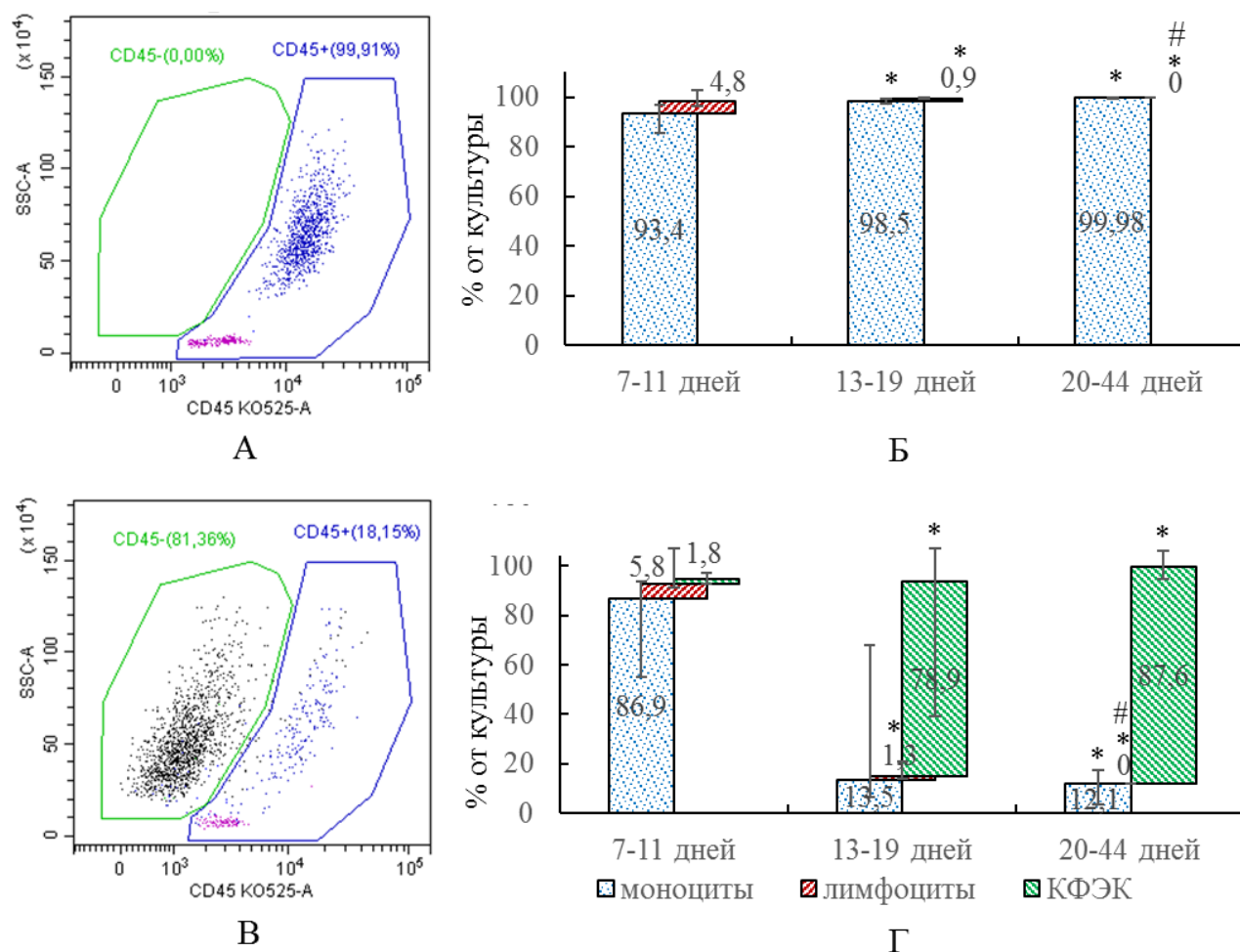
Рисунок 2 – Фазово-контрастная микроскопия культур из мононуклеаров периферической крови пациентов: А, В – отрицательный результат; Б, Г – положительный результат. А, Б – 8 суток культивирования, увеличение x 50; В, Г – 12 суток культивирования, увеличение x 100

В случае положительных результатов, в первые 12 дней культивирования также обнаруживали единичные и группы клеток с аналогичной описанной выше морфологией. Через 10-18 дней зарегистрировано начало образования колоний с типичной морфологией «бульжной мостовой» (рисунок 2 Б, Г). Составляющие их клетки были хорошо адгезированы к пластику (распластаны), имели полигональную и округлую форму. В различных пробах формировались множество или отдельные колонии клеток, которые обладали различной пролиферативной активностью. Пролиферирующие колонии сливались между собой, постепенно вытесняя остальные слабо адгезированные клетки, образовывали 70-80 % монослой (рисунок 2 Г) после чего проводился пассаж культуры [3, 71].

3.3 Результаты фенотипирования

Для идентификации, подтверждения эндотелиальной принадлежности и последующей характеристики чистоты полученной культуры было проведено определение иммунофенотипа на разных сроках культивирования с использованием комбинации маркеров эндотелия различной степени зрелости (ЭПК и зрелого эндотелия) (CD34, CD133, CD31, CD144, KDR, CD146, vWF) и гемопоэтических иммунных клеток (CD3, CD14, HLADR, CD45). В полученной культуре первого пассажа в зависимости от отрицательного или положительного результата определяли одну или две популяции клеток, наиболее показательное разделение наблюдали по SS/CD45 (рисунок 3 А, В) [3, 14, 71].

Каждую популяцию исследовали отдельно по всем описанным выше антигенам. В случае отрицательных результатов культивирования доля популяции CD45+ в культуре составляла 99,6-100 % (таблица 3, рисунок 3 А), в случае положительных результатов ее содержание снижалось в соответствии с экспансией популяции CD45– (таблица 3, рисунок 3 Д). В том и в другом случае на клетках CD45+ отсутствовали эндотелиальные и стволовые антигены (CD146–, CD309–, CD133–, CD34–) (рисунок 3 А), а популяция представляла собой смешанную культуру моноцитов (CD14+) и лимфоцитов (рисунок 3 А, Б). На моноцитах более чем в 50 % экспрессировался HLADR, а лимфоциты в основном (более чем в 85 %) состояли из Т-лимфоцитов (CD3+) (таблица 3). Во всех образцах в процессе культивирования происходило снижение содержания лимфоцитов и после 20 суток культивирования лимфоциты не детектировались. Соответственно, популяция CD45+ после 20 суток состояла из моноцитов, которые, как адгезивные клетки с длительным периодом жизни, в большем или меньшем количестве (в зависимости от темпов роста популяции CD45–) обнаруживались на протяжении всего эксперимента (44 дня) (рисунок 3 Б, Д) [3, 71].



Примечание: * – $p < 0,05$ с одноименным показателем 7-11 дней; # – $p < 0,05$ с одноименным показателем 13-19 дней.

Рисунок 3 – Типичные гистограммы распределения популяций клеток в культуре в зависимости от результатов культивирования (проточная цитометрия): А – отрицательный результат (популяция CD45+), Б – положительный (две популяции CD45+ и CD45–). Состав культур на различных сроках культивирования (%): В – отрицательный результат; Г – положительный результат

Таким образом, популяция CD45+ представляла собой гемопоэтические иммунные клетки моноциты и лимфоциты, а позднее 20 суток культивирования исключительно моноциты.

В случае положительных результатов культивирования наблюдали прогрессивное увеличение относительного содержания популяции CD45– (от 1,8 до 87,6 %) (рисунок 3 Г, зеленый столбик). Популяция CD45– во всех

образцах и временных диапазонах культивирования сохраняла стабильный фенотип и была однородной по составу [3, 71].

Таблица 3 – Состав культур в различные временные точки культивирования

Антигены	Доля клеток (%), несущих исследуемые антигены					
	Отрицательный результат Me [25 %; 75 %]			Положительный результат Me [25 %; 75 %]		
	7-11 сут	13-19 сут	20-44 сут	7-11 сут	13-19 сут	20-44 сут
CD45+	99,9 [99,7-100]	99,6 [99,3-99,9]	99,98 [99,9-100]	95,3 [94,3-98,5]	20,8* [7,2-74,8]	13,3* [3,7-63,6]
CD45+CD14+	93,4 [85,7-96,8]	98,5* [97,3-99,1]	99,98* [99,97-100]	86,9 [55,1-93,8]	13,5* [6,3-68,0]	12,1* [3,7-17,2]
Лимфоциты#	4,8 [3,1-9,4]	0,94* [0-2,2]	0*/**	5,8 [4,2-20,2]	1,3* [0,4-7,3]	0*/**
CD3+ от лимфоцитов#	88,7 [86,7-93,3]	95,4 [93,3-98,8]	-	85,8 [76,3-90,4]	89,4 [81,0-91,5]	-
CD14+ HLADR+	60,3 [52,0-63,9]	58,5 [45,8-60,0]	57,8 [40,5-79,8]	55,1 [41,9-58,6]	58,2 [49,0-67,0]	58,6 [47,5-67,5]
CD45–	0	0	0	1,8 [0,1-4,7]	78,9* [24,7-92,6]	87,6* [82,5-93,9]

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с одноименным показателем 7-11 дней;

** – $p < 0,05$ с одноименным показателем 13-19 дней (проточная цитометрия);

– лимфоциты определяли по параметрам бокового светорассеяния (SS) и прямого светорассеяния (FS).

Клетки CD45– обладали выраженной экспрессией эндотелиального поверхностного антигена CD146 и CD31, умеренной CD309, в 89,9-95,5 % содержали vWF, на их мембране полностью отсутствовал CD133, при этом небольшая часть клеток (0,1-9,1 %) была позитивна по CD34 (таблица 4,

рисунок 4 Б). Популяция CD45– не экспрессировала маркеры гемопоэтических иммунных клеток CD3, CD14, HLADR (рисунок 4 Б). В качестве сравнения представлен фенотип HUVEC, который совпадал с фенотипом культуры, полученной из МНФ крови (таблица 4, рисунок 4 В) [3, 14, 71].

Таблица 4 – Фенотип культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека и популяции CD45– на различных сроках культивирования

Популяция	Время культивирования	CD34	CD309	CD146	CD133	CD31	vWF
		Me [25 %; 75 %]					
CD45–, %	7-11 сут	0,1 [0-2,6]	83,3 [75,0-84,1]	93,7 [88,9-98,3]	0 [0-0,5]	94 [93,6-94,4]	89,9 [85,1-96,5]
	13-19 сут	9,1 [2-26,7]	78,8 [61,8-88,7]	99,6 [97,1-99,9]	0 [0-0,7]	99,2 [98,4-99,9]	95,5 [90,7-98,3]
	20-44 сут	2,2 [0,1-8,9]	60,2 [48,4-68,0]	99,5 [98,7-99,8]	0 [0-0,9]	99,8 [99,1-100]	94,1 [91,6-96,2]
HUVEC, %	35 сут (4 пассаж)	0,1	57,7	99,2	0	99,8	78,4

Прмечание: HUVEC – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека

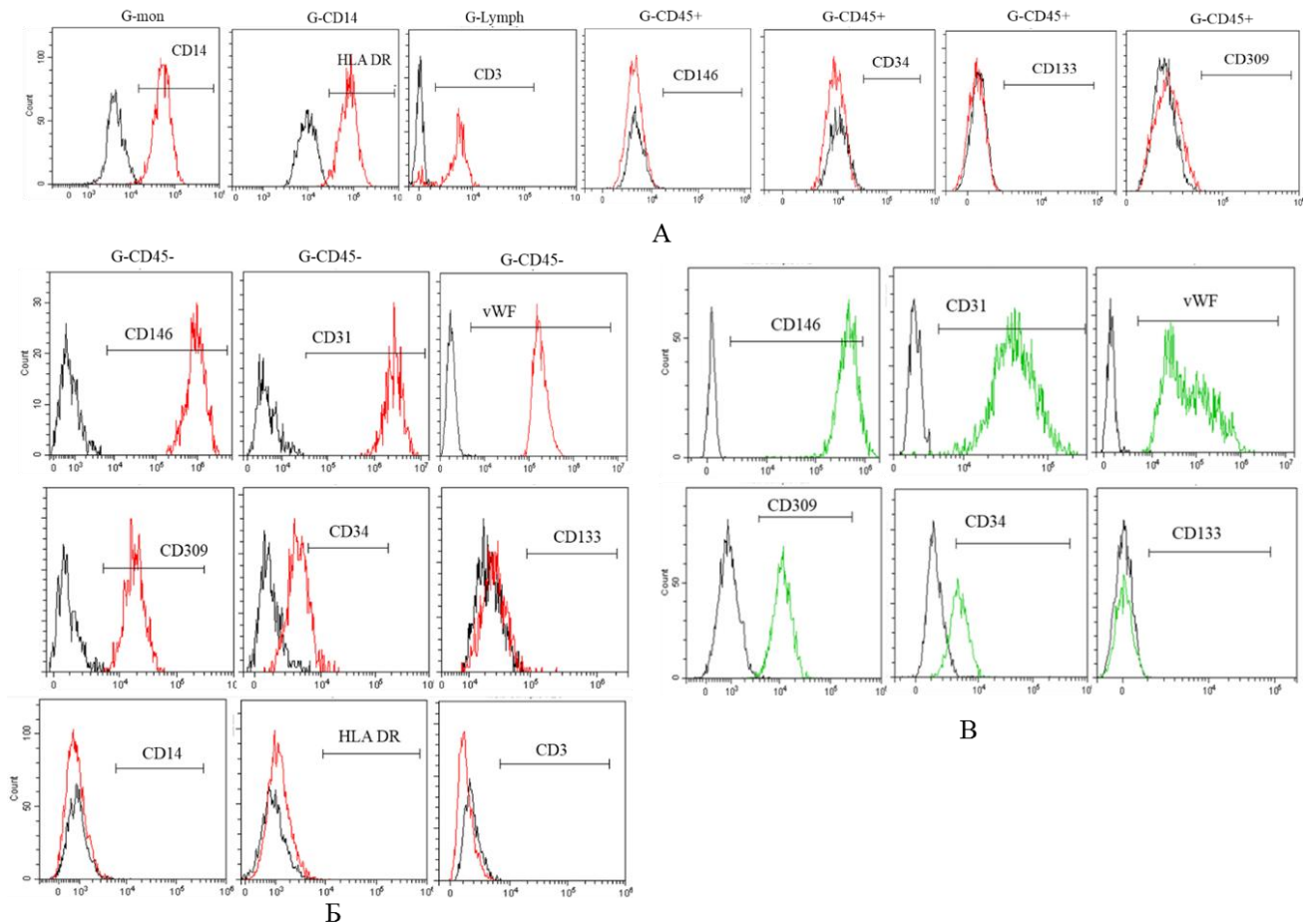


Рисунок 4 – Примеры гистограмм различных антигенов на популяциях (проточная цитометрия): А – CD45+, Б – CD45–, В – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека

3.4 Результаты иммунофлуоресцентного фенотипирования колониеформирующих эндотелиальных клеток

Результаты, полученные при проведении сканирующей лазерной микроскопии, подтвердили результаты проточной цитометрии (рисунок 5). На мембране HUVEC и популяции CD45– ярко детектированы рецепторы CD31 и умеренно CD309, межклеточные контакты хорошо видны по присутствию белка клеточной адгезии CD144, характерного для эндотелия сосудов. Внутри HUVEC и культуры CD45– обнаружены тельца Вейбеля-Паладе (яркое, четко очерченное зеленое свечение), а также диффузные и сетчатые скопления vWF, что подтвердило их способность синтезировать vWF [3, 71].

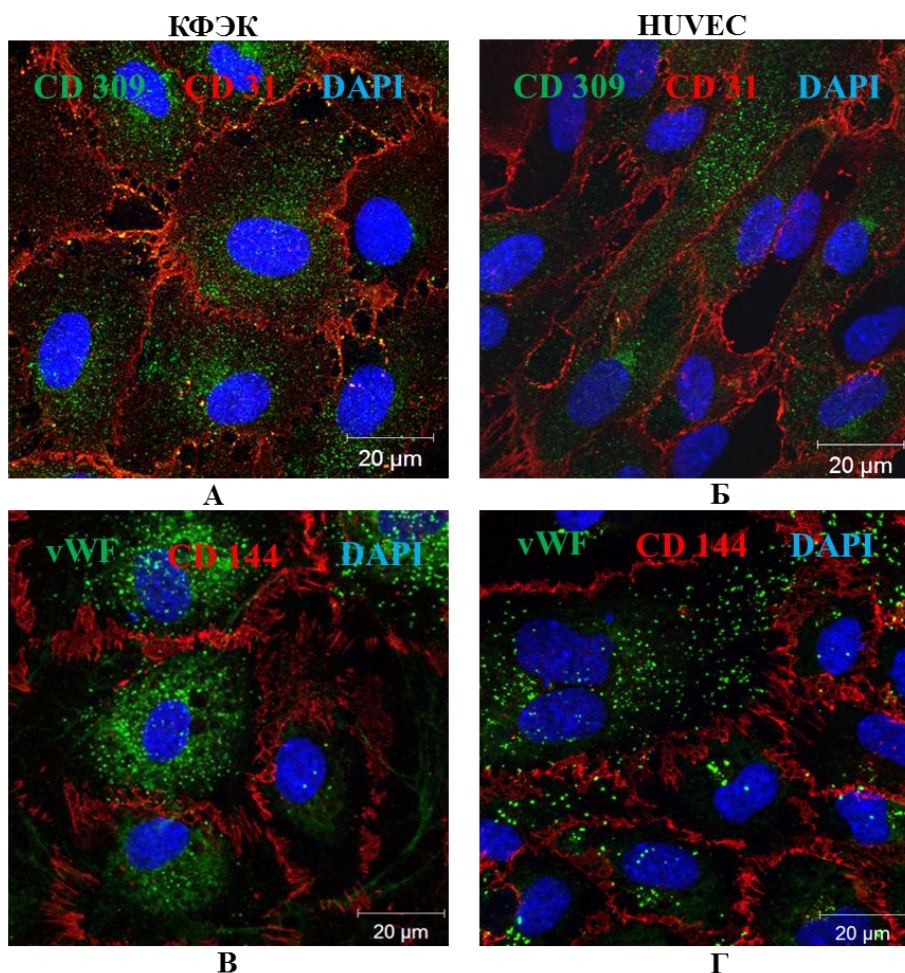


Рисунок 5 – Конфокальная лазерная микроскопия эндотелиальных культур: А, В – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток; Б, Г – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека. А, Б – CD309 (зеленое свечение), CD31 (красное), DAPI (синее); В, Г – vWF (зеленое), CD144 (красное), DAPI (синее), увеличение x 630

Таким образом, колонии CD45– клеток, полученные из МНФ крови пациентов с ИБС, являются КФЭК, поскольку обладали характерной морфологией и стабильным эндотелиальным фенотипом: CD146+CD31+CD144+CD309+vWF+CD34+/-CD133– [3, 71].

Термин «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки (LEPC) [58, 184] менее подходящий для выделенной культуры, поскольку на ней практически отсутствовали прогениторные маркеры (CD133, CD34). При этом нельзя с уверенностью сказать, присутствовали ли данные антигены в начале культивирования [3, 71].

3.5 Способность к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связывание лектина

Данное исследование посвящено изучению способности КФЭК к поглощению ацетилированных липопротеинов низкой плотности (Ac LDL) и связыванию лектина (UEA) для КФЭК в сравнении с HUVEC. В цитоплазме обеих культур определялся Ac LDL (красные гранулы) и на мембране агглютинированный лектин (зеленая окраска), что подтверждает положительный результат теста (рисунок 6). Это явление в литературе описывают как специфичное для эндотелиальных клеток и культур [3, 42, 102, 184]. Однако имеет место другое мнение, утверждающие, что функцией поглощения обладают все фагоциты (нейтрофилы, моноциты, различные виды макрофагов, в том числе и эндотелий) [102], поэтому поглощение Ac LDL демонстрирует лишь фагоцитарную способность эндотелиальных клеток, и данный тест будет положительным для всех фагоцитов [3, 71].

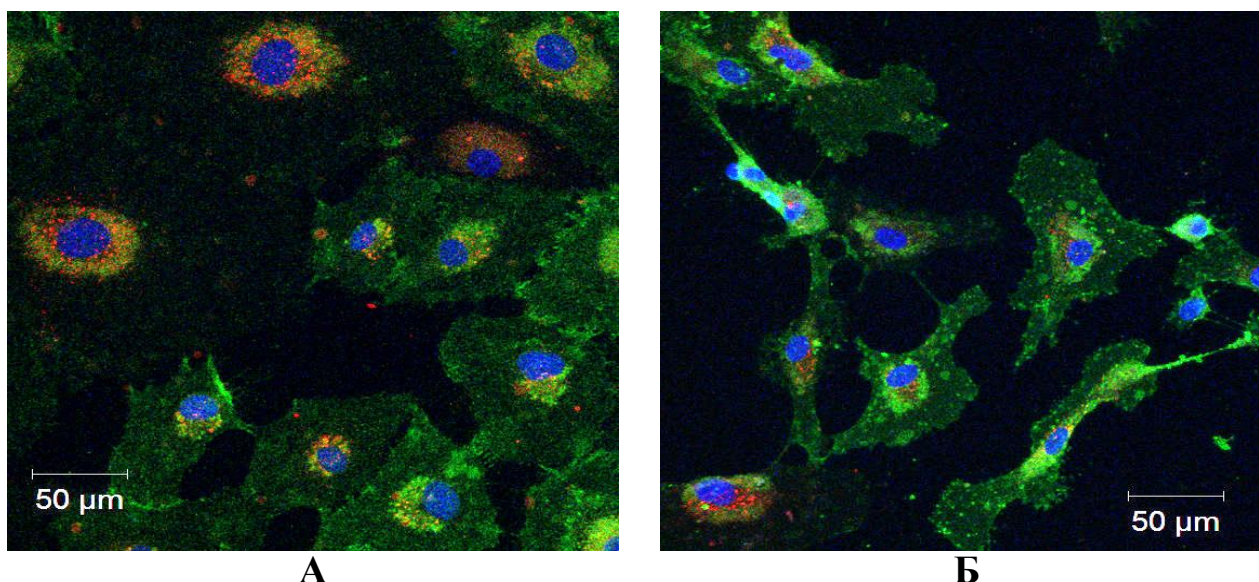


Рисунок 6 – Конфокальная лазерная микроскопия: А – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток; Б – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Сочетанное окрашивание: лектин (зеленое свечение), ацетилированных липопротеинов низкой плотности (красное), DAPI (синее), увеличение x 200

3.6 Исследование ангиогенной активности

Специфичным тестом для эндотелиальных клеток, определяющим ангиогенную активность *in vitro*, по праву считают формирование трубчатых или капиллярноподобных структур на Матригеле [3]. Функциональные нарушения ангиогенеза проявляются в виде плохо сформированных кластеров, трубочек и разрывов сетей. По результатам данного исследования как HUVEC, так и КФЭК на поверхности Матригеля начинали образовывать структуры уже через 4 часа культивирования (рисунок 7). Через 16 часов визуализировались полноценные хорошо оформленные капиллярноподобные структуры в обеих культурах [3].

