



## Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов

Захарова И.С.<sup>1,2,3</sup>, Живень М.К.<sup>1,2,3</sup>, Саая Ш.Б.<sup>3</sup>, Шевченко А.И.<sup>1,2,3</sup>, Струнов А.А.<sup>1</sup>, Иванова Л.Н.<sup>1,4</sup>, Карпенко А.А.<sup>3</sup>, Покушалов Е.А.<sup>3</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 10

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 8

<sup>3</sup> Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630055, Новосибирск, ул. Речуновская, 15

<sup>4</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 19 сентября 2015 г. Принята к печати 27 ноября 2015 г.

Разработан протокол получения функциональных эндотелиальных и муральных клеточных популяций из послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека. Полученные эндотелиальные клетки характеризуются наличием маркеров эндотелиоцитов: CD31, VE-cadherin и VEGFR2. Они обладают функциональными свойствами эндотелиальных клеток: содержат в цитоплазме микровезикулы – тельца Вейбеля – Паладе, метаболизируют ацетилированную форму липопротеина низкой плотности, формируют капилляроподобные структуры в матрикеле, нарабатывают компоненты межклеточного матрикса. Полученные гладкомышечные клетки позитивны по специфическому маркеру  $\alpha$ SMA. Обнаруженные клеточные популяции демонстрируют функциональные свойства *in vivo* в тесте на модели ишемии задней конечности иммунодефицитных мышей. На поверхности из поликапролактона и полилактид-ко-гликолида клетки сохраняют специфические поверхностные антигены и способность к наработке межклеточного матрикса. Эти клетки могут быть использованы для разработки тканеинженерного сосудистого трансплантата.

**Ключевые слова** Тканевая инженерия сосудов • Эндотелий • Гладкомышечные клетки • Межклеточный матрикс

В настоящее время увеличивается число заболеваний с патологией кровеносных сосудов, таких как атеросклероз, артериит, хроническая венозная недостаточность, тромбоз, врожденные пороки сердца и сосудов [1, 2]. Лечение этих заболеваний зачастую предусматривает замену сосудов на аллотрансплантаты, аутоотрансплантаты [3] и синтетические протезы [4]. В первом случае актуальны проблема выбора донора и риск отторжения трансплантата из-за иммунной реакции организма [5]. Для подавления иммунного ответа используют иммунодепрессанты, которые повышают вероятность возникновения инфекции, рака и сердечно-сосудистых заболеваний [6]. Применение аутологичных сосудов часто ограничено медицинскими показаниями, а синтетические протезы обладают физиологическими и физическими недостатками: возможностью кальци-

фикации, тромбоза, непрочностью, возникновением инфекций, отсутствием роста [5], в связи с чем разработка тканеинженерных протезов сосудов, в частности диаметром менее 6 мм, а также протезов, способных к росту, – актуальная задача, в том числе для педиатрической практики [2, 7].

Тканевая инженерия открывает перспективы в сосудистой хирургии человека, благодаря возможности создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов, имеющих свойства, максимально приближенные к физиологическим. Требования к прочности, долговечности и физиологичности трансплантата могут быть решены за счет заполнения их эндотелиальными и гладкомышечными клетками, которые в естественном сосуде являются тесно взаимодействующей системой. Для того чтобы надлежащим образом выполнять свою функцию,

эндотелиальные клетки должны прочно прикрепляться к поверхности сосуда, распространяться по ней и формировать монослой [8]. Эндотелиальные клетки, располагающиеся на контактирующей с кровью поверхности сосуда, синтезируют разнообразные активные вещества, такие как оксид азота, фибронектин, гепарансульфат, интерлейкин-1, тканевой активатор плазминогена, факторы для поддержания тонуса, структуры и тромборезистентности [9, 10]. Монослой эндотелиоцитов на внутренней поверхности значительно повышает тромборезистентность протеза сосуда и предотвращает развитие гиперплазии неоинтимы. Вторым важным компонентом сосудов являются гладкомышечные клетки, которые отвечают за сужение и расширение просвета сосуда, его гомеостаз и поддержание механической прочности, поэтому функциональный слой гладкой мускулатуры – необходимое условие создания эффективного тканеинженерного сосудистого трансплантата [10, 11].

При разработке клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов используют разные источники клеток: стволовые клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки, клетки-предшественники эндотелия, дифференцированные производные эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, выделенные из артерий и вен (например, пупочной вены) [1, 10]. В литературе представлены случаи клинического применения тканеинженерных протезов сосудов [2, 7, 12–14].

Эндотелиальные клетки имеют высокую степень гетерогенности по функциям и структуре в разных типах сосудов (артериальные, венозные, лимфатические), а также тканей. Спецификация эндотелиальных клеток в артериальных, венозных и лимфатических сосудах происходит в течение эмбрионального развития. В основе гетерогенности эндотелиальных клеток лежат разнообразные каскады биохимических реакций, которые происходят в рамках взаимодействия эндотелиальных клеток с факторами роста, внеклеточным матриксом и механическими силами [14]. Транскрипционные факторы, ангиокринные ростовые факторы, молекулы адгезии, хемокины экспрессируются специфическим образом в определенных комбинациях в эндотелиальных клетках различных органов [15]. Это необходимо для удовлетворения специфических метаболических потребностей окружения.

Одно из условий успешного функционирования тканеинженерного сосудистого трансплантата – его правильная интеграция в окружающие ткани, поэтому выбирать источник клеток для формирования тканеинженерного сосудистого трансплантата необходимо с учетом данных о гетерогенности и тканеспецифичности.