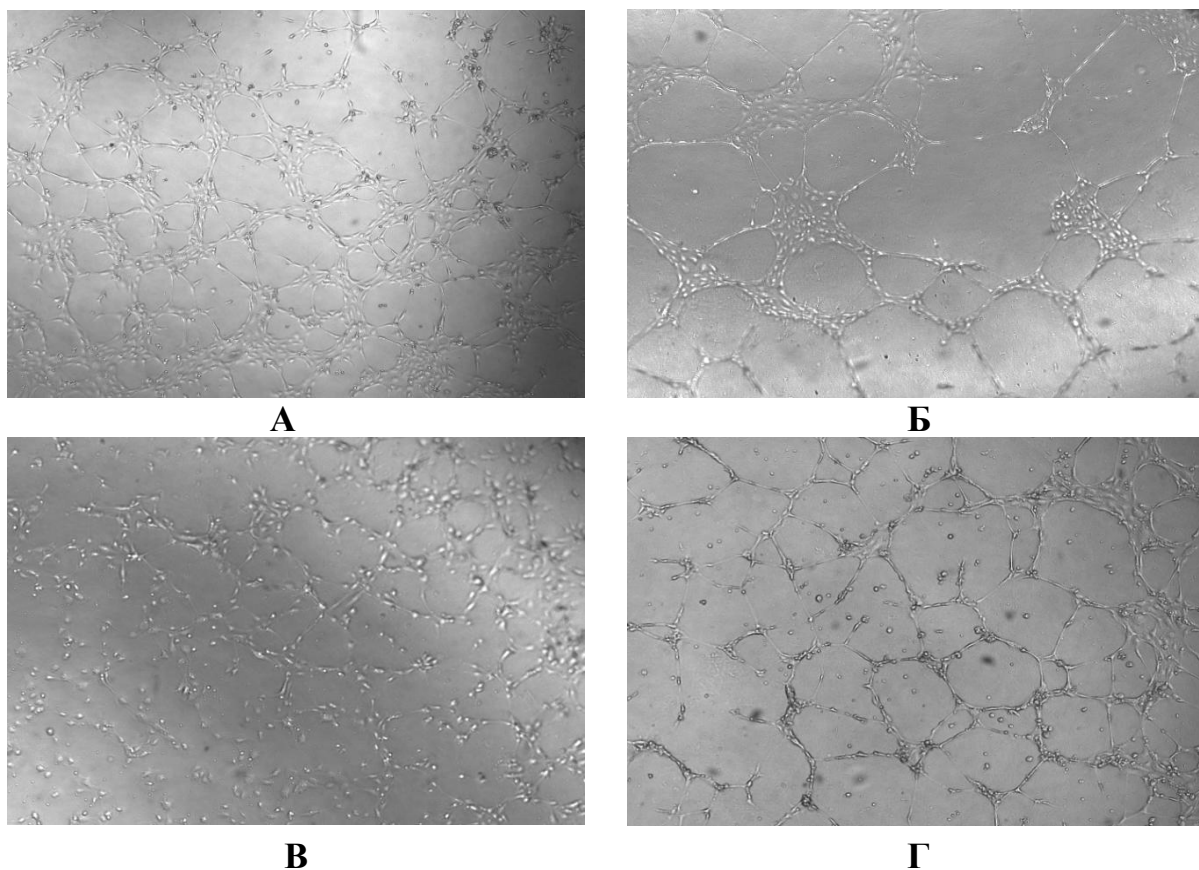
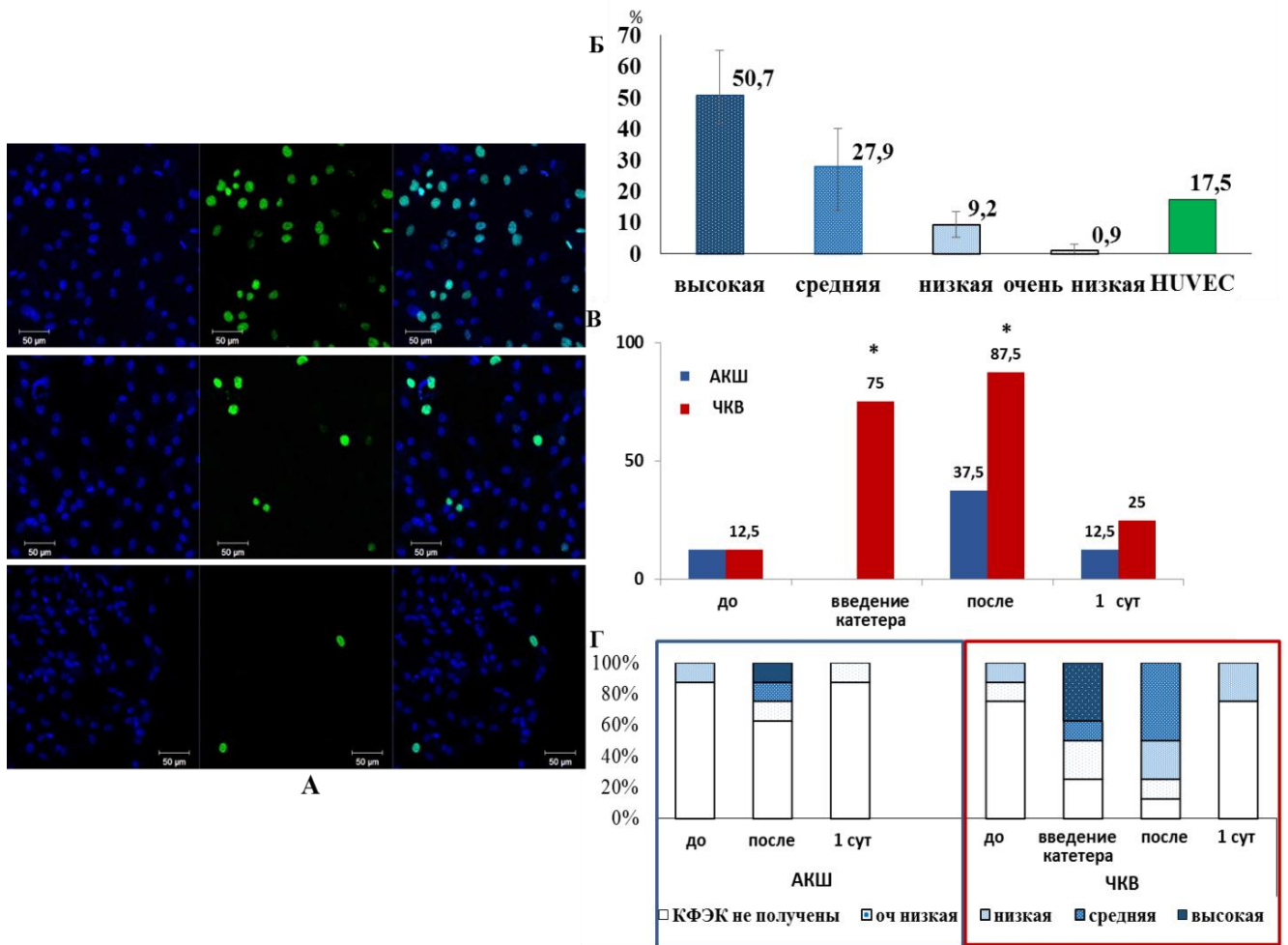


Рисунок 7 – Фазово-контрастная микроскопия эндотелиальных культур на Матригеле: А – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток через 4 часа; Б – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток через 16 часов; В – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека через 4 часа; Г – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека через 16 часов культивирования, увеличение $\times 50$

3.7 Проллиферативная активность

Изучена 6-часовая пролиферативная активность культур КФЭК и HUVES по количеству делящихся ядер. Обнаружено, что культуры КФЭК обладали различной пролиферативной активностью (рисунок 8 А). Эти отличия замечены на этапе культивирования. Часть культур активно пролиферировали и достигали конfluence в течение 3-4 дней. Другим культурам при равных условиях понадобилось больше времени. Также встречались культуры, которые состояли из нескольких клеток и практически не пролиферировали. По относительному количеству пролиферирующих ядер культуры КФЭК условно были разделены на четыре группы: высокой, средней, низкой и очень низкой пролиферативной активности (рисунок 8 Б). В соответствие с этой классификацией пролиферативная активность HUVES 4 пассажа была отнесена к средней.



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

Рисунок 8 – 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

3.8 Результаты культивирования колониеформирующих эндотелиальных клеток в зависимости от типа хирургического вмешательства и времени забора крови

У пациентов, перенесших операцию аорто-коронарного шунтирования, забор крови проводили в трех точках (до, сразу после и через сутки после операции), а у пациентов с ЧКВ в четырех точках (до, после введения катетера, сразу после раздувания баллона и стентирования и через 1 сутки после процедуры). Анализ результатов культивирования в зависимости от времени забора крови выявил общие тенденции (рисунок 8 В). В исходной точке (до процедуры или операции) в каждой группе пациентов культура КФЭК выделена в одном случае, что составило 12,5 %. В группе пациентов, подвергшихся ЧКВ, после введения катетера до раздувания баллона положительные результаты получены в 75 %, а после раздувания баллона и стентирования в 87,5 %, что достоверно превышало количество положительных результатов из крови, забранной до процедуры ЧКВ. Через сутки после процедуры количество успешных результатов снижалось и составило 25 %.

В группе пациентов, перенесших открытую операцию АКШ, сразу после завершения операции зарегистрировано 3 случая получения культуры КФЭК (37,5 %). Через сутки после операции культуру удалось получить только у одного из пациентов (12,5 %). Статистически значимых различий у этой группы пациентов в различных точках не получено.

Результаты культивирования и уровень пролиферативной активности полученных культур КФЭК был рассмотрен в соответствии с точками забора крови у пациентов (рисунок 8 Г).

Колонии с высокой и средней пролиферативной активностью получены из крови, забранной во время процедуры ЧКВ, после введения катетера и после раздувания баллона и стентирования, а у пациентов, перенесших оперативное вмешательство, сразу после завершения операции АКШ. До и через сутки после ЧКВ или АКШ в большинстве случаев КФЭК не получены

либо их пролиферативная активность низкая и крайне низкая. Наибольшее количество положительных результатов культивирования приходится на период непосредственного проведения ЧКВ.

Культуры с крайне низкой пролиферативной активностью были отнесены к отрицательным результатам культивирования (рисунок 3 А), поскольку от них невозможно получить клеточную массу, достаточную для использования в регенеративной медицине.

3.9 Сравнительная оценка базового профиля генной экспрессии

Для полной и объективной оценки базового профиля генной экспрессии КФЭК по сравнению с эндотелиальными клетками коронарной артерии человека (HCAEC) и с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq) вышеуказанных культур. HCAEC дополнительно введена в протокол данного исследования как сертифицированная производителем культура в отличие от культур КФЭК и HUVEC, которые мы получали самостоятельно.

Индекс целостности РНК (RIN) во всех случаях составил более 8, что отражает высокое качество РНК и возможность её использования для анализа RNA-seq (рекомендуемое $RIN \geq 7$). Количество полученной тотальной РНК во всех образцах оказалось достаточным (29 мкг и более) для проведения последующей деплеции рРНК (рекомендуется ≥ 1 мкг). Посредством секвенирования ДНК-библиотек получены парные прочтения длиной 125 нуклеотидов, общий объем которых варьировал в диапазоне 1–4 млрд пар оснований, а покрытие составило 9,5–42,7 млн прочтений. Фильтрация по качеству и длине, лигирование адаптеров не повлияло на количество прочтений. Картирование библиотек подтвердило соответствие образцов геному человека: g38 – в 97,2 % ридов; 82,2–93,2 % прочтений составили экзоны (белок-кодирующие участки генов) [4, 14].

Дифференциально экспрессируемые гены

Исследование набора генов по категории «Функции эндотелия» выявило у культуры КФЭК повышенный уровень экспрессии дифференциально экспрессируемых генов, которые кодируют панэндотелиальные маркеры, такие как рецептор 2 к сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGFR2 (кодируется геном *KDR*) и фактор фон Виллебранда vWF (кодируется одноименным геном *vWF*) в 2,2 и 3,9 раза, соответственно (таблица 5). КФЭК в сравнении с НСАЕС характеризовались гиперэкспрессией генов *COL1A1* и *COL1A2* (в 926 и 43,5 раза соответственно), кодирующих α и β цепи коллагена I типа основного белка ВКМ, а также генов *COL4A1* и *COL4A2* (в 2,5 и 3 раза соответственно), кодирующих α и β цепи коллагена IV типа структурного белка базальной мембраны (таблица 5). Также КФЭК от НСАЕС отличала ожидаемо более высокая экспрессия в 23,9 раза гена *CD34*, который является маркером эндотелиальных прогениторных клеток. Интересно, что у КФЭК относительно НСАЕС выявлена более высокая экспрессия маркеров венозной эндотелиальной спецификации в 7,9 раза (ген *NRP2*) и лимфатической спецификации, представленными маркерами *FLT4* (в 11,6 раза) и *LYVE1* (45,7 раза), которые кодируются одноименными генами *FLT4* и *LYVE1*. В свою очередь, НСАЕС от КФЭК отличала повышенная экспрессия в 523 раза маркера артериальной эндотелиальной спецификации *HEY2*, (кодирует транскрипционный фактор Notch-пути), а также гена *NOS3* в 4,9 раза (кодирует эндотелиальной синтазу азота 3 типа) и гена *FLT1* в 3,9 раза (кодирует VEGFR1) [4].

Сравнительная оценка генной экспрессии КФЭК и HUVEC выявило у КФЭК повышенную экспрессию артериальных маркеров, таких как ген *NOTCH4* в 3,1 раза и ген *DLL2* в 4,1 раза, которые кодируют рецептор и лиганд Notch-пути, а также гиперэкспрессию в 18,7 раза маркера лимфатической спецификации *LYVE1* и гена *COL1A1* в 914 раз. HUVEC от КФЭК отличала повышенная экспрессия генов *KLF4* в 45 раз (кодирует

одноименный эндотелиальный транскрипционный фактор механотрансдукции), *CDH2* в 7,6 раза (кодирует маркер мезенхимальных клеток N-кадгерин) и *VEGF* в 5 раз [4].

Таблица 5 – Дифференциальная экспрессия генов, идентифицированных в культуре колониеформирующих эндотелиальных клеток, по сравнению с культурой эндотелиальных клеток коронарной артерией человека и культурой эндотелиальных клеток пупочной вены человека

Обозначение гена	Кодируемый геном белок	Степень количественного изменения	Кратность изменения	Уровень значимости p-value	Значение частоты ложных обнаружений	Идентификатор гена
<i>COL1A1</i>	Субъединица A1 основного коллагена 1 типа ВКМ	9,855	926,15	$2,586 \times 10^{-5}$	0,004	ENSG00000108821
<i>LYVE1</i>	Маркер лимфатической дифференцировки	5,515	45,74	$7,398 \times 10^{-10}$	$3,400 \times 10^{-7}$	ENSG00000133800
<i>COL1A2</i>	Субъединица A2 основного коллагена 1 типа ВКМ	5,443	43,50	$1,231 \times 10^{-6}$	0,001	ENSG00000164692
<i>CD34</i>	Маркер эндотелиальных прогениторных клеток	4,581	23,94	0	0	ENSG00000174059
<i>FLT4</i>	Маркер лимфатической дифференцировки, кодирует VEGFR3	3,538	11,62	0	0	ENSG00000037280
<i>NRP2</i>	Маркер венозной дифференцировки	2,985	7,92	0	0	ENSG00000118257
<i>VWF</i>	Панэндотелиальный маркер	1,981	3,95	$1,912 \times 10^{-10}$	$1,002 \times 10^{-7}$	ENSG00000110799
<i>BMP4</i>	Костный морфогенетический белок 4, характерен для ЭПК	1,773	3,42	$9,338 \times 10^{-8}$	$2,755 \times 10^{-5}$	ENSG00000125378

Продолжение таблицы 5 – Дифференциальная экспрессия генов, идентифицированных в культуре колониеформирующих эндотелиальных клеток, по сравнению с культурой эндотелиальных клеток коронарной артерией человека и культурой эндотелиальных клеток пупочной вены человека

Обозначение гена	Кодируемый геном белок	Степень количественного изменения	Кратность изменения	Уровень значимости p-value	Значение частоты ложных обнаружений	Идентификатор гена
<i>COL4A2</i>	Субъединица A2 основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена 1 типа	1,562	2,95	$7,74 \times 10^{-13}$	$5,727 \times 10^{-10}$	ENSG00000134871
<i>COL4A1</i>	Субъединица A1 основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена 1 типа	1,293	2,45	$7,96 \times 10^{-10}$	$3,619 \times 10^{-7}$	ENSG00000187498
<i>KDR</i>	Панэндотелиальный маркер, кодирует VEGFR2	1,158	2,23	$4,885 \times 10^{-8}$	$1,568 \times 10^{-5}$	ENSG00000128052
<i>NOTCH2</i>	Маркер артериальной дифференцировки	-1,283	-2,43	$1,867 \times 10^{-6}$	0,0004	ENSG00000134250
<i>FLT1</i>	Рецептор 1 фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR1)	-1,959	-3,89	$3,517 \times 10^{-8}$	$1,155 \times 10^{-5}$	ENSG00000102755
<i>NOS3</i>	Эндотелиальная синтаза азота 3 типа	-2,305	-4,95	$6,46 \times 10^{-14}$	$5,642 \times 10^{-11}$	ENSG00000164867
<i>HEY2</i>	Маркер артериальной дифференцировки	-9,030	-522,91	$4,52 \times 10^{-10}$	$2,169 \times 10^{-7}$	ENSG00000135547
КФЭК в сравнении с HUVEC						
<i>COL1A1</i>	Субъединица A1 основного коллагена 1 типа ВКМ	9,837	914,625	0,0001	0,028	ENSG00000108821
<i>LYVE1</i>	Маркер лимфатической дифференцировки	4,220	18,636	$1,971 \times 10^{-6}$	0,001	ENSG00000133800

Продолжение таблицы 5 – Дифференциальная экспрессия генов, идентифицированных в культуре колониеформирующих эндотелиальных клеток, по сравнению с культурой эндотелиальных клеток коронарной артерией человека и культурой эндотелиальных клеток пупочной вены человека

Обозначение гена	Кодируемый геном белок	Степень количественного изменения	Кратность изменения	Уровень значимости p-value	Значение частоты ложных обнаружений	Идентификатор гена
<i>DLL2</i>	Эндотелиальный маркер, является лигандом NOTCH-пути	2,048	4,14	$5,053 \times 10^{-9}$	$3,678 \times 10^{-6}$	ENSG00000128917
<i>NOTCH4</i>	Маркер артериальной дифференцировки	1,630	3,10	$8,118 \times 10^{-11}$	$9,58 \times 10^{-8}$	ENSG00000204301
<i>VEGFA</i>	Фактор роста эндотелия сосудов А	-2,308	-4,95	$1,289 \times 10^{-5}$	0,004	ENSG00000112715
<i>CDH2</i>	Маркер мезенхимальных клеток N-кадгерин	-2,933	-7,639	$1,138 \times 10^{-5}$	0,004	ENSG00000170558
<i>KLF4</i>	Транскрипционный фактор механотрансдукции	-5,501	-45,286	$2,500 \times 10^{-9}$	$1,864 \times 10^{-6}$	ENSG00000136826

Примечание: ЭПК – эндотелиальные клетки-предшественники, КФЭК – культура колониеформирующих эндотелиальных клеток, НСАЕС – культура эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, HUVES – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека ВКМ – внеклеточный матрикс.

Анализ обогащения терминов Gene Ontology дифференциально экспрессируемых генов

Анализ полученных данных при помощи биоинформатического инструмента Gene Ontology в категории «Молекулярные функции» выявил повышенную экспрессию ДЭГ у КФЭК в сравнении с НСАЕС, которые

кодируют активность рецепторов к сосудистому эндотелиальному фактору роста (4 ДЭГ из 6 относящихся к термину). При сравнении КФЭК с НСАЕС не обнаружено статистически значимых различий среди категорий генов, кодирующих «Клеточные компоненты» и отвечающих за «Биологические процессы» [4].

Кроме того, в дополнении к автоматизированному анализу было проведено мануальное аннотирование дифференциально экспрессированных генов в отношении их функций с позиции «Биологии эндотелия», которое показало, что культуре КФЭК была свойственна гиперэкспрессия 5 дифференциально экспрессируемых генов, ассоциированных с процессом развития сосудов, в то время как, у культуры НСАЕС аналогичных генов не выявлено. Тем не менее, в культуре НСАЕС отмечена более выраженная экспрессия белков, обеспечивающих целостность эндотелиального барьера, чем в культуре КФЭК (15 ДЭГ против 8) [4].

В то же время сравнение набора генов КФЭК и HUVES при проведении мануальной аннотации показало у КФЭК гиперэкспрессию в отношении 19 дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих проангиогенные белки, в то время у HUVES выявлено 6 ДЭГов. Также у КФЭК идентифицировано 4 ДЭГов, способствующих миграции ЭК, в сравнении с 0 повышенных у HUVES [4]. Культура КФЭК экспрессирует маркеры артериальной, венозной и лимфатической дифференцировки, на этом фоне обладая усиленной продукцией коллагена IV и I типа. Вероятно, КФЭК ближе к HUVES (261 ДЭГ), чем к НСАЕС (470 ДЭГ) (рисунок 9). Однако уровень экспрессии генов КФЭК минимально отличался от НСАЕС и HUVES, что делает КФЭК подходящей популяцией для создания тканеинженерных сосудистых протезов [4].

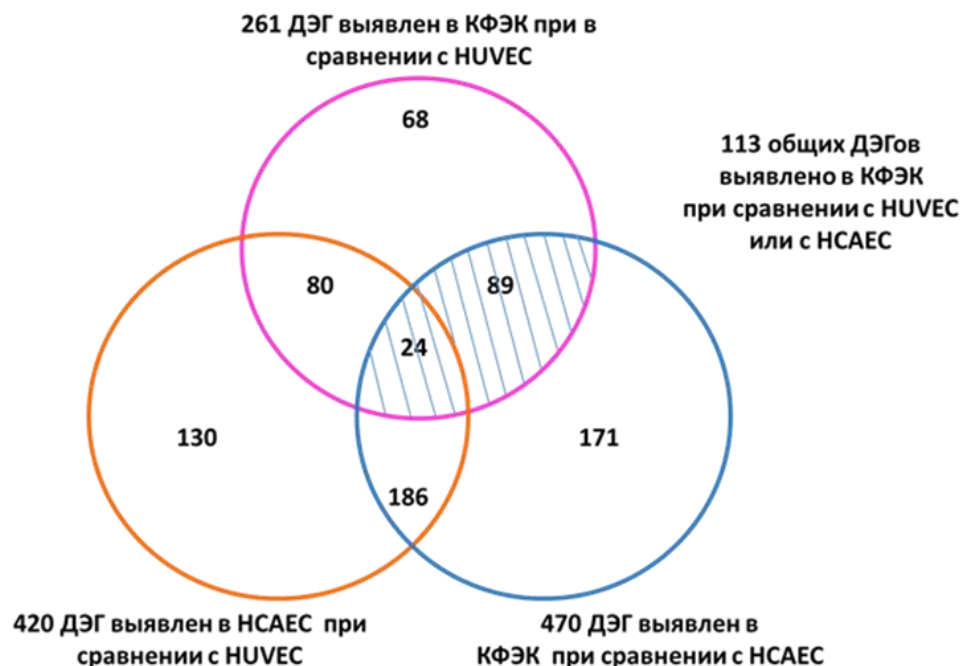


Рисунок 9 – Диаграмма Венна для дифференциально экспрессируемых генов в культурах колониеформирующих эндотелиальных клеток, эндотелиальных клеток пупочной вены человека и эндотелиальных клеток коронарной артерии человека

3.10 Сравнительные результаты протеомного профилирования

Выборочный анализ панэндотелиальных маркеров методом традиционного иммуноблоттинга подтвердил эндотелиальный фенотип КФЭК, характеризующийся высоким уровнем CD31, VE-кадгерина, KDR/CD309, CD34 и нейропилина-1 (NRP1) (рисунок 10). Профиль экспрессии маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода свидетельствовал о переходном фенотипе КФЭК с точки зрения промежуточного уровня маркера артериальной эндотелиальной дифференцировки HEY2, маркеров лимфатической эндотелиальной дифференцировки LYVE1 и VEGFR3 и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода Snail и Slug по сравнению с НСАЕС, которые гиперэкспрессировали HEY2 и HUVEC, которые гиперэкспрессировали маркер венозной эндотелиальной дифференцировки COUP-TFII соответственно [4].

Панэндотелиальные маркеры

Маркеры эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода

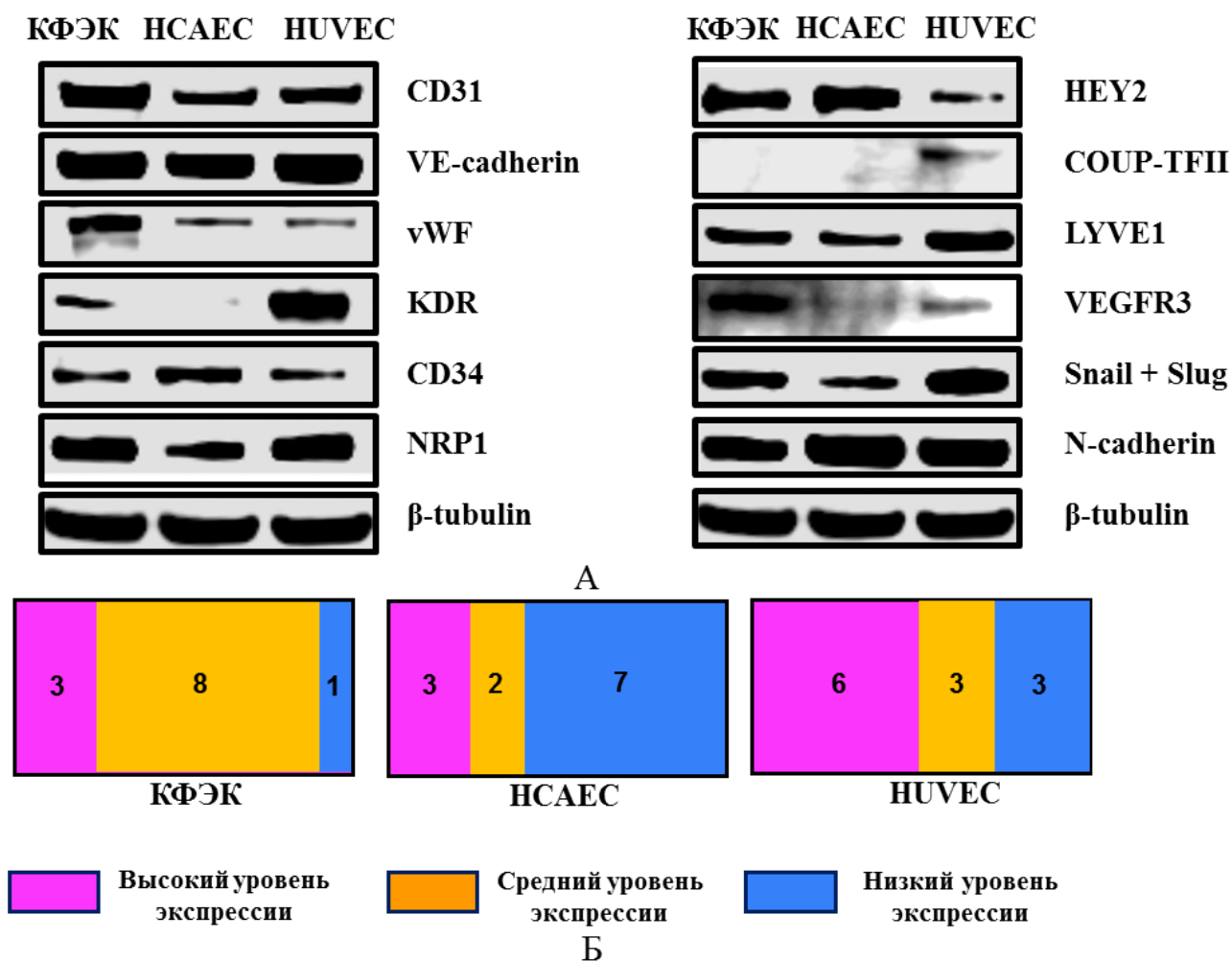
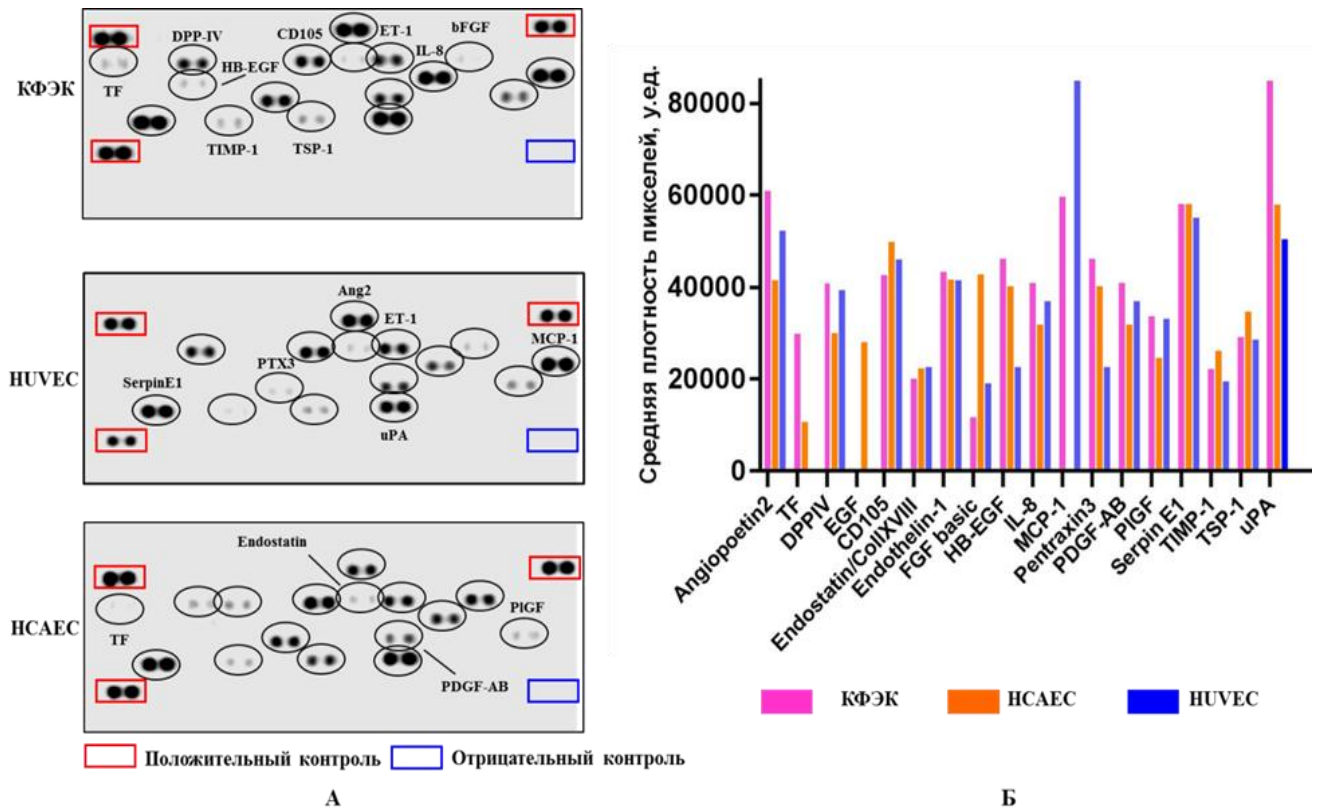


Рисунок 10 – Анализ экспрессии панэндотелиальных маркеров и маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с культурой эндотелиальных клеток коронарной артерией человека и культурой эндотелиальных клеток пупочной вены человека: **А** – иммуноблоттинг; **Б** – количественный подсчет измеренных маркеров эндотелиального фенотипа в отношении их относительной экспрессии в различных эндотелиальных культурах

Для валидации результатов полнотранскриптомного секвенирования РНК, выделенной из КФЭК, HCAEC, HUVEC при помощи дот-блоттинга были измерены уровни 55 ангиогенных белков (рисунок 11). Для КФЭК была характерна выраженная экспрессия 4 проангиогенных факторов: фактора свертывания крови 3 (TF), гепарин-связывающего EGF-подобного фактора

роста (HB-EGF), интерлейкина-8 (IL-8), урокиназного активатора плазминогена (uPA), и антиангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (Ang-2), относительно аналогичных белков в других культурах. Уровень экспрессии 10 белков был характерен всем трем исследуемым эндотелиальным культурам и не имел выраженных отличий среди проангиогенных белков таких как: дипептидилпептидаза-4 (DPPIV), эндоглин (CD105), эндотелин-1 (ET-1), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный фактор роста AA/BB (PDGF-AB/PDGF-BB), плацентарный фактор роста (PIGF), ингибитор-1 активатора плазминогена (Sepine E1), так и среди антиангиогенных: эндостатин/коллаген 18 (Endostatin/CollXVIII), тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (TIMP-1), тромбоспондин-1 (TSP-1). HCAEC отличала высокая экспрессия основного фактора роста фибробластов 2 (FGF basic) в 2 раза относительно других культур, а также экспрессия эпидермального фактора роста (EGF), которая выявлена исключительно у HCAEC. Уровень экспрессии моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) варьировал среди исследуемых культур, так наибольший уровень экспрессии выявлен у HUVEC, который превышал данный показатель в 1,5 раза у КФЭК, и полностью отсутствовал у HCAEC [4].



Примечание: Ang-2 – ангиопоэтин-2; TF – фактор свертывания крови 3; DPP-IV – дипептидилпептидаза-4; EGF – эпидермальный фактор роста; CD105 – эндоглин; Endostatin/CollXVIII – эндостатин/коллаген 18; ET-1 – эндотелин-1; bFGF (FGF basic) – фактор роста фибробластов 2; HB-EGF – гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста; IL-8 – интерлекин-8; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1; PTX3 – пентраксин 3; PDGF-AB/PDGF-BB – фактор роста тромбоцитов AA/BB; PIGF – плацентарный фактор роста; Serpin E1 – ингибитор-1 активатора плазминогена; TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; TSP-1 – тромбоспондин-1; uPA – урокиназный активатор плазминогена

Рисунок 11 – Сравнительная оценка экспрессии 55 белков, связанных с ангиогенезом человека, в культуре колониеформирующих эндотелиальных клеток, эндотелиальных клеток коронарной артерии человека и эндотелиальных клеток пупочной вены человека: А – репрезентативные изображения дот-блоттинга; Б – денситометрический анализ измеренных маркеров эндотелиального фенотипа

Резюме

Механическое воздействие во время процедуры ЧКВ повышает иммобилизацию в кровь предшественников КФЭК с высоким и средним пролиферативным потенциалом и увеличивает вероятность выделения аутологичных КФЭК в культуре. Выделенные культуры КФЭК обладают

стабильным эндотелиальным фенотипом, сохраняют ангиогенные свойства и могут быть использованы для создания персонафицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза.

В данном исследовании проведена всесторонняя валидация КФЭК на предмет соответствия эндотелиальным клеткам. Выявлено, что КФЭК имеют переходную эндотелиальную спецификацию и вероятно обладает потенциалом дифференцироваться в направлении артериальной, венозной или лимфатической линии. Культуру КФЭК отличала более выраженная экспрессия гена венозного эндотелиального маркера *NRP2* в сравнении с НСАЕС и более высокой экспрессией гена маркера артериальной дифференцировки *NOTCH4* в сравнении с HUVEC [4]. Сочетание результатов анализа протеомного профиля ангиогенных молекул методом дот-блоттинга и преимущественно промежуточный уровень маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода больше свидетельствуют о промежуточной спецификации КФЭК (между артериальными и венозными эндотелиальными клетками). Можно предположить, что обнаруженная гиперэкспрессия у КФЭК генов, кодирующих белки ВКМ, в частности белки базальной мембраны, могут свидетельствовать об усиленном синтезе ВКМ, и как следствие способствовать формированию устойчивой адгезии ЭК, формированию неоинтимы и способствовать эффективной репарации. Гены *COL1A1* и *COL1A2* кодируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепи коллагена I типа, который принадлежит к семейству фибриллярного коллагена и является главным компонентом ВКМ. В свою очередь гены *COL4A1* и *COL4A2* кодируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепи коллагена IV типа, который является основным структурным компонентом базальных мембран и взаимодействует с другими компонентами ВКМ, такими как перлеканы, протеогликаны и ламинины. Коллаген IV типа, посредством взаимодействия с интегринами, индуцирует внутриклеточную передачу сигналов, способствуя пролиферации ЭК и ингибируя апоптоз [195].

Ангиогенез является сложным многоэтапным процессом, обеспечивающим рост и развитие системы кровообращения за счет пролиферации, миграции и проницаемости ЭК, требующий последовательной активации стимулирующих и ингибирующих сигналов [185]. Ангиогенная способность ЭК является основой формирования неоплазмы. Основным путем регулирующим сложный процесс ангиогенеза являются фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – ключевой митогенный и хемотаксический фактор и их тирозинкиназные рецепторы [188]. Фактор роста эндотелия сосудов А кодируется одноименным геном *VEGFA*, индуцирует пролиферацию ЭК, способствует миграции клеток, ингибирует апоптоз и индуцирует проницаемость кровеносных сосудов [2, 4].

Гены, кодирующие рецепторы к различным формам VEGF опосредуют его функцию в ЭК. Ген *KDR*, кодирует рецептор VEGFR/CD309 для VEGFA, VEGFC и VEGFD. Играет важную роль в регуляции ангиогенеза, развития сосудов, сосудистой, способствует пролиферации, выживанию, миграции и дифференцировке ЭК [78]. Ген *FLT1* кодирует рецептор для VEGFA, VEGFB и к плацентарному фактору роста (PGF) необходим для организации кровеносных сосудов [140, 189]. Ген *FLT4* кодирует рецептор к VEGFC и VEGFD, а также участвует в лимфангиогенезе и поддержании лимфатического эндотелия. Способствует пролиферации, выживанию и миграции ЭК и регулирует ангиогенное прорастание [150]. Ген *NRP2* кодирует нейропелин-2 член семейства рецепторных белков нейропелинов, рецептор к изоформе VEGF-165, участвует в прорастающем ангиогенезе [122, 175]. Гены *NOTCH2* и *NOTCH4* кодируют рецептор для лигандов Jagged-1, Jagged-2 и Delta-1, *DLL4* представляет собой, кодирующий дельта-подобный канонический лиганд 4, является лигандом в сигнальном Notch-пути, активация которого приводит к отрицательной регуляции пролиферации и миграции ЭК [98].

Ген *KLF4*, кодирует транскрипционный фактор. Регулирует экспрессию ключевых факторов транскрипции во время эмбрионального

развития. KLF4 является положительным регулятором сигнального пути VEGF и, таким образом, способствует образованию трубчатых структур через активацию передачи сигналов VEGF [105]. Секретируемый белок BMP4 (костный морфогенетический белок 4) кодируется геном *BMP4* и активирует VEGFR2, посредством рецепторного комплекса BMPR1/BMPR2 или через канонический SMAD-зависимый путь [192].

Можно говорить о согласованности данных полнотранскриптомного секвенирования и протеомного профилирования в отношении переходной эндотелиальной спецификации КФЭК, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. Анализ ДЭГ показал, что КФЭК отличала гиперэкспрессия маркеров всех трех спецификаций эндотелиальной дифференцировки. Например, КФЭК в сравнении с артериальными HCAEC характеризовались более высокой экспрессией маркеров иной специализации: панэндотелиальных маркеров *KDR*, *VWF*, венозных *FLT4*, *NRP2*, эндотелиальных прогениторных клеток *CD34*, и лимфатического *LYVE1*. При сравнении КФЭК с венозными с HUVEC выявлена аналогичная картина, КФЭК гиперэкспрессируют маркеры артериальной спецификации *NOTCH4*, *DLL2*, и маркер лимфатической *LYVE1* [4].

Полученная культура КФЭК характеризуется стабильным эндотелиальным фенотипом, сохранностью ангиогенных свойств, промежуточной спецификацией между артериальными и венозными эндотелиальными клетками. Таким образом, уникальные свойства КФЭК и возможность их получения из периферической крови пациентов с ИБС делает КФЭК ценным кандидатом для использования в регенеративной медицине, в том числе, при создании персонифицированных клеточнозаселенных сосудистых протезов [4].

ГЛАВА 4. ПОДБОР РЕЖИМОВ КЛЕТОЧНОГО ЗАСЕЛЕНИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ В УСЛОВИЯХ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА

Данный этап исследования включал в себя 2 раздела:

1. Определение оптимального режима культивирования в условиях пульсирующего потока.
2. Выбор культуры эндотелиальных клеток для заселения сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока.

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

4.1.1 Определение продолжительности культивирования

Для определения продолжительности культивирования была проведена оценка жизнедеятельности КФЭК на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген на разных сроках культивирования. Спустя 2 суток культивирования в статических условиях большая часть внутренней поверхности протеза была заселена эндотелиальными клетками. Спустя 7 суток культивирования в статических условиях происходила умеренная клеточная пролиферация, приводившая к формированию практически непрерывного клеточного слоя. При культивировании клеток на поверхности протезов в статических условиях более 7 суток (14 и 21 сутки) наблюдали гибель части клеток с нарушением клеточного монослоя. Выявлено, что увеличение времени культивирования эндотелиальных клеток на поверхности протезов не приводило к повышению эффективности заселения. Это связано с тем, что зрелые эндотелиальные

клетки обладают умеренной пролиферативной активностью (рисунок 12). Таким образом, оптимальная продолжительность культивирования КФЭК составила 7 суток [14, 16].

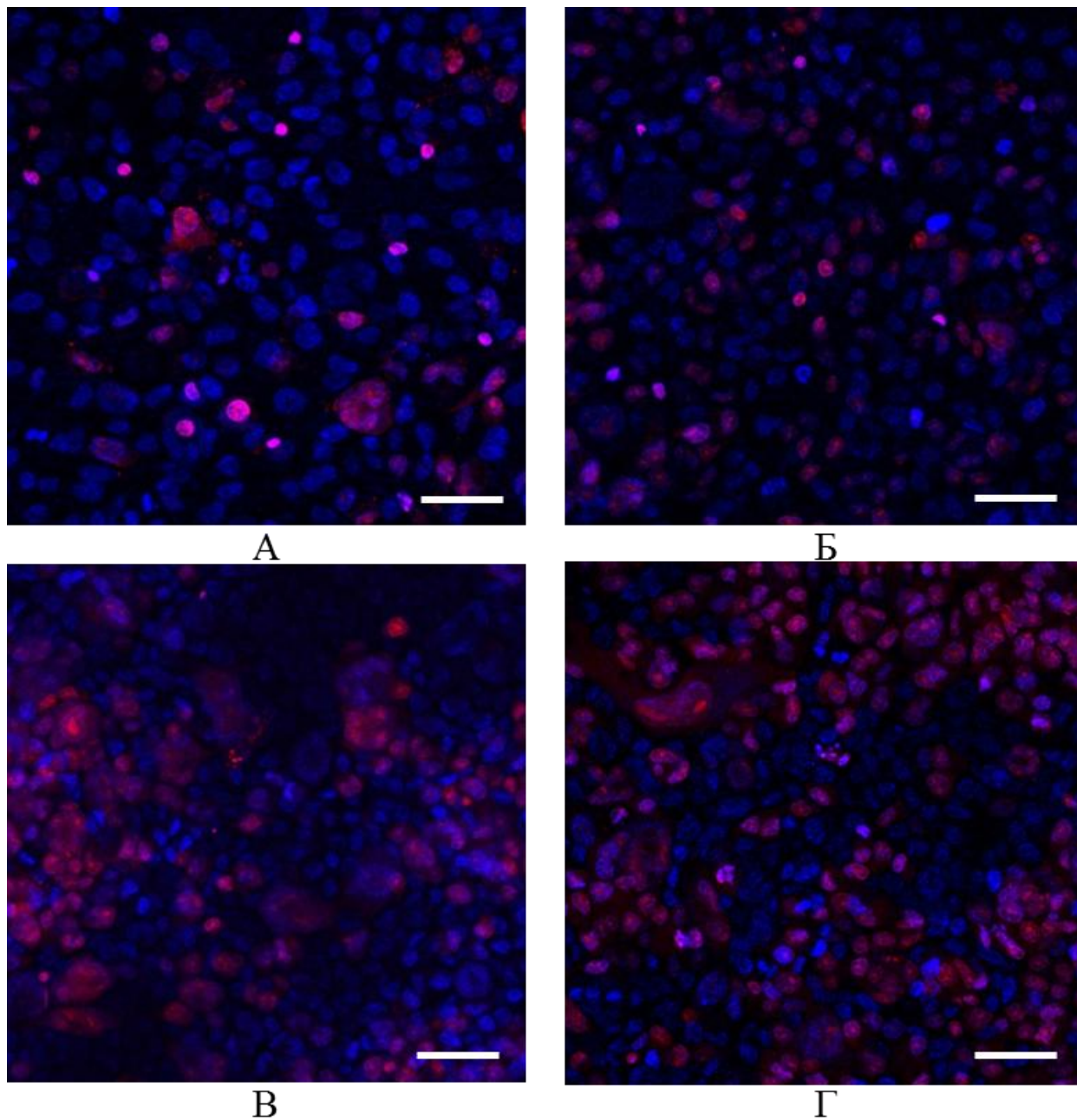


Рисунок 12 – Жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов с коллагеном при культивировании в статических условиях: А – 2 суток; Б – 7 суток; В – 14 суток; Г – 21 сутки культивирования. Сочетанное окрашивание DAPI (синее свечение) и этидиумом бромидом (красное свечение). Конфокальная лазерная микроскопия, увеличение x 200

4.1.2 Определение оптимальной интенсивности напряжения сдвига

Для определения оптимальной интенсивности напряжения сдвига была оценена эффективность заселения внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген с использованием клеточной культуры НСАЕС в условиях проточного пульсирующего биореактора.

Чтобы полноценно заселить внутреннюю поверхность протеза брали 700 000 ресуспендированных клеток в 1 мл среды и полностью заполняли внутренний канал протеза клеточной суспензией. Для воссоздания пульсирующего потока были опробованы следующие режимы работы биореактора, находящиеся в диапазоне 1-10 дин/см². В условиях эксперимента невысокие значения напряжения сдвига часто используется при выращивании в условиях *in vitro* тканеинженерных конструкций [64, 67], однако в естественных условиях эндотелиальные клетки подвергаются напряжению сдвига 5–20 дин/см² [45]. Таким образом, использованные нами значения находятся на уровне нижней границы физиологической нормы [16].

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 [14].

Выявлено, что адгезивных свойств протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген оказалось недостаточно для полноценного прикрепления к внутренней поверхности ЭК в условиях пульсирующего потока. Непродуктивное клеточное заселение выявлено при Режиме 2, при котором клетки смывались с поверхности протезов, что потребовало усиления фидерного слоя.

При проведении сканирующей лазерной микроскопии выявлено, что при одинаковой продолжительности культивирования эндотелиальных клеток в статике и в условиях пульсирующего потока при Режиме 1 синтез белка фокальной (очаговой) адгезии талина, специфического эндотелиального маркера CD31, а также белка межклеточных контактов VE-

кадгерина (CD144) происходил интенсивнее (рисунок 13). Также в условиях потока значительно повышался синтез эндотелиальными клетками vWF, компонента базальной мембраны коллагена IV типа и F-актина, обеспечивающего элонгацию клеток в условиях потока [14].