В представленной работе в качестве источника клеток для разработки тканеинженерного сосудистого трансплантата предложен доступный послеоперационный материал кардиальных эксплантов – миокард выходного отдела правого желудочка. Ранее в нашей лаборатории получили и детально охарактеризовали клетки послеоперационного миокардиального экспланта – материала ушка правого предсердия [16]. Мы разработали способ получения и обогащения популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток, провели их морфологическую и функциональную характеристики *in vitro* и *in vivo*, а также тестирование на некоторых подложках из синтетических материалов. Исследованные клетки могут служить потенциальным источником формирования тканеинженерного сосудистого трансплантата.

## Материал и методы

Клетки кардиальных эксплантов человека получали из послеоперационного материала миокарда выходного отдела правого желудочка. Фрагменты ткани измельчали механически до кусочков размером 1–3 мм<sup>3</sup> и проводили их ферментативный гидролиз в растворе 0,1% коллагеназы NB (Life Technologies) при 37 °С. Полученные клетки совместно с оставшимися фрагментами ткани высаживали на пластик, обработанный человеческим коллагеном 4 типа (Sigma), в культуральных средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных или гладкомышечных клеток EGM-2 и SmGM-2 (Lonza). Клетки культивировали в условиях 5% CO<sub>2</sub>, 37 °С.

В работе использовали подложки из синтетических материалов: поликапролактона (PCL) и полилактид-ко-гликолида (PLGA), разработанные в лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН; лавсан, используемый в клинической практике ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина. Площадь заселяемой поверхности подложек составляла 2 см<sup>2</sup>. Количество заселяемых клеток – 10<sup>5</sup>/см<sup>2</sup>. Клетки культивировали на подложках в течение 6 дней в среде EGM (если заселяли поверхность эн-

дотелиальными клетками), SmGM (при заселении муральными клетками), комбинированной EGM и SmGM (если культивировали два типа клеток одновременно).

Клетки, растущие на культуральном пластике или синтетических подложках, фиксировали 4% PFA (параформальдегид), пермеабелизовали 0,05% тритоном. Окрашивание первичными и вторичными антителами производили согласно протоколам фирм-производителей. Синтетические подложки с клетками помещали на предметное стекло в растворе 10% DAPI, сверху складывали покровное стекло, края препарата заматывали пленкой Parafilm. Анализ клеток, выращиваемых на культуральном пластике, проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E, программа Nikon AR. Клетки, культивируемые на синтетических подложках, анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

Первичные антитела: anti- $\alpha$ -sma (DAKO, M0851), anti-collagen I (abcam, ab34710), anti-fibronectin (abcam, ab6328), anti-human CD90 (eBioscience, 14090982), Von Willebrand factor (abcam, ab6994), anti-CD 29 (eBioscience, 14-0282-92), anti-human CD31 (DAKO), anti-mouse CD31 (Biolegend, 102502), anti-elastin (abcam, 21610), anti-collagen IV (Life Span).

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

Концентрацию антител и способ подготовки клеточных культур подбирали согласно протоколу фирмы-производителя. Анализ клеточных популяций производили на приборе FACS Canto II с помощью программного обеспечения FACS Diva. Исследование выполняли в трех повторностях, подсчитывали среднее значение и стандартное отклонение в программе Microsoft Excel.

Сортировку с помощью магнитных частиц MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами к CD31 человека, производили согласно протоколу фирмы-производителя.

Анализ ультраструктуры эндотелиальных клеток проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-100SX.

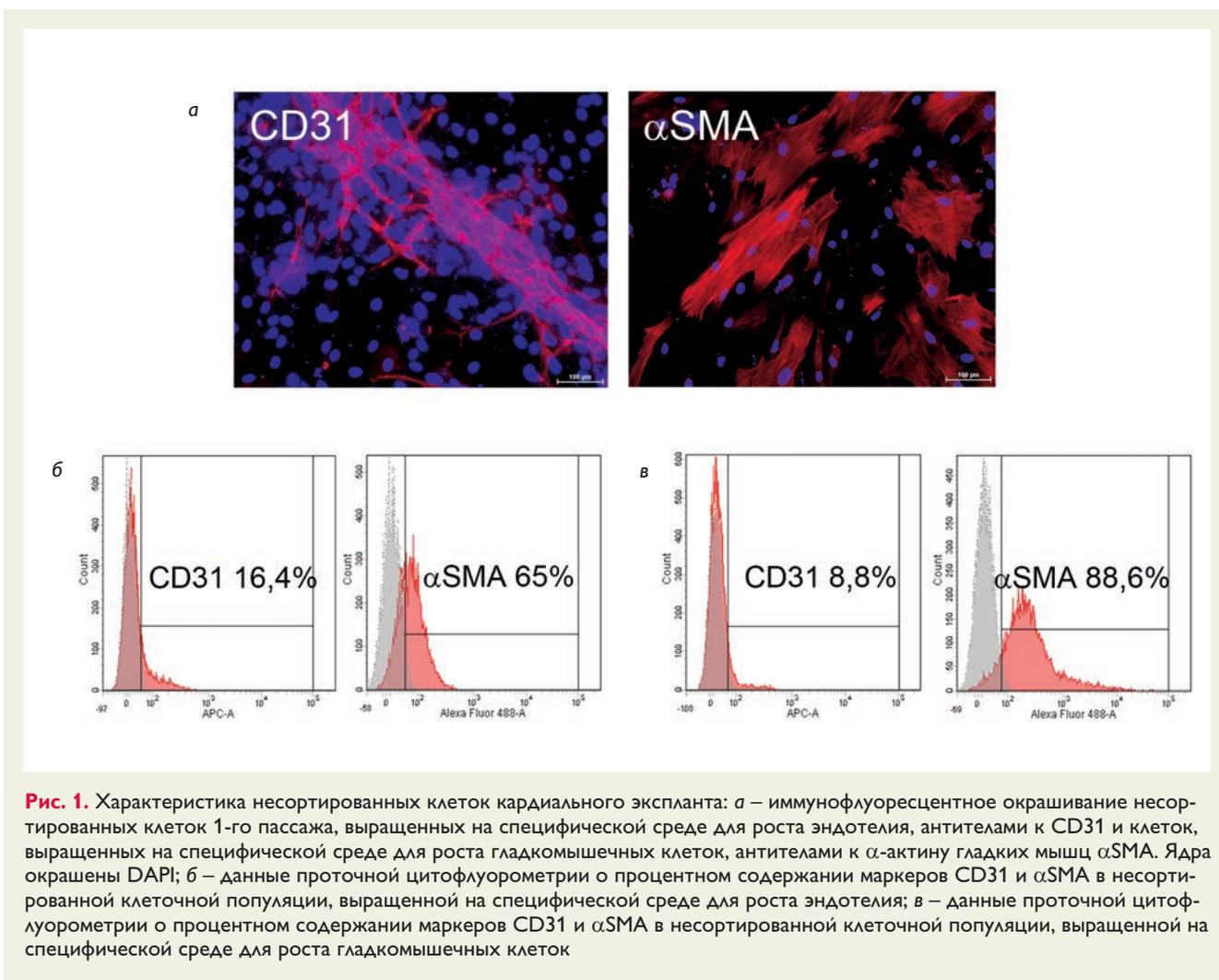
Операции односторонней ишемии задней конечности у иммунодефицитных мышей линии Nude и трансплантацию клеток выполняли по протоколу, описанному в работе [17].