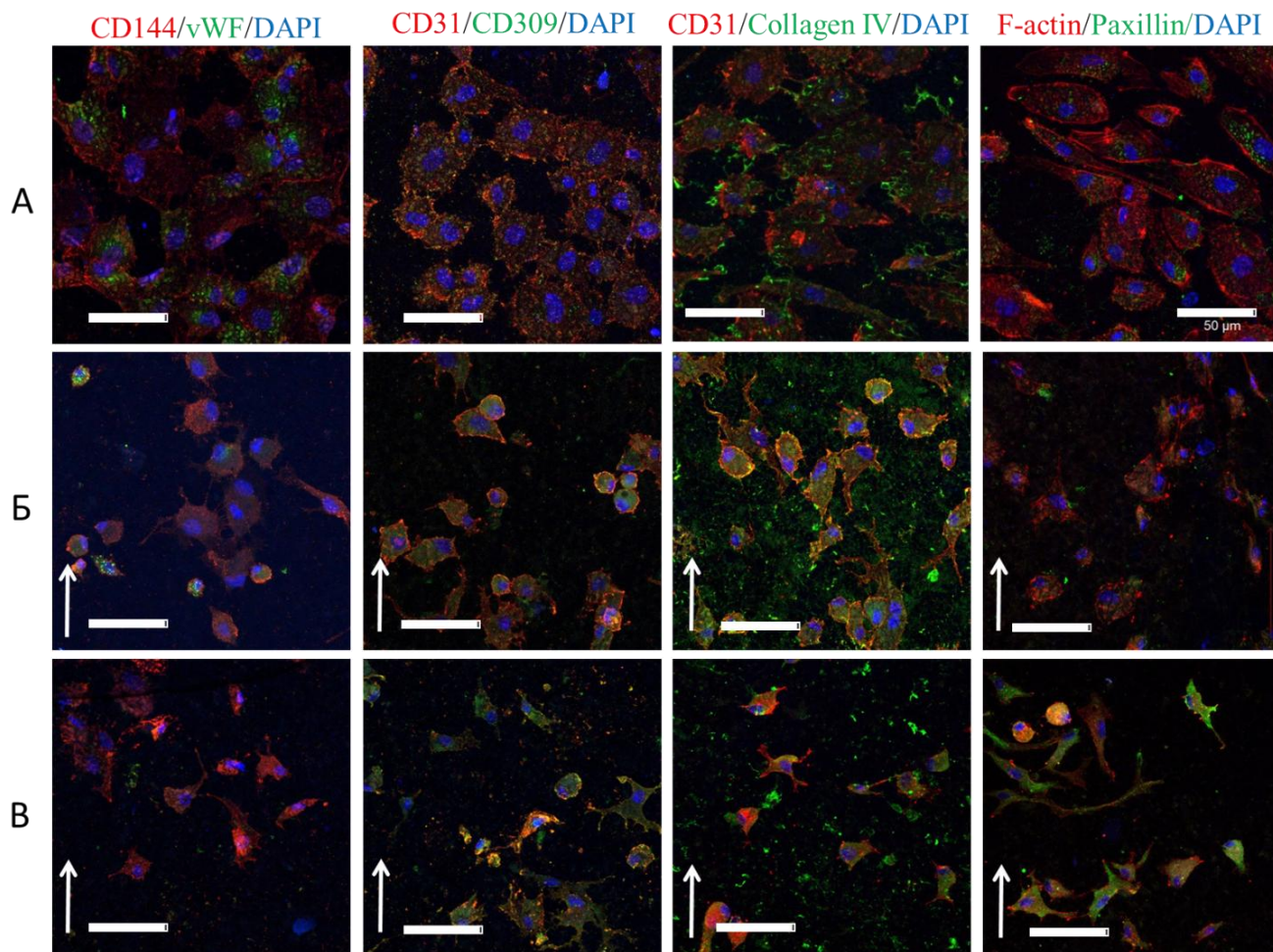


Рисунок 13 – Иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности сосудистых протезов с коллагеном, заселенной культурой эндотелиальных клеток коронарной артерии человека: А – образцы, культивированные в статике; Б – образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока интенсивностью 2,85 дин/см²; В – образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока интенсивностью 5,74 дин/см². Стрелкой указано направление потока. Конфокальная лазерная микроскопия, увеличение $\times 630$

Таким образом, для дальнейших экспериментов был определен **рабочий режим** заселения эндотелиальными клетками внутренней поверхности биodeградируемых 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 [14].

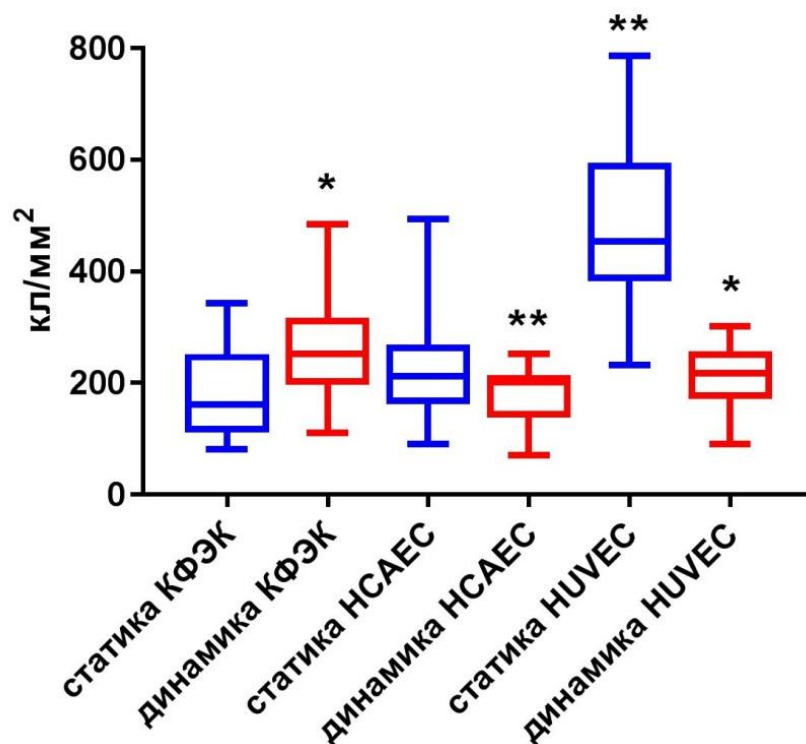
Также определена необходимость создания белкового фидерного слоя, в идеале – аутологичного, способного полноценно удерживать клетки на своей поверхности в условиях пульсирующего потока.

4.2 Сравнительный анализ эффективности использования различных типов эндотелиальных клеток для создания клеточнозаселенного сосудистого протеза в условиях *in vitro*

Проведено заселение сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген культурами КФЭК, НСАЕС и HUVES в статических условиях и в условиях пульсирующего потока с интенсивностью 2,85 дин/см². Эффективность заселения сосудистых протезов различными культурами оценивали по плотности клеточной популяции и экспрессии эндотелиальных маркеров [14].

Микроскопический анализ показал различную тенденцию в заселении поверхности графта разными типами клеток. Для культуры КФЭК было характерно умеренное заселение поверхности графта 161,4 (110,9; 252,1) клеток на 1 мм² при культивировании в течение 7 суток в статических условиях. При этом при культивировании в течение аналогичного срока в условиях динамической нагрузки данный показатель оказался значимо ($p < 0,05$) выше и составил 252,1 (201,7; 312,6) клеток на 1 мм². Клетки коммерческой линии НСАЕС в целом также продемонстрировали умеренное заселение поверхности протеза, при этом не было обнаружено разницы при культивировании в статических или динамических условиях 211,7 (161,4; 262,2) и 201,7 (141,2; 211,8), соответственно [16]. Однако плотность

заселения НСАЕС в динамике была значимо ниже ($p < 0,05$), чем в аналогичных условиях при использовании для заселения КФЭК (рисунок 14) [14, 16].



Примечание: * – значимые отличия от аналогичных сосудистых протезов, культивированных в статических условиях, $p < 0,05$;
 ** – значимые отличия от ПГБВ/ПКЛ/коллаген/КФЭК, культивированных в динамических условиях, $p < 0,05$

Рисунок 14 – Количество клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов с коллагеном, кЛ/мм²

Культура HUVES показала максимальную плотность покрытия поверхности при культивировании в статике – 453,8 (383,2; 595,0) в сравнении с КФЭК и НСАЕС ($p < 0,05$). Однако полученный эндотелиальный монослой не был достаточно устойчивым к воздействию пульсирующего потока: при культивировании в динамике плотность клеток составила 216,8 (171,4; 252,1) в сравнении со статикой ($p < 0,05$), что сравнимо с данными, полученными на КФЭК и НСАЕС (рисунок 14) [16].

На основе результатов окраски специфическими антителами был проведен анализ влияния пульсирующего потока на фенотип клеток,

межклеточные контакты, функциональную активность, адгезию клеток к поверхности [16]. Выявлено, что для всех типов клеток, используемых в эксперименте, был характерен высокий уровень экспрессии специфичных эндотелиальных маркеров: CD31, VEGFR2, CD144. При этом фенотип клеток сохранялся при культивировании как в статичных условиях, так и в условиях пульсирующего потока [16].

Культура КФЭК очень интенсивно экспрессировала маркеры эндотелиальных клеток CD31 и CD144 как в статичных, так и динамичных условиях культивирования. Клетки синтезировали vWF и коллаген IV типа. В статике была отмечена умеренная экспрессия VEGFR2, значительно усиливавшаяся при культивировании в условиях пульсирующего потока. Как в статике, так в динамике в клетках обнаруживали выраженные филаменты F-актина, при этом при культивировании в динамических условиях отмечали их большую упорядоченность и тенденцию к ориентированию по направлению потока (рисунок 15) [14, 16].

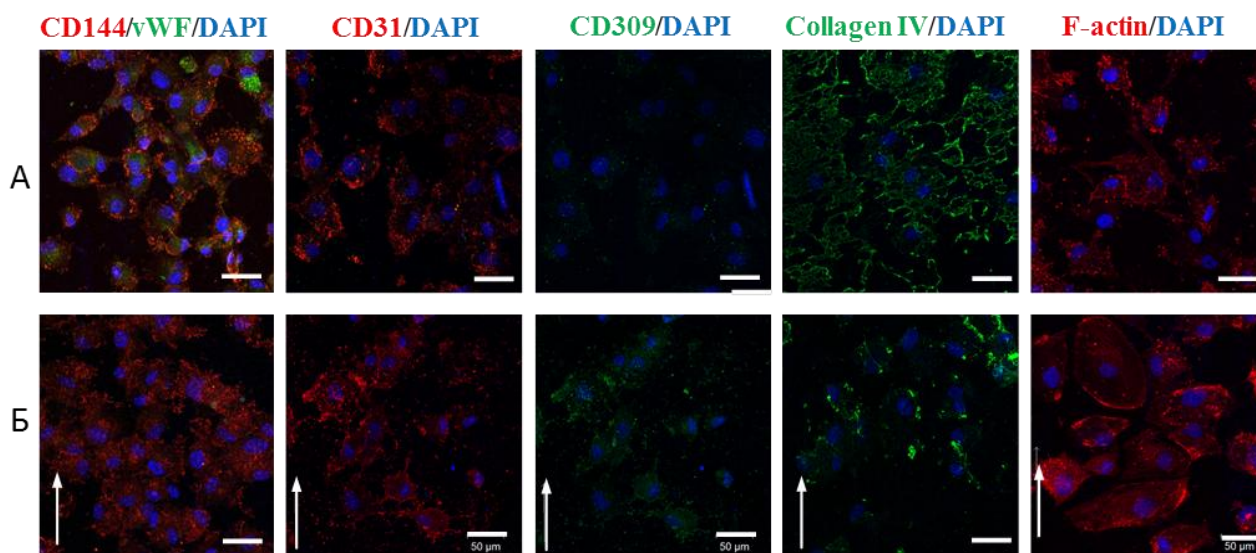


Рисунок 15 – Конфокальная лазерная микроскопия внутренней поверхности сосудистых протезов с коллагеном, заселенной культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток: А – образцы, культивированные в статике; Б – образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелкой указано направление потока, увеличение $\times 630$

Культура HUVEC также демонстрировала высокую экспрессию эндотелиальных маркеров (CD31, CD144) в статике и динамике. Выраженность формирования межклеточных контактов (CD144) была наиболее высокой среди всех исследуемых культур. Отмечалось значительное усиление синтеза vWF в динамических условиях культивирования. В статике клетки характеризовались низкой экспрессией VEGFR2, значительно усиливавшейся в динамике. Независимо от условий культивирования, выявлена высокая экспрессия коллагена IV типа и F-актина (рисунок 16) [16].

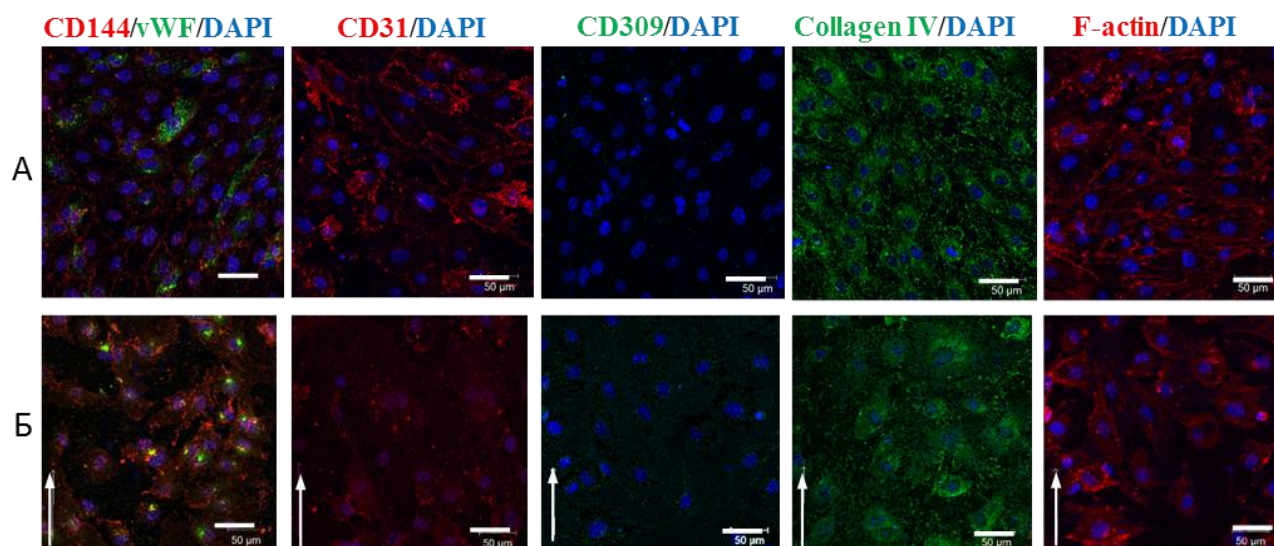


Рисунок 16 – Конфокальная лазерная микроскопия внутренней поверхности сосудистых протезов с коллагеном, заселенной культурой эндотелиальных клеток пупочной вены человека: А – образцы, культивированные в статике; Б – образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелкой указано направление потока, увеличение $\times 630$

В отношении экспрессии специфических маркеров для культуры НСАЕС в целом сохранялась вышеописанная тенденция. Особенностью явилась слабая выраженность межклеточных контактов в связи с низкой плотностью слоя клеток. Умеренная экспрессия CD309 отмечена как в статике, так и в динамике. Воздействие пульсирующего потока значительно

усиливало синтез клетками коллагена IV типа. При культивировании в статичных условиях внутри клеток обнаружили упорядоченные филаменты F-актина, тогда как при культивировании в условиях пульсирующего потока клетки становились значительно менее распластанными, а филаментная структура нарушалась (рисунок 17) [16].

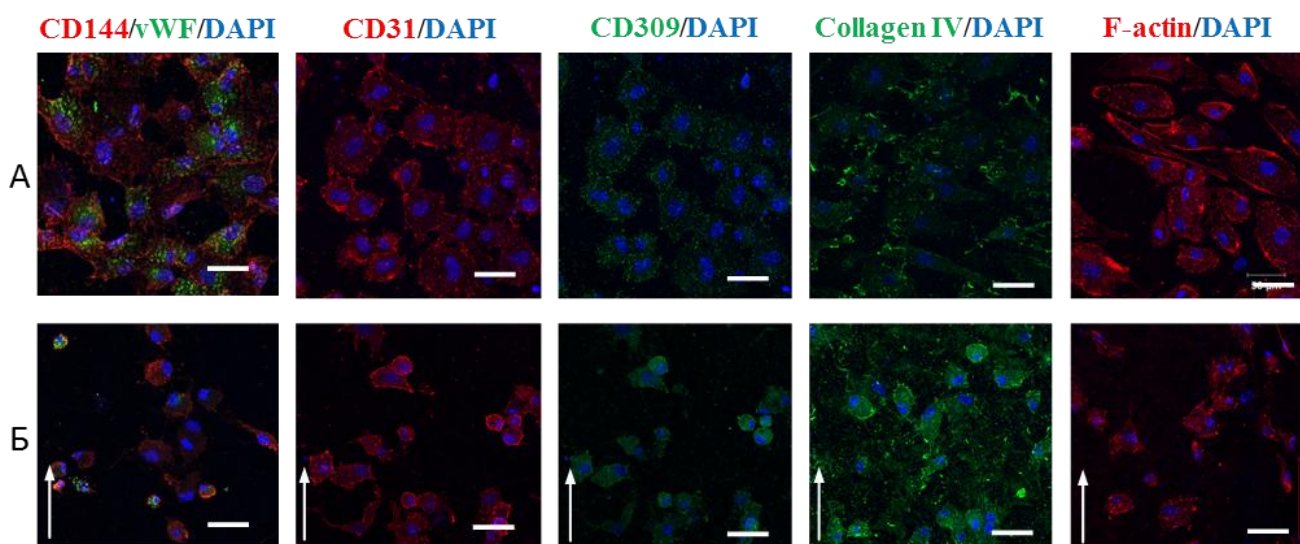


Рисунок 17 – Конфокальная лазерная микроскопия внутренней поверхности сосудистых протезов с коллагеном, заселенных культурой эндотелиальных клеток коронарной артерии человека: А – образцы, культивированные в статике; Б – образцы, культивированные в условиях пульсирующего потока. Стрелкой указано направление потока, увеличение $\times 630$

Резюме

Таким образом, оптимальный режим культивирования сочетал в себе параметры пульсирующего потока: объем выброса 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – $2,85 \text{ дин/см}^2$ и продолжительность культивирования 7 суток. Это подтверждено снижением жизнеспособности ЭК при увеличении срока культивирования с 7 суток до 14 суток, а также значительным снижением плотности популяции ЭК при увеличении

напряжения сдвига с $2,85 \text{ дин/см}^2$ до $5,74 \text{ дин/см}^2$ вследствие недостаточной адгезии [14].

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 сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген [16]. На основании плотности клеточного слоя после окончания динамического культивирования можно заключить, что КФЭК обладали оптимальной адгезией к поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген и устойчивостью к смыванию потоком. Напротив, при использовании НСАЕС по причине их относительно низкого пролиферативного потенциала и меньшей адгезии к поверхности ПГБВ/ПКЛ/коллаген сосудистых протезов не удалось получить достаточного слоя даже при культивировании в статике [16]. С учетом того, что получение культуры зрелых эндотелиальных клеток НСАЕС представляет значительные сложности, данную культуру можно признать малоприспособленной для использования в тканевой сосудистой инженерии. На культуре HUVES были получены достаточно хорошие результаты по заселению сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген в статических условиях, однако полученный эндотелиальный слой оказался недостаточно устойчивым к действию пульсирующего потока. Одним из преимуществ HUVES является высокая пролиферативная активность культуры, позволяющая получать большое количество клеточной массы. Однако эта культура не может быть аутологичной, что ограничивает ее использование для создания персонафицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза [16]. Напротив, КФЭК можно получить у пациентов. Данные клетки обладают достаточно высоким пролиферативным потенциалом для использования в тканевой инженерии при создании персонафицированных тканеинженерных сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока [16].

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ФИБРИНОМ И КЛЕТОЧНОГО ЗАСЕЛЕНИЯ ПОВЕРХНОСТИ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ

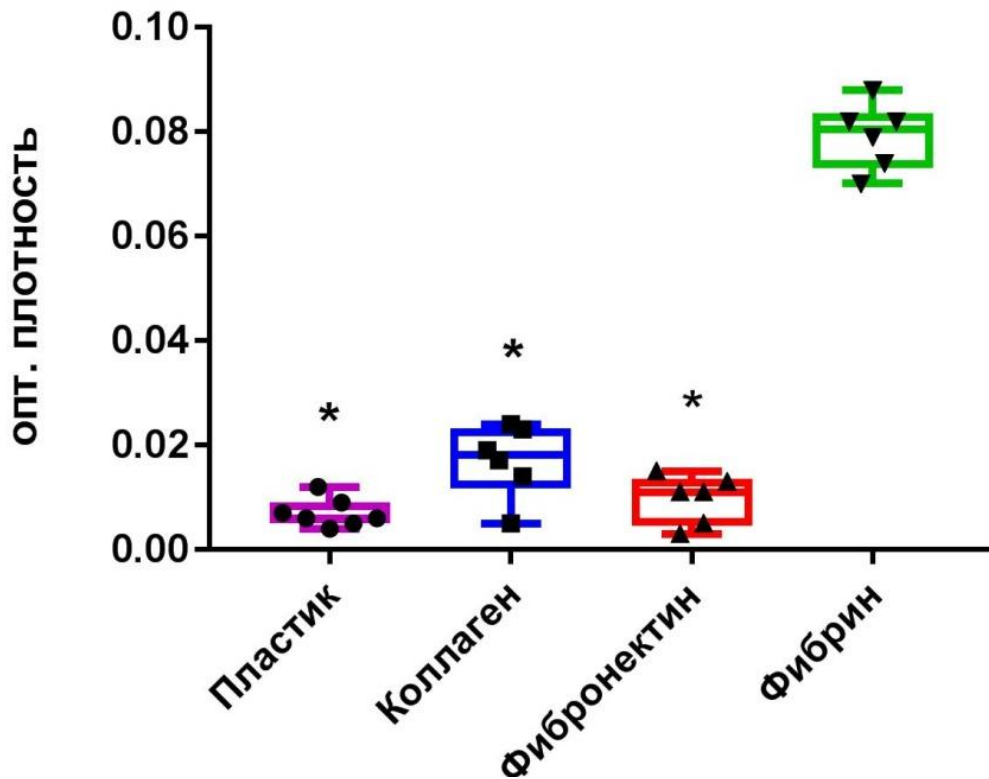
5.1 Метаболическая активность эндотелиальных клеток на различных поверхностях

Среди синтетических материалов часто встречаются те, которые обладают достаточными механическими свойствами, регулируемой скоростью деградации, пористостью, однако они неспособны обеспечить адгезию и пролиферацию клеток. В свою очередь, большинство природных полимеров (коллаген, фибронектин, фибрин) несут на себе сайты адгезии клеток, но обладают слабыми механическими свойствами. Ряд исследований был посвящен созданию идеальной комбинации, объединяющей материалы, отвечающие за различные функции готового изделия [17, 77, 156].

Применение природных полимеров ограничивается их животным происхождением, которое несет риск возникновения иммунной реакции и воспалительного ответа у реципиента, а также передачи инфекционных заболеваний от животных человеку, которое может привести к перекрестному заражению. Перспективным аутологичным белком является фибрин, так как является доступным, а также исключает использование продуктов животного происхождения [15].

В пилотном исследовании проведен сравнительный анализ уровня метаболической активности ЭК (ΔОП), культивируемых на фибрине, полученном из периферической крови пациентов с ИБС, с активностью клеток, культивируемых на коллагене I типа, фибронектине и культуральном пластике. Было выявлено достоверно значимое увеличение метаболической активности ЭК, культивируемых на фибрине в сравнении с культуральным пластиком, коллагеном, фибронектином, ($p < 0,05$) (рисунок 18). Таким

образом, фибрин стал приоритетным белком для формирования фидерного слоя на поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ.



Примечание: * – значимые отличия в сравнении в фибрином, $p < 0,05$

Рисунок 18 – Метаболическая активность эндотелиальных клеток на различных белковых подложках

5.2 Сравнительный анализ структуры поверхности сосудистых протезов до и после модифицирования фибрином

Биодеградируемые сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/коллаген, изготовленные методом отдельной подачи растворов обладали высокопористой структурой с более регулярным переплетением нитей в сравнении с ПГБВ/ПКЛ. Данная матрица ПГБВ/ПКЛ/коллаген характеризовалась волокнами, диаметром от 2,4 [1,5; 2,9] мкм и порами диаметром 8,0 [4,6; 8,2] мкм. Подобная технология изготовления позволила создать смесовые волокна, стержневая часть которых обеспечивает биомеханическую компетентность, в то время как коллагеновая оболочка

волокон была призвана улучшить матричные свойства поверхности протеза (рисунок 19, таблица 6) [14].

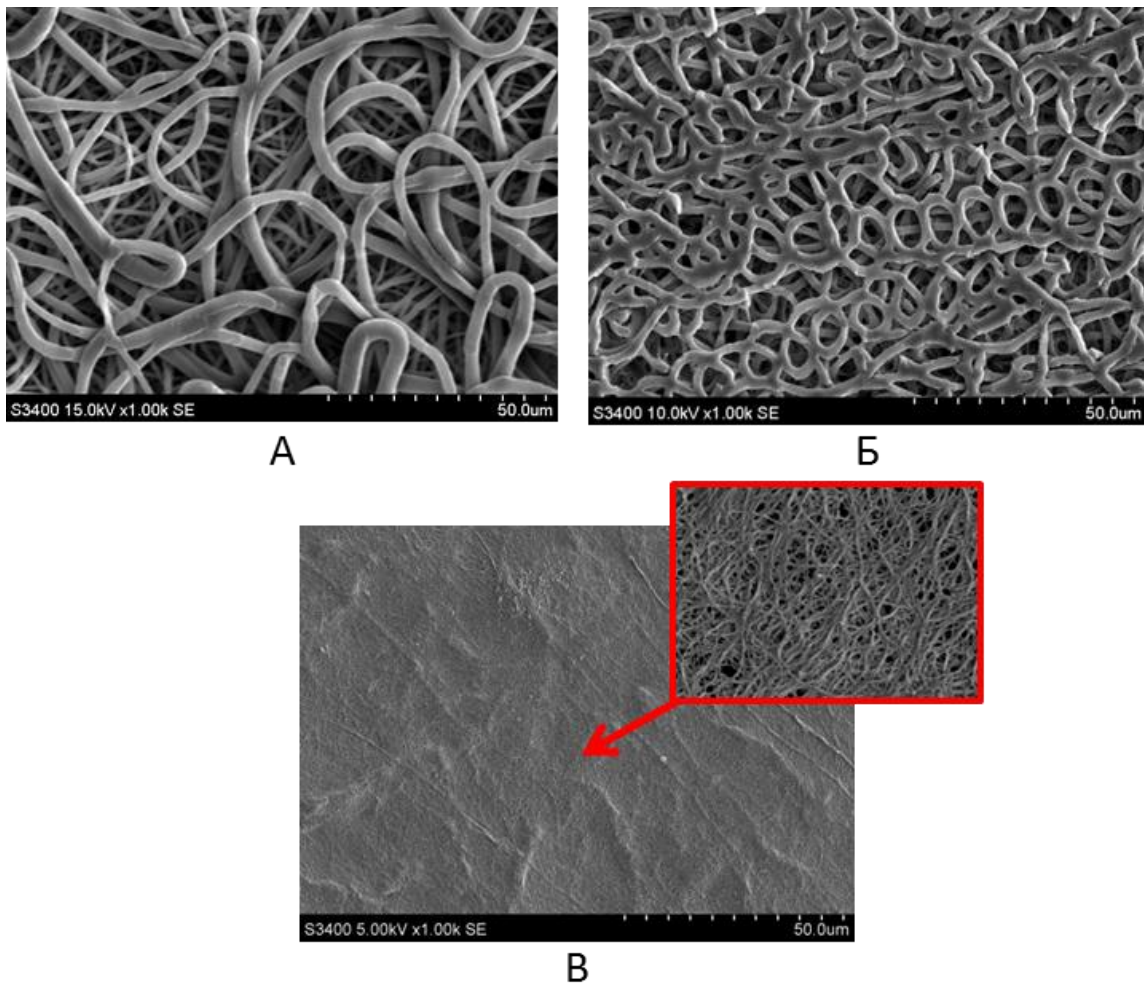


Рисунок 19 – Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов: А – полимерные протезы; Б – протезы с коллагеном; В – протезы с фибрином. Увеличение $\times 1000$

Таблица 6 – Диаметр волокон и пор

Вид образца	Диаметр волокна, мкм		Диаметр пор, мкм	
	Me [25 %; 75 %]		Me [25 %; 75 %]	
ПГБВ/ПКЛ	2,8 [1,9; 3,3] *		36,1 [30,2; 38,7] *	
ПГБВ/ПКЛ/коллаген	2,4 [1,5; 2,9] *		8,0 [4,6; 8,2] *	
ПГБВ/ПКЛ/фибрин	0,13 [0,09; 0,15]		0,27 [0,18; 0,33]	

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно ПГБВ/ПКЛ/фибрин, ПГБВ – полигидроксибутират/валерат, ПКЛ – поликапролактон.

Немодифицированные ПГБВ/ПКЛ каркасы обладали однородной высокопористой структурой с хаотичным переплетением нитей. Средний диаметр волокон составил 2,8 [1,9; 3,3] мкм, размер пор – 36,1 [30,2; 38,7] мкм. Модифицирование поверхности полимерного каркаса фибрином значительно изменило его архитектуру (рисунок 19) [14].

Выявлено, что при полимеризации фибрина была сформирована равномерная мелкопористая нанометрическая структура, которая выровняла поверхность полимерного каркаса (таблица 6). Сеть разветвленных фибрилл характеризовалась диаметром волокон 0,13 [0,09; 0,15] мкм, что в 18 раз тоньше волокон ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$). При этом размер пор на поверхности фибрина соответствовал 0,27 [0,18; 0,33] мкм, которые, что в 29,6 раза меньше пор на поверхности сосудистого протеза ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$) [14].

5.3 Сравнительный анализ физико-механических свойств сосудистых протезов с фибрином

Механические свойства протезов ПГБВ/ПКЛ с фибриновым покрытием были сравнены с протезами ПГБВ/ПКЛ/коллаген, немодифицированными ПГБВ/ПКЛ и с Arteria mammaria человека, которая на сегодняшний день является золотым стандартом для хирургии сосудистого шунтирования.

Все виды сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ (без модифицирования и с модифицированием фибрином и коллагеном) от нативного сосуда отличала высокая жесткость (рисунок 20, таблица 7). Критичным показателем для комплаентности протеза сосуда является соответствие степени жесткости. Максимальной жесткостью обладали сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/коллаген, у которых модуль Юнга был в 18,2 раза выше, чем у а. mammaria, ($p < 0,05$). Формирование фибринового покрытия на поверхности с сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ 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.

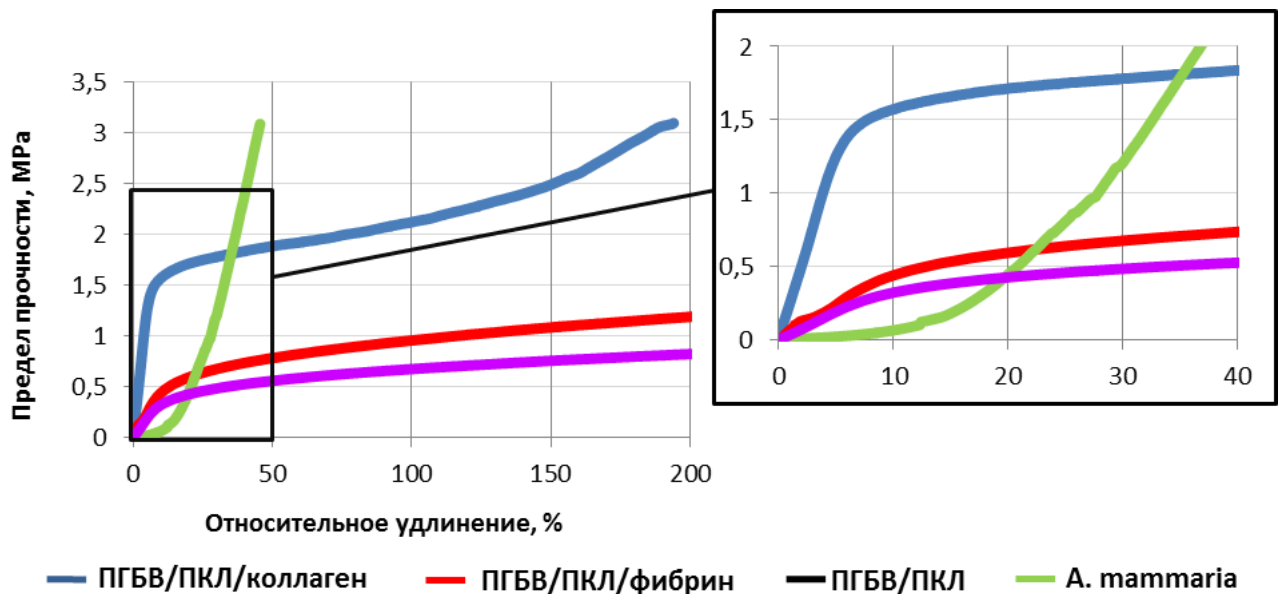


Рисунок 20 – Физико-механические свойства биodeградируемых сосудистых протезов до и после модифицирования фибрином и коллагеном в сравнении с внутренней грудной артерией, представленные в виде кривой «напряжение-деформация»

Таблица 7 – 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%]
Arteria mammaria (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.

5.4 Сравнительная характеристика тромборезистентности сосудистых протезов с фибрином

Наиболее часто для оценки тромбогенности исследуемых материалов и поверхностей используют тромбоциты, которые являются ключевым звеном в системе гемостаза. Определение адгезии и степени агрегации тромбоцитов крови после контакта с исследуемым материалом позволяет с большой долей вероятности определить гемосовместимость материала [5, 14, 160].

Поэтому была изучена адгезия и агрегация тромбоцитов после контакта с поверхностью биodeградируемых сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ до и после модифицирования фибрином и коллагеном [5]. Максимум агрегации тромбоцитов, как в спонтанном режиме, так и с индуктором агрегации АДФ, был зафиксирован после контакта тромбоцитов с поверхностью протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген и был достоверно выше аналогичных показателей интактной ОТП, ($p < 0,05$). Модифицирование поверхности протезов фибрином привело к увеличению максимума агрегации тромбоцитов в

спонтанном режиме – до 9,5 %, что, однако, оказалось ниже, чем у протезов с коллагеном, но достоверно выше аналогичного показателя интактной ОТП, ($p < 0,05$). При этом показатель максимума агрегации тромбоцитов с индуктором агрегации АДФ был ниже, чем у протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген, и не имел достоверных различий с интактной ОТП, ($p < 0,05$) (таблица 8) [5].

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

Таблица 8 – Максимум агрегации тромбоцитов после контакта с биodeградируемыми сосудистыми протезами в сравнении с интактной обогащенной тромбоцитами плазмой

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

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно интактной ОТП,
 ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма,
 АДФ – аденозин 5`-дифосфат,
 ПГБВ – полигидроксибутират/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, составляющих стенку протезов ПГБВ/ПКЛ (рисунок 21). При этом встречались тромбоциты всех степеней деформации (от I до V) с преобладанием III степени (таблица 9). Индекс деформации составил 3,04 [5].

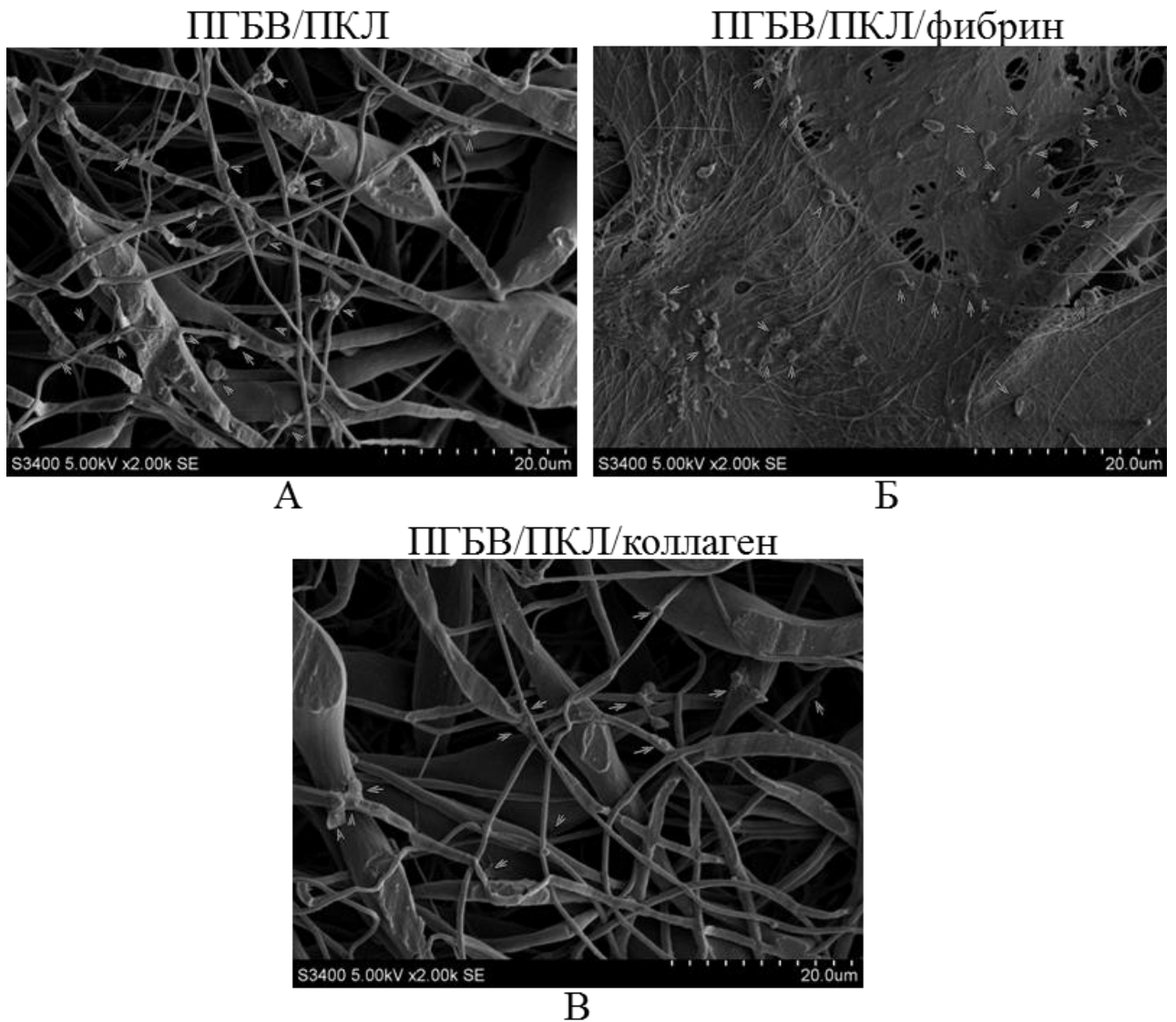


Рисунок 21 – Сканирующая электронная микроскопия поверхности сосудистых протезов после контакта с тромбоцитами: А – полимерные протезы; Б – протезы с фибрином; В – протезы с коллагеном, увеличение $\times 2000$

На поверхности сосудистых протезов с фибриновым покрытием тромбоциты выявлены в каждом поле зрения, что обусловлено более плотным расположением фибриновых филаментов. Преобладали тромбоциты II степени деформации, а индекс деформации был самым низким среди сравниваемых групп протезов и соответствовал значению 2,53. По индексу деформации и количеству адгезированных тромбоцитов на 1 мм^2 достоверных различий между сосудистыми протезами ПГБВ/ПКЛ и протезами, модифицированными фибрином не выявлено, ($p > 0,05$) [5].

Наиболее высокий индекс деформации тромбоцитов в совокупности с наибольшим количеством адгезированных тромбоцитов выявлен после контакта тромбоцитов с поверхностью сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген, ($p < 0,05$). При этом преобладали тромбоциты IV степени деформации, а значения индекса деформации достигали уровня 3,7 [5].

Таким образом, модифицирование фибрином полимерной поверхности ПГБВ/ПКЛ достоверно улучшило тромборезистентные свойства сосудистых протезов в сравнении с использованием коллагена для модифицирования поверхности протезов ПГБВ/ПКЛ.

Таблица 9 – Процентное соотношение степеней деформации тромбоцитов и индекс деформации

Вид сосудистого протеза	Соотношение степеней тромбоцитов, %					Индекс деформации	Количество тромбоцитов в 1 мм ²
	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,
ПГБВ – полигидроксибутират/валерат,
ПКЛ – поликапролактон.

**5.5 Сравнительная оценка адгезии и жизнеспособности
колониеформирующих эндотелиальных клеток на поверхности
сосудистых протезов в зависимости от модифицирования фибрином
или коллагеном и культивирования в статических
или динамических условиях**

Для сравнения адгезионных свойств сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин с ПГБВ/ПКЛ/коллаген проведено заселение КФЭК и последующее культивирование в условиях пульсирующего потока.

На рисунке 22 продемонстрированы адгезированные колониеформирующие эндотелиальные клетки к поверхности ПГБВ/ПКЛ/коллаген и ПГБВ/ПКЛ/фибрин (рисунок 22).

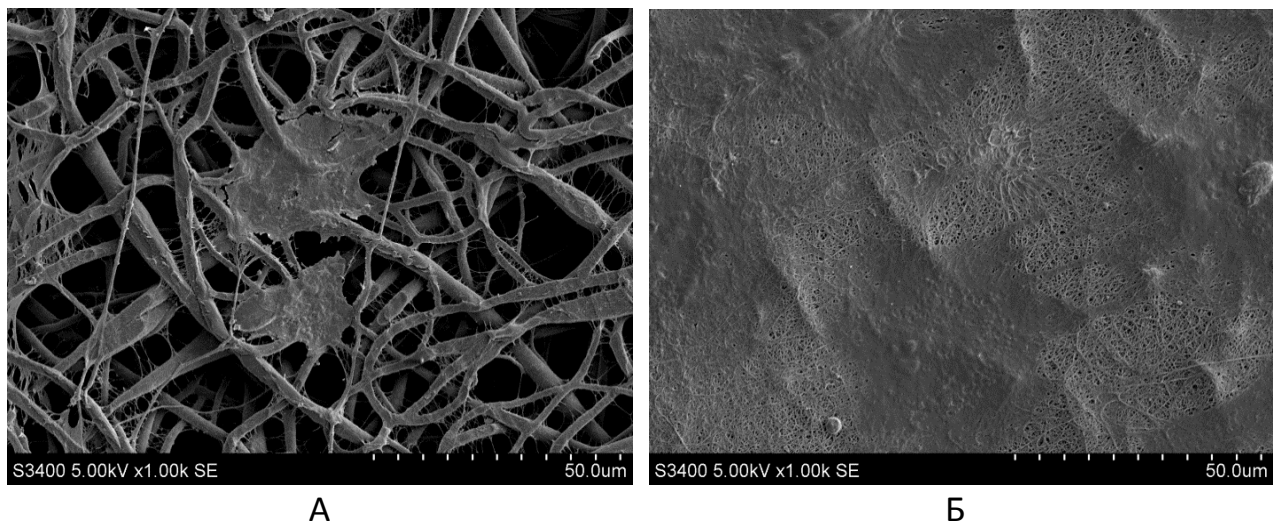
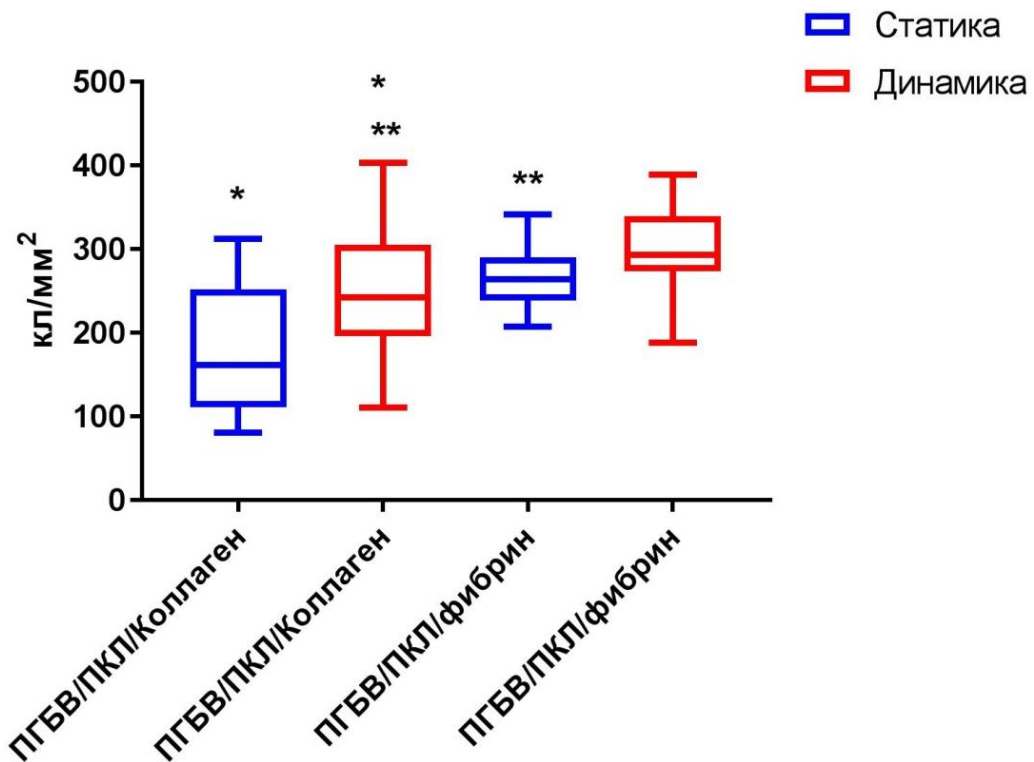


Рисунок 22 – Сканирующая электронная микроскопия поверхности сосудистых протезов после заселения культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока: А – протезы с коллагеном; Б – протезы с фибрином, увеличение x 1000

На снимках видна не только разница структуры белкового покрытия, но и качество адгезии клеток к белковой поверхности. Плотные упакованные филаменты фибрина сплошь покрывали полимерную поверхность, что привело к высокой степени клеточной адгезии: полная распластанность с

покрытием всей поверхности. При введении коллагена в состав стенки протеза сохранялись большие поры между филаментами, что не позволило клеткам полностью покрыть полимерную поверхность.

При культивировании клеточнозаселенных сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген в условиях статики и пульсирующего потока наблюдали 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 23). Также наблюдали достоверное увеличение жизнеспособности под влиянием потока с 69,2% до 83,8 %, ($p < 0,05$).