Для эксперимента *in vivo* использовали самок гомозиготных иммунодефицитных мышей BALB/c Nude в возрасте 8 недель из питомника лабораторных животных «Пушино». Животных содержали в виварии конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН. Трансплантацию анализируемых клеток проводили путем внутримышечной инъекции в нижнюю ишемизированную конечность. В эксперименте участвовало 3 группы по 5 мышей. Животным контрольной группы вводили 100 мкл фосфатного буфера (phosphate-buffered saline, PBS), второй –  $5 \times 10^5$  только эндотелиальных клеток в 100 мкл PBS, третьей –  $10^6$  смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток в 100 мкл PBS.

Визуализация распределения введенных клеток в ишемизированной области производилась на приборе Kodak In-Vivo Multispectral Imaging System.  $5 \times 10^5$  эндотелиальных клеток, предварительно окрашенных прижизненным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRed FM, вводили в 100 мкл PBS внутримышечно в область ишемии задней конечности.

Криосрезы области ишемии задней конечности получали на приборе Криостат НМ 550 с использованием О.С.Т. Compound (Tissue Tek) в лаборатории экспериментальной хирургии ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина. Толщина криосрезов – 10 мкм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей изолектином Б4 (Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Life Technologies, I21413) проводили согласно протоколу фирмы-производителя. Анализ окрашенных препаратов осуществляли с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E, программы Nikon AR. Подсчитывали сосуды в 10 полях зрения на препарат при 10-кратном увеличении с использованием программного обеспечения Angio Tool, выделяя изолектин-положительные капилляры и сосуды. Полученные результаты



**Рис. 1.** Характеристика несортированных клеток кардиального экспланта: *а* – иммунофлуоресцентное окрашивание несортированных клеток 1-го пассажа, выращенных на специфической среде для роста эндотелия, антителами к CD31 и клеток, выращенных на специфической среде для роста гладкомышечных клеток, антителами к  $\alpha$ -актину гладких мышц  $\alpha$ SMA. Ядра окрашены DAPI; *б* – данные проточной цитофлуорометрии о процентном содержании маркеров CD31 и  $\alpha$ SMA в несортированной клеточной популяции, выращенной на специфической среде для роста эндотелия; *в* – данные проточной цитофлуорометрии о процентном содержании маркеров CD31 и  $\alpha$ SMA в несортированной клеточной популяции, выращенной на специфической среде для роста гладкомышечных клеток

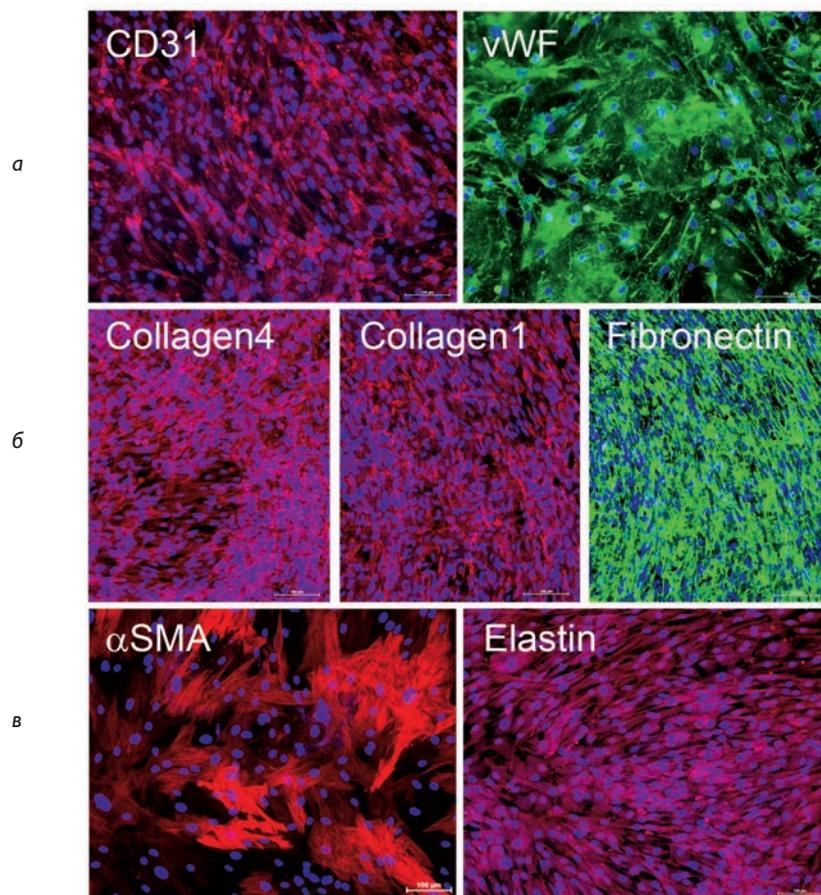
анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе Microsoft Excel.

## Результаты

### Получение и характеристика эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из биопсийного материала кардиальных эксплантов человека

Клетки, выделенные из кардиальных эксплантов после ферментативного гидролиза, культивировали в специфических условиях для роста эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Наличие соответствующих клеточных типов детектировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к специфическим маркерам: CD31 для

эндотелиальных и  $\alpha$ -актина гладких мышц ( $\alpha$ SMA) для гладкомышечных клеток (рис. 1, *а*). На первом этапе определили процентное содержание эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток в исходных популяциях методом проточной цитофлуорометрии. Среди кардиальных клеток, культивируемых в среде для роста гладкомышечных клеток, доля гладкомышечных клеток, позитивных по маркеру  $\alpha$ SMA, составляет 88,6% (рис. 1, *в*). В среде для роста эндотелия доля CD31-позитивных эндотелиоцитов составляет 16,4%, однако в популяции кроме эндотелиальных клеток присутствует 65% гладкомышечных клеток (рис. 1, *б*). Это привело к необходимости обогащения культуры посредством сортировки эндотелиальных клеток, позитивных по CD31 – поверхностному маркеру зрелых эндотелиоцитов. Следует отметить, что при культивирова-



**Рис. 2.** Характеристика обогащенных клеток кардиального экспланта: а – иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток, обогащенных магнитным сортированием, антителами к CD31 и фактору фон Виллебранда (vWF); б – иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток, обогащенных магнитным сортированием, антителами к компонентам межклеточного матрикса коллагенам 4-го и 1-го типов (Collagen 4, Collagen 1) и фибронектину (Fibronectin); в – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток гладкой мускулатуры антителами к  $\alpha$ -актину гладких мышц ( $\alpha$ SMA) и специфическому компоненту межклеточного матрикса – эластину (Elastin). Ядра окрашены DAPI

нии выделенных из кардиального экспланта клеток в среде без добавления специфических факторов роста к шестому пассажу в популяции утрачивается эндотелиальный маркер CD31, при этом доля  $\alpha$ -SMA-позитивных клеток повышается до 94%.

После процедуры магнитного сортирования происходит обогащение клеточной культуры целевой популяцией зрелых эндотелиальных клеток, данный фенотип поддерживается на протяжении как минимум 10 пассажей (рис. 2, а, таблица). В эндотелиальной популяции, по данным трех измерений, маркер эндотелиоцитов CD31 поддерживается на уровне

72,6 $\pm$ 3,3%, VEGFR2 выявляется в 60,4 $\pm$ 2,5% клеток, детектируется низкий уровень CD34 – маркера гемопоэтических и кардиоваскулярных предшественников – 0,66 $\pm$ 1,2%. После сортирования эндотелиальной популяции, по данным проточной цитофлуорометрии, в ней детектируется низкий уровень неспецифической популяции CD90-позитивных клеток, а также полностью утрачиваются неспецифические гладкомышечные клетки (таблица). Результаты иммунофлуоресцентной окраски визуально подтверждают обогащение эндотелиальной популяции клетками с характерными маркерами зрелых

Количественное содержание поверхностных антигенов в обогащенных культурах эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, выделенных из кардиальных эксплантов человека