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 23 – Количественный анализ клеточной плотности культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистых протезов, кл/мм²

При культивировании клеточнозаселенных сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ с фибриновым покрытием в статических и динамических условиях

наблюдалось увеличение клеточной плотности под влиянием пульсирующего потока до 293 (273,6; 339,6) кл/мм², тогда как в статических условиях количество адгезированных клеток соответствовало 264,2 (239,1; 290,1) кл/мм², ($p>0,05$).

Процент жизнеспособных КФЭК, культивированных на внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛс фибриновым покрытием, как в статике, так и в динамике, близился к 100 % (рисунок 24) [14].

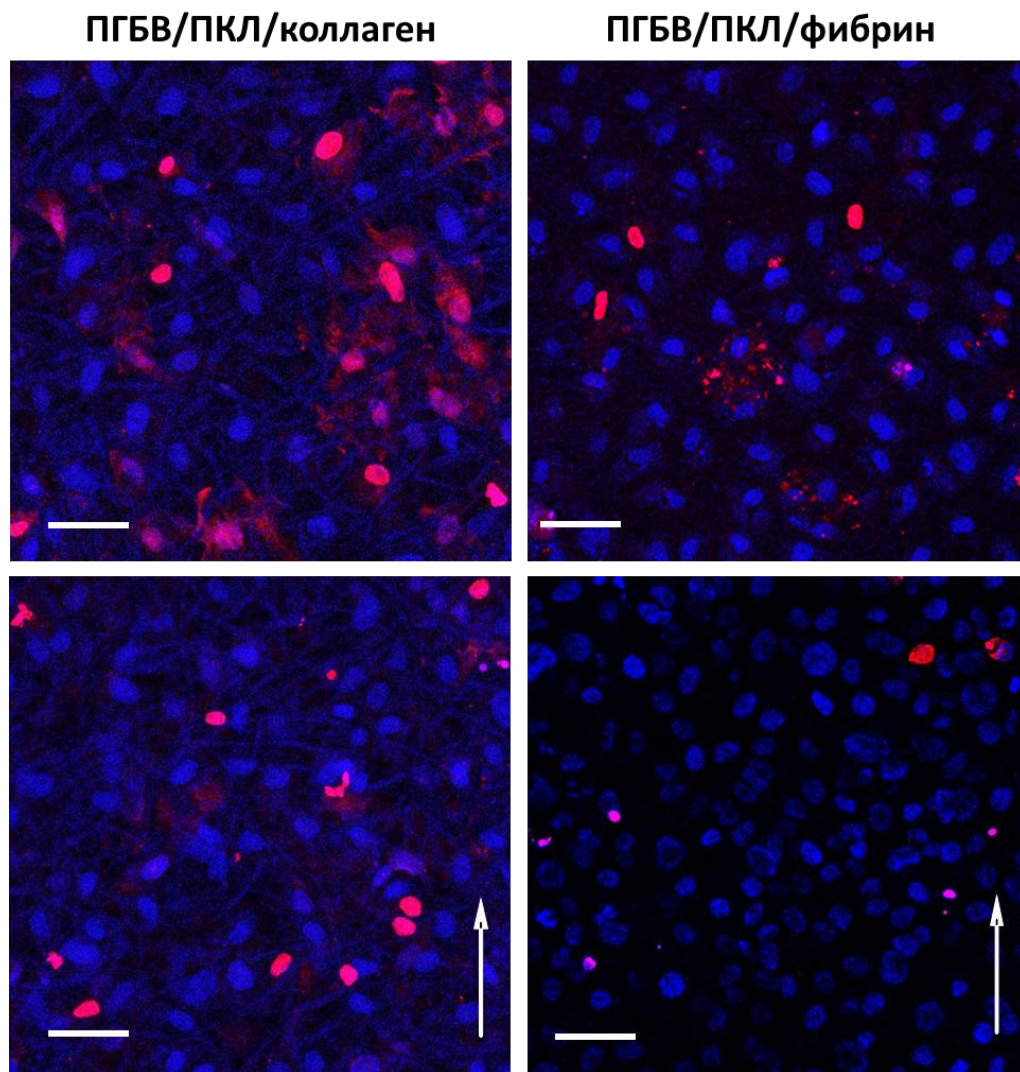


Рисунок 24 – Жизнеспособность культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов с коллагеном и фибрином. Сочетанная окраска флуоресцентными красителями DAPI (синее свечение) и этидиумом бромидом (красное свечение). Конфокальная лазерная микроскопия, увеличение $\times 630$. Стрелкой обозначены образцы, культивированные в пульсирующем потоке

Таким образом, пульсирующий поток оказывает позитивное влияние на увеличение клеточной плотности культуры КФЭК на внутренней поверхности сосудистых протезов, а использование фибрина в качестве фидерного слоя позволило значительно увеличить интенсивность заселения клетками с сохранением эндотелиального монослоя к окончанию 7-дневного срока культивирования в условиях пульсирующего потока и повышением клеточной жизнеспособности до 100 % [14].

5.6 Сравнительные результаты специфического иммунофлуоресцентного анализа поверхности клеточнозаселенных сосудистых протезов с фибрином

На основе результатов окраски специфическими антителами проводили анализ влияния пульсирующего потока интенсивностью $2,85 \text{ дин/см}^2$ на фенотип колониеформирующих эндотелиальных клеток, межклеточные контакты, функциональную активность, организацию цитоскелета, адгезию клеток к поверхности [14].

Уровень экспрессии специфичных эндотелиальных маркеров: CD309, CD144, CD 31 и vWF был выше на протезах с фибриновым покрытием, что может быть косвенным свидетельством более качественной адгезии клеток, ($p < 0,05$) (рисунок 25) [14].

Средняя интенсивность флуоресценции рецептора клеточной адгезии 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 (VEGFR2) при культивировании на сосудистых протезах с фибриновым покрытием была статистически значимо выше в сравнении с коллагеном и была равна 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 рецептора межклеточных контактов CD144 при культивировании на ПГБВ/ПКЛ/фибрин, чем на ПГБВ/ПКЛ/коллаген, что вероятно способствовало целостности эндотелиальной выстилки, ($p < 0,05$). Так на ПГБВ/ПКЛ/коллаген этот показатель был равен 11,4 (10,4; 13,9) у. ед., в то время как на ПГБВ/ПКЛ/фибрин – 22,3 (19,8; 23,5) у. ед. [14].

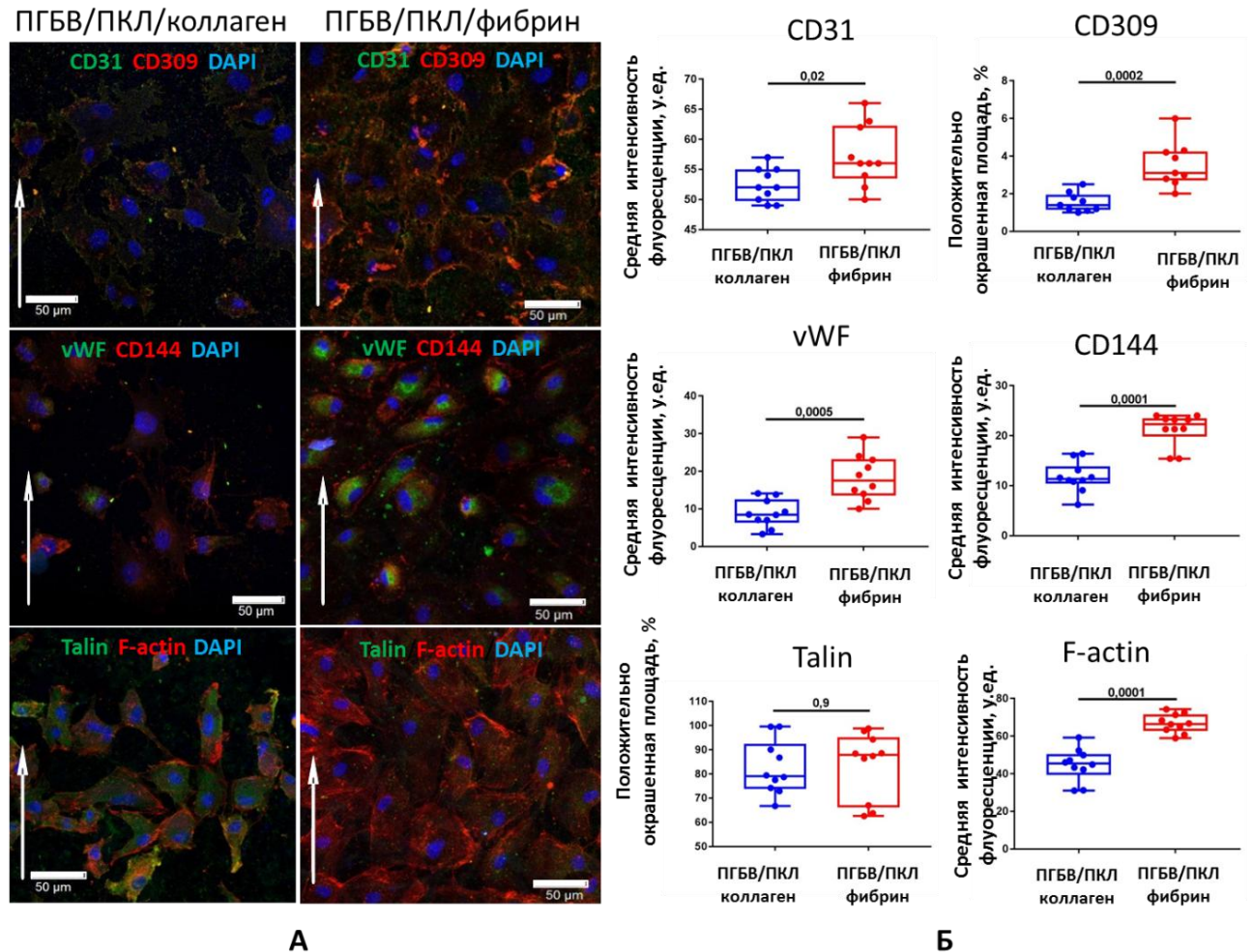


Рисунок 25 – Сочетанное иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности сосудистых протезов, заселенных культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток в условиях пульсирующего потока: CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. А – репрезентативные фотографии, сканирующая конфокальная микроскопия, увеличение $\times 200$. Б – количественный анализ изображений

Средняя интенсивность флуоресценции цитоскелетного белка F-actin была в 1,5 выше при культивировании КФЭК на сосудистых протезах с фибрином и составила 66,5 (62,2; 71,6) у. ед., в то время как на сосудистых 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 к потоку, выраженную в ориентации волокон F-actin в направлении потока. Не было выявлено статистически значимых отличий процента положительно окрашенной площади белка точечной адгезии Talin, в зависимости от типа сосудистого протеза, ($p > 0,05$). Так как вероятно критическим фактором влияния на этот белок является пульсирующий поток. Кроме того, выявлено вытягивание клеток вдоль тока жидкости и уплотнение контактов с соседними клетками при культивировании.

Таким образом, совокупность клеточных маркеров демонстрирует отличную адаптацию клеток к условиям пульсирующего потока в случае предварительного сиддинга клеток на фибриновой поверхности. Поэтому дополнительно было проведен полный транскриптомный анализ КФЭК, культивированных на поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ с фидерным слоем из фибрина статических и динамических условиях [14].

5.7 Результаты полнотранскриптомного секвенирования колониеформирующих эндотелиальных клеток, культивированных на поверхности протезов с фибрином в статических условиях и в условиях пульсирующего потока

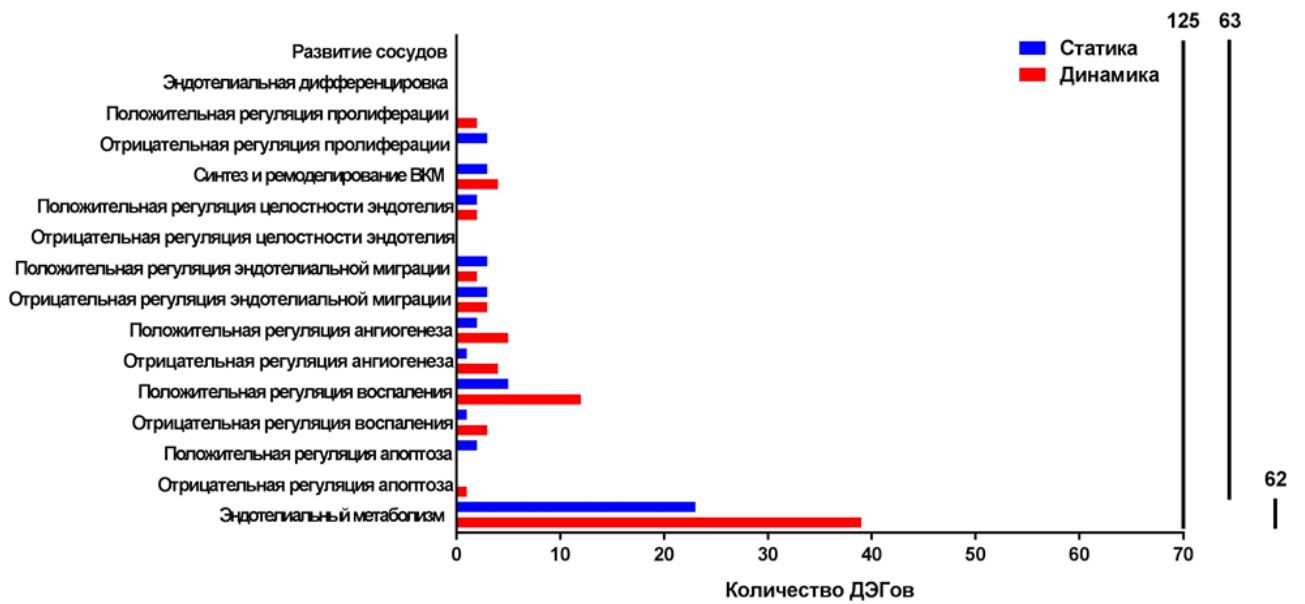
Эндотелиальный гомеостаз, поддерживаемый экспрессией правильного набора генов, влияет на долгосрочную проходимость сосудистого протеза. Чтобы определить оказывает ли преколонизация напряжением сдвига влияние уровень генной экспрессии КФЭК проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-Seq) [14].

При секвенировании ДНК-библиотек выявлены парные прочтения длиной 125 нуклеотидов, общий объем которых колебался от 1 до 5 млрд пар оснований с покрытием составившим 9,5-42,7 млн ридов. Фильтрация по качеству и длине, лигирование адаптеров не повлияло на количество прочтений. При процедуре картирования выявлено, что геному человека соответствовало 98,2 % ридов, в большей степени представленные экзонами (82,2-90,4 %) [14].

Были выявлены различия транскриптомов 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. Дифференциально экспрессируемые гены были аннотированы с использованием терминов, предложенных базой данных Gene Ontology для дальнейшего раскрытия их молекулярных характеристик. ДЭГ были разделены на 125 категорий, которые можно условно разделить на 2 обширные группы: эндотелиальный метаболизм (62) и процессы, участвующие в биологии эндотелия (63) (рисунок 26) [14].

Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов, показал, что воздействие пульсирующего потока активирует метаболизм в КФЭК. Для выявления этих отличий использовали инструмент Gene Ontology, который обладал преимуществом при анализе ДЭГ в категории «эндотелиальный метаболизм», и позволил определить, что в статике 23 ДЭГа характеризовались повышенной экспрессией, в то время как в динамике – 39 (рисунок 26) [14].

Аннотирование по Gene Ontology



Мануальное аннотирование

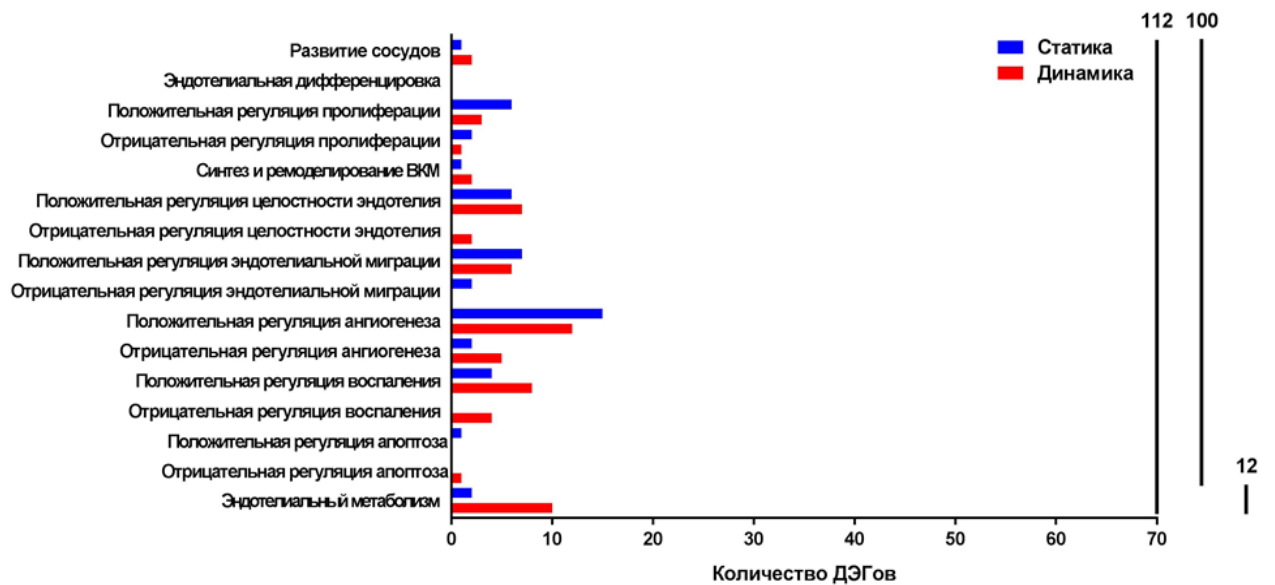


Рисунок 26 – Качественное и количественное сравнение профиля дифференциально экспрессируемых генов в культуре колониеформирующих эндотелиальных клетках в статических условиях и при воздействии на них пульсирующего потока с напряжением сдвига $2,85 \text{ дин/см}^2$ при помощи биоинформатического инструмента Gene Ontology и мануального аннотирования

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

1) белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (3 ДЭГ в условиях пульсирующего потока (динамических) против 2 ДЭГ в статических условиях);

2) белки, ответственные за регуляцию целостности эндотелия (9 ДЭГ в динамических против 6 ДЭГ в статических условиях);

3) стимулирующие ангиогенез белки (48 ДЭГ в динамических против 33 ДЭГ в статических условиях);

4) белки, определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток (17 ДЭГ в динамических против 12 ДЭГ в статических условиях);

5) белки, способствующие миграции эндотелиальных клеток (21 ДЭГ в динамических против 15 ДЭГ в статических условиях);

6) белки, ответственные за регуляцию воспаления (20 ДЭГ в динамических против 16 ДЭГ в статических условиях) (рисунок 26).

Именно мануальное аннотирование позволило установить различия ДЭГов КФЭК в ответ на пульсирующий поток во всех приведенных генных системах [14].

Резюме

Пористость, размер пор и структура каркасов являются ключевыми факторами для образования новых тканей и инфильтрации тканей хозяина. Структура пор должна иметь подходящий размер, быть открытой и взаимосвязанной, чтобы обеспечить достаточную диффузию питательных веществ и продуктов жизнедеятельности, а также для трансмурального прорастания.

Биологические свойства белка, используемого в качестве фидерного слоя, способны влиять на физико-механические свойства и тромборезистентность, создаваемой конструкции. Выявлено, что фибрин не ухудшил физико-механические свойства сосудистых протезов. При этом фибрин демонстрировал лучшую тромборезистентность по сравнению с коллагеном, включенным в структуру стенки протеза ПГБВ/ПКЛ/коллаген.

Доказано, что использование фибрина для покрытия поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ повысило качество клеточной адгезии и было предпочтительней введения коллагена в структуру ПГБВ/ПКЛ/коллаген сосудистых протезов. При этом жизнеспособность адгезированных эндотелиальных клеток на сосудистых протезах с фибриновым покрытием достигла 100 %.

Формирование на внутренней поверхности протеза эндотелиальной выстилки в условиях напряжения сдвига приводит к повышению синтетической активности vWF, специфических эндотелиальных маркеров CD31 и CD309, адгезии, ориентации клеток, а также повлияло на транскриптом культуры клеток, повышая способность эндотелия к миграции, пролиферации и регуляции его целостности.

Таким образом, по совокупности полученных результатов можно заключить, что сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/фибрин обладают оптимальными структурными, физико-механическими, тромборезистентными, адгезионными и фидерными свойствами.

Выбранный режим прекондиционирования напряжением сдвига в свою очередь оказал на КФЭК адаптивное влияние, которое отразилось на фенотипе, синтетической активности и цитоскелетных перестройках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем диссертационном исследовании продемонстрирована возможность создания персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза, состоящего из двух аутологичных компонентов (эндотелиальной культуры и фибринового фидерного слоя). Также значимым этапом изготовления является применение физиологически обоснованной технологии прекондиционирования воссозданного эндотелиального монослоя к пульсирующему потоку.

Основой для сосудистого протеза послужили трубчатые каркасы, изготовленные методом электроспиннинга из смеси биodeградируемых полимеров: 5 % поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и 10 % раствора поли(ε-капролактона). И использованные полимеры обладают высокой биосовместимостью, контролируемой биodeградацией и нетоксичными продуктами распада. Метод электроспиннинга позволяет изготавливать 3D-матрицы с поверхностью, схожей со структурой внеклеточного матрикса и поэтому являющейся пригодной для полноценного ремоделирования.

Получение аутологичной культуры КФЭК от пациентов с предполагаемой эндотелиальной дисфункцией является значимой фундаментальной составляющей данного исследования, которая позволит не только создавать персонифицированные тканеинженерные конструкты и изделия для нужд регенеративной медицины, но и имеет потенциальное применение за рамками этого исследования, как в качестве экспериментальной модели, так и в роли культуры для имплантации в ишемизированную область.

Опираясь на теорию сосудистого происхождения КФЭК, было доказано, что количество предшественников КФЭК в моноклеарной фракции периферической крови и, тем более, в цельной 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 негемопоэтического 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.

С этой целью забор периферической крови от пациентов проводили во время процедуры аорто-коронарного шунтирования или чрескожного коронарного вмешательства. Известный факт травматизации и ишемии, сопровождающих данные процедуры, способен увеличить слущивание сосудистых клеток с внутренней поверхности сосудов и выхода их в кровотоки в гораздо большем количестве. Действительно было доказано, что в случае забора периферической крови у пациентов во время или сразу после ЧКВ при последующем культивировании МНФ забранной крови удавалось получить КФЭК в 87,5 % случаев, тогда как частота получения КФЭК из МНФ периферической крови при стандартной процедуре забора периферической крови не превысила 12,5 %.

Следующим оригинальным решением стала адаптация протокола культивирования МНФ периферической крови с целью получения большой клеточной массы колониеформирующих эндотелиальных клеток, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. С этой целью основной протокол культивирования клеток был адаптирован следующим образом: посев МНФ периферической крови проводили сразу на фибронектин, минуя высев на коллаген. Фибронектин лучше поддерживал дифференцировку культивируемой МНФ периферической крови в ранние ЭПК, а также стимулировал более раннее получение колоний КФЭК. Также видоизменение протокола культивирования заключалось во введении этапа раннего пассирования первых колоний – уже через 7 суток культивирования МНФ периферической крови. Это позволило улучшить рост пассированных

колоний за счет отсутствия соседства с клетками МНФ, не способными к дифференцировке в эндотелиальном направлении. Таким образом, осуществляли раннюю селекцию пролиферирующих ЭПК и индуцировали деление частично дифференцированных клеток с последующим их преобразованием до состояния предшественников, которые при дальнейшей своей дифференцировке давали большое количество КФЭК, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. В итоге, особенности забора крови и адаптация протокола культивирования на 75 % увеличили возможность получения КФЭК из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца.