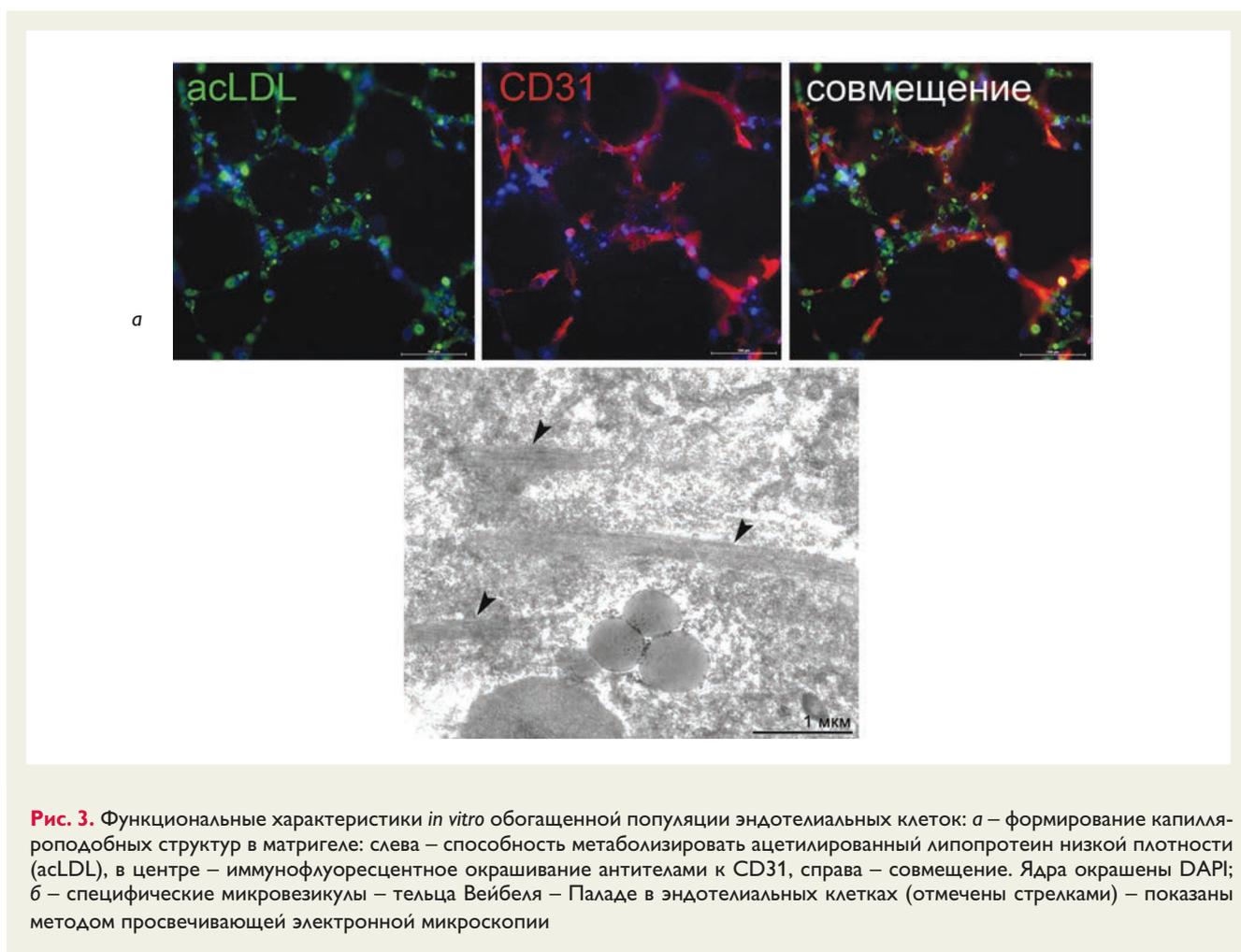
Поверхностный антиген	Доля антигена в популяции эндотелиоцитов, %	Доля антигена в популяции гладкомышечных клеток, %
CD31	72,6±3,3	0
VEGFR2	60,4±2,5	0
VE-cadherin	43,2±1,6	0
CD34	0,66±1,2	0
CD90	2,1±2,8	18,9±2,7
αSMA	0	96,1±2,2

эндотелиоцитов CD31 и фактора фон Виллебранда (рис. 2, а).

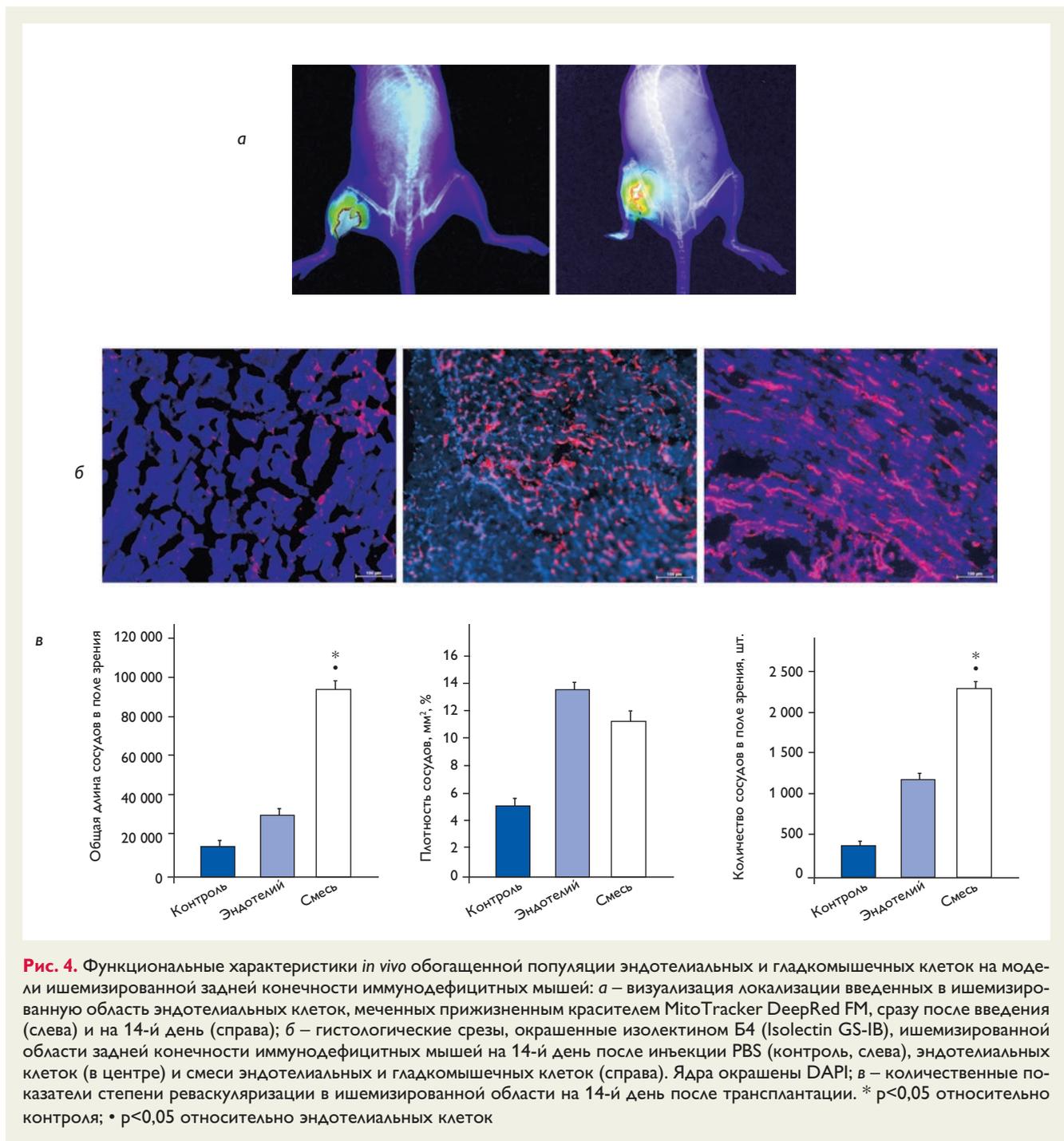
Одной из важных функциональных характеристик, необходимых для правильного формирования

монослоя эндотелиальных клеток, является способность нарабатывать компоненты межклеточного матрикса. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показано, что обогащенные клетки эндотелиальной популяции нарабатывают характерные компоненты межклеточного матрикса: фибронектин, коллаген I и IV (рис. 2, б).

Культуру гладкомышечных клеток не подвергали процедуре магнитного сортирования, поддерживали без дальнейшей сортировки на протяжении более 10 пассажей на той же селективной среде, на которой ее получили. Доля клеток, экспрессирующих актин гладких мышц, поддерживается на уровне 96,1±2,2% (таблица). При этом в популяции утрачиваются неспецифические эндотелиальные маркеры. Культура гладкомышечных клеток, поддерживаемая на специфической селективной среде, активно нарабатывает характерный компонент межклеточного матрикса – эластин (рис. 2, в).



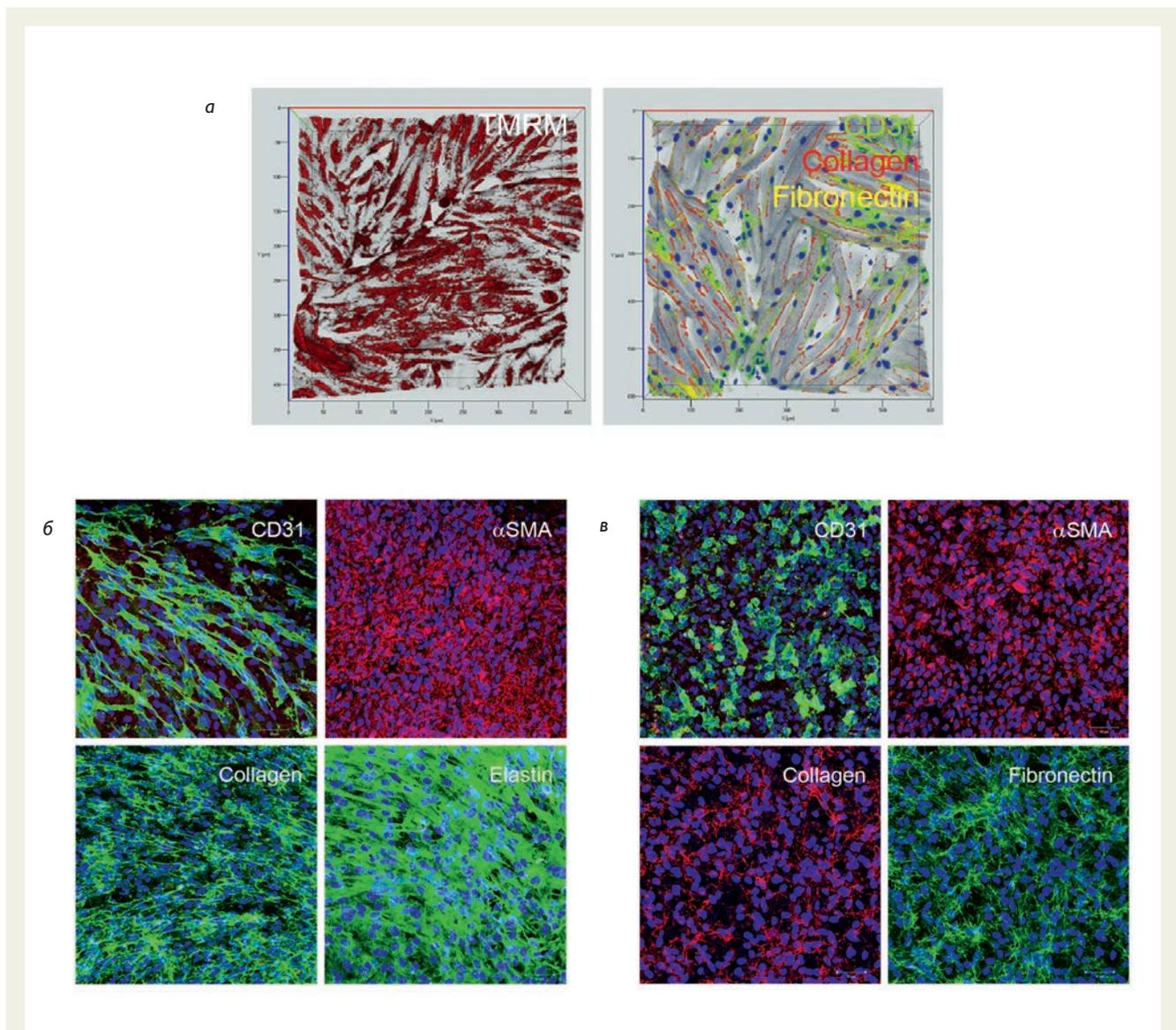
**Рис. 3.** Функциональные характеристики *in vitro* обогащенной популяции эндотелиальных клеток: а – формирование капиллярноподобных структур в матригеле: слева – способность метаболизировать ацетилированный липопротеин низкой плотности (acLDL), в центре – иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD31, справа – совмещение. Ядра окрашены DAPI; б – специфические микровезикулы – тельца Вейбеля – Паладе в эндотелиальных клетках (отмечены стрелками) – показаны методом просвечивающей электронной микроскопии



### Оценка функциональных свойств обогащенных культур кардиальных эксплантов

Функциональные тесты *in vitro* показали, что эндотелиоциты, отсортированные из экспланта сердца методом магнитного сортирования, способны метаболизировать ацетилированную форму

липопротеина низкой плотности (acLDL), а также активно формировать капиллярноподобные структуры в трехмерном пространстве в толще матригеля. Образованные клетками капиллярноподобные структуры после фиксации окрашиваются антителами к эндотелиальному маркеру CD31 (рис. 3, а).