Типирование клеток посредством проточной цитофлуориметрии и окраски специфическими иммунофлуоресцентными антителами с последующей конфокальной микроскопией позволило доказать, что полученные в ходе культивирования клетки не имели гемопозитического происхождения. В нашем исследовании популяция КФЭК на протяжении всего времени культивирования сохраняла стабильный фенотип зрелых эндотелиальных клеток негемопозитического происхождения: CD45–CD146+CD31+CD144+CD309+vWF+CD133–CD34+/- и была однородной по составу. Кроме того, культуры обладали свойствами, присущими эндотелиальным клеткам: типичной морфологией «булыжная мостовая», ангиогенной активностью, способностью поглощать Ac LDL и связывать лектин, синтезировать vWF.

Для полной и объективной оценки уровня экспрессии генов КФЭК по сравнению HCAEC и HUVEC было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq). Уровень генной экспрессии дифференциально экспрессированных генов КФЭК, HUVEC и HCAEC определил, что культура КФЭК экспрессирует маркеры артериальной, венозной и лимфатической спецификации, на фоне повышенной продукции структурных белков ВКМ и базальной мембраны (коллагена I и IV типов, соответственно) [4]. КФЭК обладали 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, KDR/CD309, CD34 и нейропилина-1. Экспрессия маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода свидетельствовала о переходном фенотипе КФЭК с точки зрения промежуточного уровня маркера артериальной эндотелиальной дифференцировки HEY2, маркеров лимфатической эндотелиальной дифференцировки LYVE1 и VEGFR3, и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода Snail и Slug по сравнению с HCAEC, которые гиперэкспрессировали HEY2, и HUVEC, которые гиперэкспрессировали маркер венозной эндотелиальной дифференцировки COUP-TFII соответственно. При этом для КФЭК была характерна выраженная экспрессия ангиопоэтина-2 и эндотелина-1. Таким образом, КФЭК можно отнести к истинным зрелым эндотелиальным клеткам и, соответственно, КФЭК можно использовать для заселения внутренней поверхности сосудистых протезов из биodeградируемых полимеров с целью формирования эндотелиального монослоя.

Высокопористый трубчатый каркас сосудистого протеза изготовлен из биodeградируемых полимеров полигидроксibuтират/валерата и поликапролактона, которые характеризуются высокой биосовместимостью и пригодными физико-механическими свойствами, однако не несут на своей поверхности сайтов клеточной адгезии. Были сравнены два белка внеклеточного матрикса в плане пригодности формирования фидерного слоя для эффективной клеточной адгезии: коллаген I типа и фибрин. Бычий коллаген I типа был введен в структуру полимерных волокон стенки сосудистых протезов в процессе изготовления протезов методом электроспиннинга. Белковое покрытие из фибрина, получаемого из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца,

создавалось после изготовления основного полимерного каркаса протеза посредством его заливки фибрином.

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

Свойства белка, использованного в качестве фидерного слоя, способны влиять на физико-механические свойства и тромборезистентность создаваемой конструкции. Доказано, что фибрин не ухудшил физико-механические свойства сосудистых протезов. Покрытие поверхности сосудистых протезов фибрином, полученным из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, позволило в 2 раза сократить жесткость протезов, ($p < 0,05$). При этом сосудистые протезы ПГБВ/ПКЛ/фибрин демонстрировали лучшую тромборезистентность по сравнению с протезами ПГБВ/ПКЛ/коллаген, что заключалось в уменьшении на 12 % максимума агрегации тромбоцитов и снижении в 1,5 раза индекса деформации тромбоцитов, ($p < 0,05$).

Оба типа сосудистых протезов способствовало адгезии ЭК в статических условиях культивирования. Однако методы культивирования сосудистых клеток *in vitro* не соответствуют физиологии и условиям функционирования данных клеток в организме. Физиологически обоснованная технология изготовления сосудистого протеза прекондиционирования базируется на адаптации клеток к естественным механическим нагрузкам.

Режимы прекондиционирования были выбраны после культивирования клеток в разных режимах пульсирующего потока с различной продолжительностью культивирования – 7 и 14 дней. Доказано, что при формировании эндотелиальной выстилки в условиях пульсирующего потока

использование фибрина покрытия поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ было предпочтительней введения коллагена в структуру ПГБВ/ПКЛ/коллаген сосудистых протезов, так как на 21 % повысило эффективность клеточной адгезии.

Оптимальный режим культивирования сочетал в себе следующие параметры пульсирующего потока: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд/мин; итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см², продолжительность культивирования 7 суток. Это подтверждено снижением жизнеспособности ЭК при увеличении срока культивирования с 7 суток до 14 суток, а также значительным снижением плотности популяции ЭК при увеличении напряжения сдвига с 2,85 дин/см² до 5,74 дин/см² вследствие низкого уровня клеточной адгезии.

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 сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген. На этом фоне жизнеспособность адгезированных эндотелиальных клеток на сосудистых протезах с фибриновым покрытием достигла 100 % в условиях сформированного клеточного монослоя.

Формирование эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности протеза ПГБВ/ПКЛ/фибрин в условиях напряжения сдвига привело к повышению не только адгезии КФЭК, но и средней интенсивности флуоресценции CD31, CD144, CD309 и F-актина на 7,7 %, в 2, 2,2, и 1,5 раза, соответственно, относительно аналогичных показателей КФЭК, культивируемых на поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/коллаген. Дополнительно в КФЭК, культивируемых в условиях пульсирующего потока на внутренней поверхности сосудистых протезов ПГБВ/ПКЛ/фибрин, наблюдали увеличением экспрессии генов, кодирующих белки с проангиогенными свойствами.

В ответ на пульсирующий поток в колониеформирующих эндотелиальных клетках выявлен повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов, регуляцию целостности эндотелия, стимуляцию ангиогенеза, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, регуляцию воспаления.

Таким образом, 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.

С учетом возможности получения из периферической крови пациента аутологичных компонент для создания сосудистого протеза (колониеформирующих эндотелиальных клеток и фибрина) обеспечено соблюдение персонифицированного подхода при создании тканеинженерного клеточнозаселенного сосудистого протеза.

ВЫВОДЫ

1. Забор периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца во время и сразу после процедуры чрескожного коронарного вмешательства и последующий посев полученной моноклеарной 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 негемопоезического 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 полигидроксibuтирата/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 наноприлл и высокая биосовместимость фибринового покрытия привели к улучшению удержания эндотелиальных клеток на внутренней поверхности сосудистого протеза с фибрином в статичных 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 персонифицированного 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 УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АКШ – аорто-коронарное шунтирование

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГМК – гладкомышечные клетки

ДЭГ – дифференциально экспрессируемые гены

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КФЭК – endothelial colony-forming cells / колониеформирующие эндотелиальные клетки человека

ПГБВ – полигидроксibuтират/валерат

ПКЛ – поликапролактон

ПГК – полигликолевая кислота

ПМК – полимолочная кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма

МНФ – моонуклеарная фракция

МСК – мезенхимальные стlловые клетки

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки

LEPC – late endothelial progenitor cells / «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки

Ac LDL – acetylated-low density lipoprotein / ацетилированные липопротеины низкой плотности

CD – cluster of differentiation / кластер дифференцировки

EtBr – ethidium bromide / этидиум бромид

ePTFE – expanded polytetrafluoroethylene / политетрафторэтилен

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

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

PET – polyethylene terephthalate / полиэтилентерефталат

vWF – von Willebrand factor / фактор фон Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние различных концентраций фибриногена на свойства фибриновой матрицы для тканевой сосудистой инженерии / В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Т. В. Глушкова и др. // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2021. – Т. 29. – №1. – С. 21–34.
2. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1 α и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра / Л. В. Антонова, В. В. Севостьянова, А. Г. Кутихин и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20. – № 1. – С. 96–109.
3. Возможность получения и характеристика колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца / В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова и др. // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 8. – С. 598–608.
4. Колониеформирующие эндотелиальные клетки – кандидатная культура для тканевой сосудистой инженерии: паспорт генного и протеомного профиля / М. Ю. Ханова, А. Г. Кутихин, В. Г. Матвеева и др. // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2023. – Т. 8. – № 4. – С. 37–53.
5. Модификация поверхности полимерных сосудистых графтов фибрином не уменьшает их тромборезистентность / Е. А. Великанова, Т. В. Глушкова, Т. Н. Ацентьева и др. // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2020. – Т. 5. – № 2. – С. 22–29.
6. Оценка *in vitro* активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матрицы на основе полигидроксibuтирата/ валерата и поликапролактона / Л. В. Антонова, В. Г. Матвеева, Е. А. Великанова и др. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2018. – Т. 7. – № 2. – С. 89–101.

7. Применение полиоксиалканоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутирата / А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева, И. В. Решетов и др. // ACTA NATURAE. – 2019. – Т. 11. – № 2 (41). – С. 4–16.
8. Раздельная подача коллагена I типа и поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата)/поли(ε-капролактона) при электроспиннинге повышает биосовместимость сосудистых графтов: тестирование *in vitro* / Е. А. Великанова, Л. В. Антонова, В. В. Севостьянова и др. // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2017. – Т. 2. – № 4. – С. 6–13.
9. Севастьянов, В. И. Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянов, М. П. Кирпичников. – Москва: МИА. 2011. – 544 с.
10. Севастьянов, В. И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В. И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – № 3. – С. 93–108.
11. Севостьянова, В. В. Биомеханические стимулы в регуляции формирования сосудистой ткани *in vitro* / В. В. Севостьянова, Е. А. Великанова // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 6. – С. 417–429.
12. Усиление адгезии стволовых прогениторных клеток к синтетическим материалам внеклеточным матриксом / А. П. Лыков, О. В. Повещенко, Н. А. Бондаренко и др. // Вестник РАМН. – 2017. – Т. 72. – № 5. – С. 336–345.
13. Фибрин – перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии / В. Г. Матвеева, М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. XXII. – № 1. – С. 196–208.
14. Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза малого диаметра в условиях потока / М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. XXIII. – № 3. – С. 101–114.

15. Ханова, М. Ю. 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.
16. Эффективность использования эндотелиальных колониеформирующих клеток для создания тканеинженерного сосудистого протеза в условиях *in vitro* / Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, Е. О. Кривкина и др. // *Современные технологии в медицине*. – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 44–51.
17. A completely biological “off-the-shelf” arteriovenous graft that recellularizes in baboons / Z. H. Syedain, M. L. Graham, T. B. Dunn [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 9 – № 414. – P. eaan4209.
18. A fibrinogen preparations for tissue engineering approaches / T. Aper, M. Kolster, A. Hilfiker [et al.] // *J Bioengineer & Biomedical Sci.* – 2012. – Vol. 2. – P. 115.
19. A molecular map of murine lymph node blood vascular endothelium at single cell resolution / K. Brulois, A. Rajaraman, A. Szade [et al.] // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 3798.
20. A novel small diameter nanotextile arterial graft is associated with surgical feasibility and safety and increased transmural endothelial ingrowth in pig / J. Joseph, V. Domenico Bruno, N. Sulaiman [et al.] // *J Nanobiotechnol.* – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 71.
21. Ahmed, T. A. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications / T. A. Ahmed, E. V. Dare, M. Hincke // *Tissue Eng Part B Rev.* – 2008. – Vol. 14. – № 2. – P. 199–215.
22. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms / W. C. Aird // *Circ Res.* – 2007. – Vol. 100. – № 2. – P. 158–173.
23. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel / C. Quint, M. Arief, A. Muto [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2012. – Vol. 55. – № 3. – P. 790–798.

24. Alteration of human umbilical vein endothelial cell gene expression in different biomechanical environments / S. Shoajei, M. Tafazzoli-Shahdpour, M. A. Shokrgozar [et al.] // *Cell Biol Int.* – 2014. – Vol. 38. – № 5. – P. 577–581.
25. An investigation of the constructional design components affecting the mechanical response and cellular activity of electrospun vascular grafts / S. Ozdemir, I. Yalcin-Enis, B. Yalcinkaya [et al.] // *Membranes (Basel)*. – 2022. – Vol. 12. – № 10. – P. 929.
26. Antibody-conjugated electrospun vascular scaffolds to enhance in situ endothelialization / L. West-Livingston, Y. M. Ju, H. Lee [et al.] // *ACS Appl Bio Mater.* – 2020. – Vol. 3. – № 7. – P. 4486–4494.
27. Arterial reconstruction with human bioengineered acellular blood vessels in patients with peripheral arterial disease / P. Gutowski, S. M. Gage, M. Guziewicz [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2020. – Vol. 72. – № 4. – P. 1247–1258.
28. Autologous endothelialized small-caliber vascular grafts engineered from blood-derived induced pluripotent stem cells / M. Generali, E. A. Casanova, D. Kehl [et al.] // *Acta Biomater.* – 2019. – Vol. 97. – P. 333–343.
29. Azimi-Nezhad, M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology / M. Azimi-Nezhad // *Rep Biochem Mol Biol.* – 2014. – Vol. 2. – № 2. – P. 59–69.
30. Bai, H. Decellularized carotid artery functions as an arteriovenous graft / H. Bai, A. Dardik, Y. Xing // *J. Surg. Res.* – 2019. – Vol. 234. – P. 33–39.
31. Banno, K. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair / K. Banno, M. C. Yoder // *Pediatr Res.* – 2018. – Vol. 83. – P. 283–290.
32. Barry, A. K. Local VE-cadherin mechanotransduction triggers long-ranged remodeling of endothelial monolayers / A. K. Barry, N. Wang, D. E. Leckband // *J Cell Sci.* 2015. – Vol. 128. – № 7. – P. 1341–1351.
33. Biocompatibility of small-diameter vascular grafts in different modes of RGD modification / L. V. Antonova, V. N. Silnikov, V. V. Sevostyanova [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 174.

34. Biodegradable and Electroactive Poly(Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) Based Morphologies for Tissue Engineering Applications / L. Amaro, D. M. Correia, T. Marques-Almeida [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19. – № 8. – P. 2149.

35. Biodegradable patches for arterial reconstruction modified with RGD peptides: results of an experimental study / V. V. Sevostianova, L. V. Antonova, A. V. Mironov [et al.] // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5. – № 34. – P. 21700–21711.

36. Bioengineered human acellular vessels recellularize and evolve into living blood vessels after human implantation / R. D. Kirkton, M. Santiago-Maysonet, J. H. Lawson [et al.] // *Sci Transl Med.* — 2019. – 11. – № 485. – P. eaau6934.

37. Bioresorbable silk grafts for small diameter vascular tissue engineering applications: In vitro and in vivo functional analysis / P. Gupta, K. L. Lorentz, D. G. Haskett [et al.] // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 105. – P. 146–158.

38. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis / D. M. Smadja, I. Bièche, J. S. Silvestre [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – Vol. 28. – № 12. – P. 2137–2143.

39. Buttery, Lee D.K. Introduction to tissue engineering. Biomater / Lee D. K. Buttery, A. E. Bishop // *Artif. Organs Tissue Eng, Elsevier Inc.* – 2005. – P. 193–200.

40. Carrel, T. Current Trends in Selection of Conduits for Coronary Artery Bypass Grafting. Gen / T. Carrel, B. Winkler // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2017. – Vol. 65. – P. 549–556.

41. Ceccarelli, J. Sculpting the blank slate: How fibrin's support of vascularization can inspire biomaterial design / J. Ceccarelli, A. J. Putnam // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10. – № 4. – P. 1515–1523.

42. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis / J. Hur, C. H. Yoon, H. S. Kim [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – № 2. – P. 288–293.

43. Charbonier, F. W. Endothelial cell mechanotransduction in the dynamic vascular environment / F. W. Charbonier, M. Zamani, N. F. Huang. // *Adv Biosyst.* – 2019. – Vol. 3. – № 2. – P. 1800252.
44. Charrier, E. E. Control of cell morphology and differentiation by substrates with independently tunable elasticity and viscous dissipation / E. E. Charrier, K. Pogoda, R. G. Wells // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 449.
45. Chavkin, N.W. Single cell analysis in vascular biology / N. W. Chavkin, K. K. Hirschi // *Front Cardiovasc Med.* – 2020. – Vol. 7. – P. 42.
46. Chien, S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell / S. Chien // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – № 3. – P. H1209–24.
47. Chiu, J. J. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives / J. J. Chiu, S. Chien // *Physiol Rev.* – 2011. – Vol. 91. – № 1. – P. 327–387.
48. Collagen for bone tissue regeneration / A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono [et al.] // *Acta Biomater.* – 2012.– Vol. 8. – № 9. – P. 3191–3200.
49. Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine / F. Copes, N. Pien, S. Van Vlierberghe [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 166.
50. Comparison of fibronectin and collagen in supporting the isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood / E. Colombo, F. Calcaterra, M. Cappelletti [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e66734.
51. Conduits Used in Coronary Artery Bypass Grafting: A Review of Morphological Studies / B. Martínez-González, C. G. Reyes-Hernández, A. Quiroga-Garza [et al.] // *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* – 2017. – Vol. 23. – № 2. – P. 55–65.
52. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria / E. A. Jaffe, R. L.

Nachman, C. G. Becker [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1973. – Vol. 52. – P. 2745–2756.

53. Current state of U.S. food and drug administration regulation for cellular and gene therapy products: potential cures on the horizon / M. Mendicino, Y. Fan, D. Griffin [et al.] // *Cytotherapy*. – 2019. – Vol. 21. – P. 699–724.

54. Cyclic tensile strain enhances osteogenesis and angiogenesis in mesenchymal stem cells from osteoporotic donors / A. Charoenpanich, M. E. Wall, C. J. Tucker [et al.] // *Tissue Eng Part A*. – 2014. – Vol. 20 – № 1-2. – P. 67–78.

55. Dardik, A. Chronic in vitro shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent in vivo neointimal thickness / A. Dardik, A. Liu, B. J. Ballermann // *J Vasc Surg*. – 1999. – Vol. 29. – № 1. – P. 157–167.

56. Davies, P. F. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology / P. F. Davies // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. – 2009. – Vol. 6. – № 1. – P. 16–26.

57. Design and comprehensive assessment of a biomimetic tri-layer tubular scaffold via biodegradable polymers for vascular tissue engineering applications / W. Jia, M. Li, H. Weng [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. – 2020. – Vol. 110. – P. 110717.

58. Determination of early and late endothelial progenitor cells in peripheral circulation and their clinical association with coronary artery disease / S. Tagawa, C. Nakanishi, M. Mori [et al.] // *Int. J. Vasc. Med*. – 2015. – P. 674213.

59. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions / S. J. Lee, J. Liu, S. H. Oh [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – Vol 29. – № 19. – P. 2891–2898.

60. Devillard, C. D. Vascular tissue engineering: challenges and requirements for an ideal large scale blood vessel / C. D. Devillard, C. A. Marquette // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2021. – Vol. 9. – P. 721843.

61. Disturbed flow increases endothelial inflammation and permeability via a Frizzled-4- β -catenin-dependent pathway / M. Rickman, M. Ghim, K. Pang [et al.] // *J Cell Sci.* – 2023. – Vol. 136. – № 6. – P. jcs260449.
62. Effect of process parameters on additive-free electrospinning of regenerated silk fibroin nonwovens / A. Kopp, R. Smeets, M. Gosau [et al.] // *Bioact Mater.* – 2020. – Vol. 5. – № 2. – P. 241–252.
63. Efficient differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endothelial cells in vitro / C. Wang, Y. Li, M. Yang [et al.] // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2018. – Vol. 55. – № 2. – P. 257–265.
64. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells into endothelial cells under xenogeneic-free conditions for vascular tissue engineering / J. Luo, X. Shi, Y. Lin [et al.] // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol. 119. – P. 184–196.
65. Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study / Y. M. Ju, H. Ahn, J. Arenas-Herrera [et al.] // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 59. – P. 58–67.
66. Endothelial Cell Biomechanical Responses are Dependent on Both Fluid Shear Stress and Tensile Strain / D. Meza, B. Musmacker, E. Steadman [et al.] // *Cell Mol Bioeng.* – 2019. – Vol. 12. – № 4. – P. 311–325.
67. Endothelial cell rearrangements during vascular patterning require PI3-kinase-mediated inhibition of actomyosin contractility / A. Angulo-Urarte, P. Casado, S. D. Castillo [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 4826.
68. Endothelial mechanotransduction mechanisms for vascular physiology and atherosclerosis / T. Zhou, Y. Zheng, J. Qiu J [et al.] // *J. Mech. Med. Biol.* – 2014. – Vol. 14. – P. 1430006.
69. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature / R. J. Medina, C. L. Barber, F. Sabatier [et al.] // *Stem Cells Transl Med.* – 2017. – Vol. 6. – № 5. – P. 1316–1320.
70. Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes / C. Souilhol, J. Serbanovic-Canic, M. Fragiadaki [et al.] // *Nat Rev Cardiol.* – 2020. – Vol. 17. – № 1. – P. 52–63.

71. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood / V. Matveeva, M. Khanova, E. Sardin [et al.] // *International Journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 11. – P. 3453.
72. Enhanced Patency and Endothelialization of Small-Caliber Vascular Grafts Fabricated by Coimmobilization of Heparin and Cell-Adhesive Peptides / W. S. Choi, Y. K. Joung, Y. Lee [et al.] // *ACS Appl Mater Interfaces*. – 2016. – Vol. 8. – № 7. – P. 4336–4346.
73. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34+VEGFR-3+ endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C / H. F. Zhang, Y. L. Wang, Y. Z. Tan [et al.] // *Basic Res Cardiol*. – 2019. – Vol. 114. – № 6. – P. 43.
74. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors / M. Kolbe, E. Dohle, D. Katerla [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2010. – Vol. 16. – № 5. – P. 877–886.
75. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway / J. J. Steinle, C. J. Meininger, R. Forough [et al.] // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 277. – № 46. – P. 43830–43835.
76. Erythro-myeloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels / A. Plein, A. Fantin, L. Denti [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 562. – № 7726. – P. 223–228.
77. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo / L. Zhao, X. Li, L. Yang [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2021. – Vol. 118. – P. 111441.
78. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis / N. Ferrara // *Kidney Int*. – 1999. – Vol. 56. – № 3. – P. 794–814.
79. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells / M. C.

Barsotti., A. Magera, C. Armani [et al.] // Cell Prolifera-tion. – 2011. – Vol. 44. – №1. – P. 33–48.

80. Fibrin hydrogel as a scaffold for differentiation of induced pluripotent stem cells into oligodendrocytes / B. Nazari, M. Kazemi, A. Kamyab [et al.] // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. – 2020. – Vol. 108. – № 1. – P. 192–200.

81. Fibrin matrices as (injectable) biomaterials: formation, clinical use, and molecular engineering / I. V. Roberts, D. Bukhary, C. Y. L. Valdivieso [et al.] // Macromol Biosci. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. e1900283.

82. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature / X. Yang, L. Liaw, I. Prudovsky [et al.] // Curr. Atheroscler. Rep. – 2015. – Vol. 17. – № 6. – P. 509.

83. Flexible, Suturable, and Leak-free Scaffolds for Vascular Tissue Engineering Using Melt Spinning / J. Fernández-Pérez, K. A. van Kampen, C. Mota [et al.] // ACS Biomater Sci Eng. – 2023. – Vol. 9. – № 8. – P. 5006–5014.

84. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells / S. Obi, K. Yamamoto, N. Shimizu [et al.] // J Appl Physiol. – 2009. – Vol. 106. – № 1. – P. 203–211.

85. Fiber diameters control osteoblastic cell migration and differentiation in electrospun gelatin / K. Sisson, C. Zhang, M. C. Farach-Carson [et al.] // J Biomed Mater Res A. 2010. – Vol. 94. – № 4. – P. 1312–1320.

86. Fuchs, S. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures / S. Fuchs, M. I. Hermanns, C. J. Kirkpatrick // Cell Tissue Res. – 2006.– Vol. 326. – № 1. – P. 79–92.

87. Future perspectives in small-diameter vascular graft engineering / P. Mallis, A. Kostakis, C. Stavropoulos-Giokas [et al.] // Bioengineering (Basel). – 2020. – Vol. 7 – № 4. – P. 160.

88. Golledge, J. Update on the pathophysiology and medical treatment of peripheral artery disease / J. Golledge // Nature Reviews Cardiology. – 2022. –Vol. 19. – P. 456–474.

89. Harburger, D. S. Integrin signalling at a glance / D. S. Harburger, D. A. Calderwood // *J Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122. – № 2. – P. 159–163.

90. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association / C. W. Tsao, A. W. Aday, Z. I. Almarzooq [et al.] // *Circulation.* – 2022. – Vol. 145. – № 8. – P. e153-e639.

91. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF / D. B. Pike, S. Cai, K. R. Pomraning [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27. – № 30. – P. 5242–5251.

92. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo / Y. Cao, Z. Sun, L. Liao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 332. – P. 370–379.

93. Human dental pulp stem cell adhesion and detachment in polycaprolactone electrospun scaffolds under direct perfusion / A. Paim, D. Braghirolli, N. Cardozo [et al.] // *Braz J Med Biol Res.* – 2018. – Vol. 51. – № 5. – P. e6754.

94. Improved mechanical properties by modifying fibrin scaffold with PCL and its biocompatibility evaluation / L. Yang, X. Li, D. Wang [et al.] // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2020. – Vol. 31. – № 5. – P. 658–678.

95. In situ blood vessel regeneration using SP (Substance P) and SDF (Stromal Cell-Derived Factor)-1 α peptide eluting vascular grafts / M. Shafiq, Q. Zhang, D. Zhi [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2018. – Vol. 38. – № 7. – P. e117–e134.

96. In situ endothelialization of intravascular stents from progenitor stem cells coated with nanocomposite and functionalized biomolecules / M. S. Motwani, Y. Rafiei, A. Tzifa [et al.] // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2011. – Vol. 58. – № 1. – P. 2–13.

97. In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system

bioreactor / A. J. Melchiorri, L. G. Bracaglia, L. K. Kimerer [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2016. – Vol. 22. – № 7. – P. 663–670.

98. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis / R. Brüttsch, S. S. Liebler, J. Wüstehube [et al.] // *Circ Res*. – 2010. – Vol. 107. – № 5. – P. 592–601.

99. Interaction of fibrin (ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site / E. Makogonenko, G. Tsurupa, K. Ingham [et al.] // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – № 25. – P. 7907–7913.

100. Intravascular ultrasound characterization of a tissue-engineered vascular graft in an ovine model / V. K. Pepper, E. S. Clark, C. A. Best [et al.] // *J. Cardiovasc. Trans. Res*. – 2007. – Vol. 10. – № 2. – P. 128–138.

101. ISO 10993-4:2017 (en). Biological evaluation of medical devices. Part 4: Selection of tests for interactions with blood.

102. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan [et al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – P. 964–967.

103. Jana, S. Endothelialization of cardiovascular devices / S. Jana // *Acta Biomater*. – 2019. – Vol. 99. – P. 53–71.

104. Kechagia, J. Z. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment / J. Z. Kechagia, J. Ivaska, P. Roca-Cusachs // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2019. – Vol. 20. – № 8. – P. 457–473.

105. KLF4 Promotes Angiogenesis by Activating VEGF Signaling in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells / Y. Wang, C. Yang, Q. Gu [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 6. – P. e0130341.

106. La, A. Shear conditioning of adipose stem cells for reduced platelet binding to engineered vascular grafts / A. La, R. T. Tranquillo // *Tissue Eng Part A*. – 2018. – Vol. 24. – № 15–16. – P. 1242–1250.

107. Laminar Flow Protects Vascular Endothelial Tight Junctions and Barrier Function via Maintaining the Expression of Long Non-coding RNA

MALAT1 / F. Yang, Y. Zhang, J. Zhu [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 647.

108. Li, G. Silk fibroin-based biomaterials for tissue engineering applications / G. Li, S. Sun // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27. – № 9. – P. 2757.

109. Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network / G. Soldani, P. Losi, M. Bernabei [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31. – № 9. – P. 2592–2605.

110. Long-term graft patency after coronary artery bypass grafting: Effects of morphological and pathophysiological factors / G. Tinica, R. O. Chistol, M. Enache [et al.] // *Anatol J Cardiol.* – 2018. – Vol. 20. – № 5. – P. 275–282.

111. Long-Term Patency of Saphenous Vein and Left Internal Mammary Artery Grafts after Coronary Artery Bypass Surgery: Results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study / S. Goldman, K. Zadina, T. Moritz [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2004. – Vol. 44. – P. 2149–2156.

112. Low shear stress induces endothelial cell apoptosis and monocyte adhesion by upregulating PECAM-1 expression / X. Xie, F. Wang, L. Zhu [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2020. – Vol. 21. – № 6. – P. 2580–2588.

113. Matrix regeneration ability in situ induced by a silk fibroin small-caliber artificial blood vessel in vivo / H. Li, M. Dai, M. Li [et al.] // *Polymers (Basel).* – 2022. – Vol. 14. – № 18. – P. 3754.

114. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies / A. Muto, L. Model, K. Ziegler [et al.] // *Circ J.* – 2010. – Vol. 74. – № 8. – P. 1501–1512.

115. Mesenchymal stem versus stromal cells: international society for cell & gene therapy (ISCT®) mesenchymal stromal cell committee position statement on nomenclature / S. Viswanathan, Y. Shi, J. Galipeau [et al.] // *Cytotherapy.* – 2019. – Vol. 21. – P. 1019–1024.

116. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Production Compliant with Good Manufacturing Practice: Comparison between Bone Marrow, the Gold Standard

Adult Source, and Wharton's Jelly, an Extraembryonic Source / C. Laroye, M. Gauthier, H. Antonot [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2019. – Vol. 8. – № 12. – P. 2207.

117. MicroRNA-34a targets forkhead box j2 to modulate differentiation of endothelial progenitor cells in response to shear stress / B. B. Cheng, M. J. Qu, L. L. Wu [et al.] // *J Mol Cell Cardiol*. – 2014. – Vol. 74. – P. 4–12.

118. Milestones and current achievements in development of multifunctional bioscaffolds for medical application / J. Litowczenko, M. J. Woźniak-Budych, K. Staszak [et al.] // *Bioact Mater*. – 2021. – Vol. 6. – № 8. – P. 2412–2438.

119. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities / R. J. Medina, C. L. O'Neill, M. Sweeney [et al.] // *BMC Med Genomics*. – 2010. – Vol. 3. – P. 18.

120. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8 / R. J. Medina, C. L. O'Neill, T. M. O'Doherty [et al.] // *Mol Med*. – 2011. – Vol. 17. – № 9–10. – P. 1045–1455.

121. Nano- and micropatterned polycaprolactone cellulose composite surfaces with tunable protein adsorption, fibrin clot formation, and endothelial cellular response / T. Mohan, C. Nagaraj, B. M. Nagy [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2019. – Vol. 20. – № 6. – P. 2327–2337.

122. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells / I. M. Evans, M. Yamaji, G. Britton [et al.] // *Mol Cell Biol*. – 2011. – Vol. 31. – № 6. – P. 1174–1185.

123. Niklason, L. E. Bioengineered human blood vessels / L. E. Niklason, J. H. Lawson // *Science*. – 2020. – Vol. 370. – № 6513. – P. eaaw8682.

124. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix / T. Aper, M. Wilhelmi, C. Gebhardt [et al.] // *Acta Biomater*. – 2016. – Vol. 29. – P. 21–32.

125. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity / L. Gifre-Renom, M. Daems, A. Luttun [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1477.

126. Osteoblasts and fibroblasts attachment to poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydrovaleric acid) (PHBV) film and electrospun scaffolds / Ł. Kaniuk, Z. J. Krysiak, S. Metwally [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2020. – Vol. 110. – P. 110668.

127. Outcome of Infrainguinal Single-Segment Great Saphenous Vein Bypass for Critical Limb Ischemia Is Superior to Alternative Autologous Vein Bypass, Especially in Patients with High Operative Risk / E. Arvela, M. Venermo, M. Soderstrom [et al.] // *Ann. Vasc. Surg.* – 2012. – Vol. 26. – P. 396–403.

128. Park, C. H. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Noh I., editor. *Biomimetic Medical Materials From Nanotechnology to 3D Bioprinting. Advances in Experimental Medicine and Biology* / C. H. Park, K. M. Woo // Seoul, South Korea: Springer Nature Singapore Pte Ltd. – 2018. – Vol. 1064. – P. 253–261.

129. Park, J. W. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration / J. W. Park, S. R. Hwang, I. S. Yoon // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22. – № 8. – P. 1259.

130. Patency rate and complications of polytetrafluoroethylene grafts compared with polyurethane grafts for hemodialysis access / H. Ravari, G. H. Kazemzade, M. H. S. Modaghegh [et al.] // *Ups J Med Sci.* – 2010. – Vol. 115. – № 4. – P. 245–248.

131. Physiological pulsatile flow culture conditions to generate functional endothelium on a sulfated silk fibroin nanofibrous scaffold / X. Gong, H. Liu, X. Ding [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – Vol. 35. – № 17. – P. 4782–4791.

132. Point-of-care adipose-derived stromal vascular fraction cell isolation and expanded polytetrafluoroethylene graft sodding / S. K. Williams, M. E. Morris, P. E. Kosnik [et al.] // *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2017. – Vol. 23. – № 8. – P. 497–504.

133. Popov, G. Is it possible to create readily available tissue-engineered vascular grafts without using cells? / G. Popov, V. Vavilov, P. Popryaduhin // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2019. – Vol. 58. – № 6. – S. 1. – P. e190–e191.

134. Preparation and characterization of electrospun PCL/silk fibroin scaffolds / E. Govorčin Bajsić, E. Zdraveva, T. Holjevac Grgurić [et al.] // *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.* – 2021. – Vol. 35. – № 1. – P. 31–42.

135. Radial-artery or saphenous-vein grafts in coronary-artery bypass surgery / M. Gaudino, U. Benedetto, S. Fremes [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – Vol. 378. – № 22. – P. 2069–2077.

136. Readily available tissue-engineered vascular grafts / S. L. Dahl, A. P. Kypson, J. H. Lawson [et al.] // *Sci Transl Med.* – 2011. – Vol. 3. – № 68. – P. 68ra9.

137. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation / C. Keighron, C. J. Lyons, M. Creane [et al.] // *Front Med (Lausanne).* – 2018. – Vol. 5. – P. 354.

138. Richardson, M. R. Endothelial progenitor cells: quo vadis? / M. R. Richardson, M. C. Yoder // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 50. – № 2. – P. 266–272.

139. Role of Bone Marrow Mononuclear Cell Seeding for Nanofiber Vascular Grafts / T. Fukunishi, C. A. Best, C. S. Ong [et al.] // *Tissue Eng Part A.* – 2018. – Vol. 24. – № 1-2. – P. 135–144.

140. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium / G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein [et al.] // *Nature.* – 1995. – Vol. 376. – № 6535. – P. 66–70.

141. Sanchez, P. F. Endothelialization mechanisms in vascular grafts / P. F. Sanchez, E. M. Brey, J. C. Briceno // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2018. – Vol. 12. – № 11. – P. 2164–2178.

142. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery / E. Caliskan, D. R. de Souza, A. Böning [et al.] // *Nat Rev Cardiol.* –2020. – Vol. 17. – P. 155–169.

143. Selection of different endothelialization modes and different seed cells for tissue-engineered vascular graft / Q. Cai, W. Liao, F. Xue [et al.] // *Bioactive materials.* – 2021. – Vol. 6. – № 8. – P. 2557–2568.

144. Shafi, O. Switching of vascular cells towards atherogenesis, and other factors contributing to atherosclerosis: a systematic review / O. Shafi // *Thromb J.* – 2020. – Vol. 18. – P. 28.

145. Shear stress and circumferential stretch by pulsatile flow direct vascular endothelial lineage commitment of mesenchymal stem cells in engineered blood vessels / D. H. Kim, S. J. Heo, Y. G. Kang [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2016. – Vol. 27. – № 3. – P. 60.

146. Shear Stress Regulation of Endothelial Glycocalyx Structure Is Determined by Glucobiosynthesis / G. Wang, S. Kostidis, G. L. Tiemeier [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2020. – Vol. 40. – № 2. – P. 350–364.

147. Shear stress with appropriate time-step and amplification enhances endothelial cell retention on vascular grafts / H. Liu, X. Gong, X. Jing [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2017. – Vol. 11. – № 11. – P. 2965–2978.

148. Short term results of fibrin gel obtained from cord blood units: a preliminary in vitro study / P. Mallis, I. Gontika, Z. Dimou [et al.] // *Bioengineering.* –2019. – Vol. 6. – P. 66.

149. Shoulders, M. D. Collagen structure and stability / M. D. Shoulders, R. T. Raines // *Annu Rev Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 929–958.

150. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice / T. Veikkola, L. Jussila, T. Makinen [et al.] // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20. – № 6. – P. 1223–1231.

151. Single-Cell RNA Sequencing Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. / D. T. Paik, L. Tian, I. M. Williams [et al.] // *Circulation.* – 2020. – Vol. 142. – № 19. – P. 1848–1862.

152. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells / J. Kalucka, L. P. M. H. de Rooij, J. Goveia [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 180. – № 4. – P. 764–779.e20.

153. Single-cell transcriptomic profiling and characterization of endothelial progenitor cells: new approach for finding novel markers / M. E. Abdelgawad, C. Desterke, G. Uzan [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 145.

154. Single-cell transcriptomics reveals cell-type-specific diversification in human heart failure / A. L. Koenig, I. Shchukina, J. Amrute [et al.] // *Nat Cardiovasc Res*. – 2022. – Vol. 1. – № 3. – P. 263–280.

155. Smart materials as scaffolds for tissue engineering / F. Rosso, G. Marino, A. Giordano [et al.] // *J Cell Physiol*. – 2005. – Vol. 203. – № 3. – P. 465–470.

156. Snyder, Y. Fibrin gel enhanced trilayer structure in cell-cultured constructs / Y. Snyder, S. Jana // *Biotechnol Bioeng*. – 2023. – Vol. 120. – № 6. – P. 1678–1693.

157. Stimulation of Caveolin-1 Signaling Improves Arteriovenous Fistula Patency / T. Hashimoto, T. Isaji, H. Hu [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2019. – Vol. 39. – № 4. – P. 754–776.

158. Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts / H. Yuan, C. Chen, Y. Liu [et al.] // *J Biomed Mater Res A*. – 2020. – Vol. 108. – № 3. – P. 426–445.

159. Strategies to counteract adverse remodeling of vascular graft: A 3D view of current graft innovations. *Front* / W. Tan, P. Boodagh, P. P. Selvakumar [et al.] // *Bioeng Biotechnol*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1097334.

160. Strohbach, A. Predicting the In Vivo Performance of Cardiovascular Biomaterials: Current Approaches In Vitro Evaluation of Blood-Biomaterial Interactions / A. Strohbach, R. Busch // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – Vol. 22. – № 21. – P. 11390.

161. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications / X. Ren, Y. Feng, J. Guo [et al.] // *Chem Soc Rev.* – 2015. – Vol. 44. – № 15. – P. 5680–5742.

162. Surface modification of electrospun scaffolds for endothelialization of tissue-engineered vascular grafts using human cord blood-derived endothelial cells / D. C. Ardila, J. J. Liou, D. Maestas [et al.] // *J Clin Med.* – 2019. – Vol. 8. – № 2. – P. 185.

163. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases / C. H. Yoon, J. Hur, K. W. Park [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – № 11. – P. 1618–1627.

164. Systematic assessment in an animal model of the angiogenic potential of different human cell sources for therapeutic revascularization / G. R. Barclay, O. Tura, K. Samuel [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy.* – 2012. – Vol. 3. – № 4. – P. 23.

165. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell.* – 2006. – Vol. 126. – № 4. – P. 663–676.

166. The application of induced pluripotent stem cells in pathogenesis study and gene therapy for vascular disorders: current progress and future challenges / G-Y. Peng, Y. Lin, J-J. Li [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2019. – P. 9613258.

167. The crescendo pulse frequency of shear stress stimulates the endothelialization of bone marrow mesenchymal stem cells on the luminal surface of decellularized scaffold in the bioreactor / Y. Jiao, Y. Zhang, Y. Xiao [et al.] // *Bioengineered.* – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 7925–7938.

168. The current position of precuffed expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts in peripheral vascular surgery / J. van der Slegt, S. L. Steunenbergh, J. M. Donker [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2014. – Vol. 60. – № 1. – P. 120–128.

169. The effect of mechanical stress on the proliferation, adipogenic differentiation and gene expression of human adipose-derived stem cells / N. E. Paul, B. Denecke, B. S. Kim [et al.] // *Tissue Eng Regen Med.* – 2018. – Vol. 12. – № 1. – P. 276–284.

170. The effect of shear stress reduction on endothelial cells: A microfluidic study of the actin cytoskeleton / M. Inglebert, L. Locatelli, D. Tsvirkun [et al.] // *Biomicrofluidics.* – 2020. – Vol. 14. – № 2. – P. 024115.

171. The Evolution of tissue engineered vascular graft technologies: from preclinical trials to advancing patient care / Y. Matsuzaki, K. John, T. Shoji [et al.] // *Appl. Sci.* – 2019. – Vol. 9. – № 7. – P. 1274.

172. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering / F. Wang, Y. Li, Y. Shen [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol. 14. – № 7. – P. 13447–13462.

173. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction / B. W. Tillman, S. K. Yazdani, S. J. Lee [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30. – № 4. – P. 583–588.

174. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane / P. J. Strong Laycock B, S. N. Mahamud, P. D. Jensen [et al.] // *Microorganisms.* – 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 11.

175. The Role of Heparan Sulfate and Neuropilin 2 in VEGFA Signaling in Human Endothelial Tip Cells and Non-Tip Cells during Angiogenesis In Vitro / M. G. Dallinga, Y. I. Habani, A. W. M. Schimmel [et al.] // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 4. – P. 926.

176. The science and ethics of induced pluripotency: What will become of embryonic stem cells? / D. G. Zacharias, T. J. Nelson, P. S. Mueller [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* – 2011. – Vol. 86. – P. 634–640.

177. The stability evaluation of mesenchymal stem cells differentiation toward endothelial cells by chemical and mechanical stimulation / E. Hasanzadeh, G. Amoabediny, N. Haghighipour [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2017. – Vol. 53. – № 9. – P. 818–826.

178. Three-Layered Silk Fibroin Tubular Scaffold for the Repair and Regeneration of Small Caliber Blood Vessels: From Design to in vivo Pilot Tests / A. Alessandrino, A. Chiarini, M. Biagiotti [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2019. – Vol. 29. – № 7. – P. 356.

179. Tissue engineered vascular grafts: current state of the field / C. S. Ong, X. Zhou, C. Y. Huang [et al.] // *Expert Rev Med Devices.* – 2017. – Vol. 14. – № 5. – P. 383–392.

180. Tissue Engineering at the blood-contacting surface: a review of challenges and strategies in vascular graft development / D. Radke, W. Jia, D. Sharma [et al.] // *Adv. Healthc. Mater.* – 2018. – Vol. 7. – № 15. – P. e1701461.

181. Tissue-engineered vascular grafts in children with congenital heart disease: intermediate term follow-up / T. Sugiura, G. Matsumura, S. Miyamoto [et al.] // *Semin. Thorac. Cardiovasc Surg.* – 2018. – Vol. 30. – P. 175–179.

182. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth / K. M. Blum, J. C. Zbinden, A. B. Ramachandra [et al.] // *Commun Med (Lond).* – 2022. – Vol. 2. – P. 3.

183. Transmural capillary ingrowth is essential for confluent vascular graft healing / T. Pennel, D. Bezuidenhout, J. Koehne [et al.] // *Acta Biomater.* – 2018. – Vol. 65. – P. 237–247.

184. Transplanted endothelial progenitor cells improve ischemia muscle regeneration in mice by diffusion tensor MR imaging / X. G. Peng, Y. Bai, J. R. James [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2016. – P. 3641401.

185. Ucuzian, A. A. In vitro models of angiogenesis / A. A. Ucuzian, H. P. Greisler // *World J Surg.* – 2007. – Vol. 31. – № 4. – P. 654–663.

186. Van de Walle, A. B. Sequential adaptation of perfusion and transport conditions significantly improves vascular construct recellularization and biomechanics / A. B. Van de Walle, M. C. Moore, P. S. McFetridge // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2020. – Vol. 14. – № 3. – P. 510–520.

187. van Haaften, E. E. Vascular mechanobiology: towards control of in situ regeneration / E. E. van Haaften, C. V. C. Bouten, N. A. Kurniawan // *Cells*. – 2017. – Vol. 6. – № 3. – P. 19.
188. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis / M. Inoue, H. Itoh, M. Ueda [et al.] // *Circulation*. – 1998. – Vol. 98. – № 20. – P. 2108–2116.
189. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt / J. Nishi, T. Minamino, H. Miyauchi [et al.] // *Circ Res*. – 2008. – Vol. 103. – № 3. – P. 261–268.
190. Vascular tissue engineering: polymers and methodologies for small caliber vascular grafts / B. B. J. Leal, N. Wakabayashi, K. Oyama [et al.] // *Front Cardiovasc Med*. – 2021. – Vol. 7. – P. 592361.
191. Vascular tissue engineering: progress, challenges, and clinical promise / H. G. Song, R. T. Rumma, C. K. Ozaki [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 22. – № 3. – P. 340–354.
192. VEGFR2 activation mediates the pro-angiogenic activity of BMP4 / S. Rezzola, M. Di Somma, M. Corsini [et al.] // *Angiogenesis*. – 2019. – Vol. 22. – № 4. – P. 521–533.
193. Vein graft failure / C. D. Owens, W. J. Gasper, A. S. Rahman [et al.] // *J Vasc Surg*. – 2015. – Vol. 61. – № 1. – P. 203–216.
194. Vinculin controls endothelial cell junction dynamics during vascular lumen formation / M. P. Kotini, J. de Rooij, M. Affolter [et al.] // *Cell Rep*. – 2022. – Vol. 39. – № 2. – P. 110658.
195. Wang, H. Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells / H. Wang, Y. Su // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2011. – Vol. 300. – № 5. – P. 979–988.

196. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? / F. Otsuka, K. Yahagi, K. Sakakura [et al.] // *Ann Cardiothorac Surg.* – 2013. – Vol. 2. – № 4. – P. 519–526.

197. Wiegand, C. Recent advances in the applications of iPSC technology / C. Wiegand, I. Banerjee // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 60. – P. 250–258.

198. Yoder, M. C. Human endothelial progenitor cells / M. C. Yoder // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2012. – Vol. 2. – № 7. – P. a006692.

199. Zilla, P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing / P. Zilla, D. Bezuidenhout, P. Human // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28. – № 34. – P. 5009–5027.

200. β 1 integrin is a sensor of blood flow direction / I. Xanthis, C. Souilhol, J. Serbanovic-Canic [et al.] // *J. Cell Sci Jcs.* – 2019. – Vol. 132. – № 11. – P. jcs229542.