**Рис. 5.** Тестирование эндотелиальных и гладкомышечных клеток на поверхностях из синтетических материалов: а – пролиферация эндотелиальных клеток, выделенных из кардиального эксплантата человека, на поверхности из лавсана, покрытого желатином, окраска TMRM (слева), иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD31 (зеленый), коллагену 1-го типа (красный) и фибронектину (желтый) (справа); б – иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток на подложке из поликапролактона антителами к маркеру CD31 и коллагену (на одной стороне поверхности) и гладкомышечных клеток антителами к  $\alpha$ SMA и эластину (на другой стороне поверхности); в – иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток на подложке из PLGA антителами к маркеру CD31, коллагену и фибронектину (на одной стороне поверхности) и гладкомышечных клеток антителами к  $\alpha$ SMA (на другой стороне поверхности). Ядра окрашены DAPI

Важным аспектом функциональной характеристики эндотелиальной популяции является исследование ультраструктуры клеток для выявления характерных микровезикул. Тельца Вейбеля – Паладе – особые микровезикулы, специфичные для функциональных эндотелиальных клеток. Тельца

Вейбеля – Паладе содержат молекулы белка фактора фон Виллебранда, Р-селектин и другие функциональные молекулы, которые секретируются эндотелиальными клетками в ответ на внешнее раздражение, например в случае активации эндотелия при повреждении сосудов. Методом просвечиваю-

щей электронной микроскопии показано наличие в исследуемой популяции телец Вейбеля – Паладе (рис. 3, б).

Стандартным тестом для оценки функциональных свойств васкулярных клеток *in vivo* является эксперимент по реваскуляризации ишемизированной конечности мыши [18]. В ряде работ на модели ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей оценивали регенеративный потенциал разных типов клеток человека, применяемых и потенциально перспективных для применения в клинической практике: эндотелия пупочной вены (HUVES), эндотелиальных производных клеток костного мозга, дифференцированных в эндотелиальном направлении производных эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [19]. Критериями оценки служат доплерометрические показатели изменения скорости кровотока после трансплантации исследуемых клеток, а также количественный анализ окрашенных сосудистых структур на гистологических срезах. Самые низкие показатели при оценке реваскуляризации ишемизированной конечности демонстрировали клетки HUVES [19, 20]. Наиболее высокие показатели выявлялись при одновременном введении в ишемизированную конечность эндотелиальных и муральных (гладкомышечные клетки и перicytes) клеток [18]. Это доказывает значение взаимодействия эндотелиальных и гладкомышечных клеток в ангиогенезе. При этом большинство исследований свидетельствует о том, что реваскуляризация ишемизированной области происходит за счет привлечения трансплантированными клетками паракринных факторов, способствующих ангиогенезу, а не за счет пролиферации этих клеток и встраивания в сосудистую систему животного-реципиента.

В данной работе мы оценили функциональные свойства *in vivo* обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток на модели ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей Nude/Nude – анализировали способность к реваскуляризации ишемизированной области после введения исследуемых клеточных популяций. Для визуализации расположения клеток в ишемической области использовали эндотелиальные клетки, меченные прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM. На 14-й день после трансплантации сигнал детектировался в области исходной локализации (рис. 4, а). Кроме того, на гистологических

срезах задних конечностей мышей через 14 дней после инъекций клеток в ишемическую область оценили степень развития сосудов – количества, плотности и общей длины – с помощью программного обеспечения Angio Tool. Препараты гистологических срезов окрашивали флуоресцентно меченным маркером васкулярных клеток – изолектином Б4 (рис. 4, б). Степень развития изолектин-положительных структур на 14-й день после инъекции в трех группах различается. При введении смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток наблюдаются достоверно повышенные относительно контрольной группы показатели общей длины и количества сосудов в поле зрения (рис. 4, в). В группе с введенными эндотелиальными клетками также прослеживается тенденция повышенных относительно контроля показателей общей длины и количества сосудов в поле зрения, однако эти показатели ниже соответствующих значений в группе с одновременно введенными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Плотность сосудов в контрольной группе более чем в 2 раза ниже по сравнению с экспериментальными группами. При этом значения данного критерия незначительно выше в группе с введенными эндотелиальными клетками по сравнению с группой смешанных клеток.

Анализ гистологических срезов образцов нижних конечностей с инъекцией эндотелиальных и смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток выявил выраженное развитие сосудистой сети с высокой плотностью капилляров. Таким образом, введение клеток способствует стимуляции реваскуляризации и стабилизации новых сосудов и подтверждает функциональность *in vivo* исследуемых клеточных популяций.

#### **Применение эндотелиальных и гладкомышечных клеток на синтетических материалах: лавсане, поликапролактоне, полилактид-ко-гликолиде**

Одна из ключевых задач тканевой инженерии сосудов – выбрать такой материал для скаффолда (каркаса), который будет поддерживать правильное взаимодействие между двумя ключевыми клеточными типами – эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками, обеспечивая правильное функционирование трансплантата. На функциональные свойства клеток существенно влияет микроокружение, в том

числе заселяемая поверхность, под влиянием которой происходит модуляция паттерна характерных поверхностных антигенов и способности нарабатывать межклеточный матрикс [21, 22]. В данной работе мы изучили способность эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из кардиальных эксплантов человека, к адгезии и пролиферации на подложках из синтетических материалов, используемых в сосудистой хирургии – лавсане, поликапролактоне, полилактид-ко-гликолиде.

На поверхности из лавсана, предварительно модифицированной желатином, эндотелиальные клетки прикрепляются к каждой субъединице волокна и образуют межклеточные контакты вдоль отдельных волокон, монослой не образуется (рис. 5, а). Клетки предварительно окрашивали митохондриальным красителем TMRM, детектирующим активно пролиферирующие клетки. Спустя 6 дней культивирования, несмотря на активную пролиферацию, выявлена слабая наработка компонентов межклеточного матрикса фибронектина и коллагена, утрачивается эндотелиальный маркер CD31.

Поверхность из поликапролактона заселяли сначала гладкомышечными клетками в количестве  $3 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. Заселенные гладкомышечными клетками поверхности помещали в обычные условия культивирования клеток. Через 24 ч другую сторону поверхности заселяли эндотелиальными клетками. Спустя 6 дней культивирования подложки фиксировались и окрашивались антителами к эндотелиальному маркеру CD31 и гладкомышечному маркеру  $\alpha$ -актину гладких мышц (рис. 5, б). Несмотря на высокую плотность, клетки располагаются в разных плоскостях, не образуя монослой с четкими межклеточными границами, часто формируя несколько слоев. Гладкомышечные клетки утрачивают характерную веретеноподобную морфологию, ориентация актиновых волокон в них становится более свободной, при этом они сохраняют способность к продукции внеклеточного эластина. Около половины эндотелиальных клеток, культивируемых на поликапролактоне, утрачивают экспрессию поверхностного антигена CD31. Несмотря на частичную утрату эндотелиального фенотипа, клетки успешно нарабатывают внеклеточный матрикс – коллаген IV и фибронектин (рис. 5, в).

Аналогичным способом клетки заселяли на поверхность PLGA. В силу структурных особенностей матрикса эндотелиальные и гладкомышечные клетки изменяют свою морфологию, эндотелиальный мар-

кер CD31 сохраняется лишь в части эндотелиальных клеток, в гладкомышечных клетках меняется структура актиновых волокон. Тем не менее детектируется наработка внеклеточного коллагена IV и фибронектина (рис. 5, в).

## Заключение

В результате экспериментальной работы впервые разработан протокол по получению функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из послеоперационного материала миокарда выходного отдела правого желудочка человека. Процесс получения включает следующие этапы: ферментативный гидролиз ткани; выращивание выделенных клеток в специфических средах на подложке из человеческого коллагена четвертого типа; обогащение популяции клеток кардиальных эксплантов с помощью магнитного сортирования; дальнейшее культивирование на поверхности, обработанной коллагеном четвертого типа в специфических культуральных средах. Проведенная молекулярно-генетическая характеристика полученных клеток показала, что обогащенная культура из биопсийного материала кардиальных эксплантов человека содержит функционально полноценные эндотелиоциты, обладающие ангиогенной активностью, и гладкомышечные клетки. Показан высокий уровень экспрессии эндотелиальных маркеров CD31, фактора фон Виллебранда, способность образовывать капиллярноподобные структуры на матригле и метаболизировать ацетилированные формы липопroteина низкой плотности. Кроме того, с помощью электронной микроскопии показали наличие телец Вейбеля – Паладе, специфичных для функциональных эндотелиальных клеток. Гладкомышечные клетки получены с помощью выращивания выделенных из кардиального экспланта клеток в специфической культуральной среде на поверхности, покрытой коллагеном четвертого типа. Данная популяция экспрессирует 96% гладкомышечного актина, характерного для клеток гладкой мускулатуры. Совместное введение эндотелиальных и гладкомышечных клеток показывают высокий регенеративный потенциал в восстановлении кровообращения в ишемизированной области задней конечности иммунодефицитных мышей. Кроме того, оценили функциональность и жизнеспособность полученных клеток на поверхностях из синтетических материалов (лавсан, поликапролактон, полилактид-ко-гликолид). На поверхности поликапролактона и полилактид-ко-гликолида эндотелиальные и гладкомышечные клетки выявляют экс-

прессию характерных маркеров и функциональные свойства: способность к наработке внеклеточного матрикса, а также имеют тенденцию к образованию монослоя. Данные синтетические материалы могут быть использованы как биодеградируемый скаффолд для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов с использованием в качестве источника клеток послеоперационного материала кардиальных эксплантов.

*Работа поддержана бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН VI.60.1.2 и грантом РФФИ № 14-04-00082.*

*Авторы выражают благодарность младшему научному сотруднику лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН Шерстюку В.В. за работу на приборе Kodak In-Vivo Multispectral Imaging System, заведующему Центром коллективного пользования «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН Напримерову В.А. и заведующему Центром коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН Байбородину С.И.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## Список литературы

- Nemeno-Guanzon J.G., Lee S., Berg J.R., Jo Y.H., Yeo J.E., Nam B.M., Koh Y.-G., Lee J.I. Trends in tissue engineering for blood vessels // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. Vol. 2012. P. 956345.
- Duncan D.R., Breuer C.K. Challenges in translating vascular tissue engineering to the pediatric clinic // *Vasc. Cell.* 2011. Vol. 3. № 1. P. 23.
- Foster E.D., Kranc M.A. Alternative conduits for aortocoronary bypass grafting // *Circulation.* 1989. Vol. 79. № 6. Pt 2. P. 134–9.
- Klinkert P., Post P.N., Breslau P.J., van Bockel J.H. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2004. Vol. 27. № 4. P. 357–62.
- Ogle B., Cascalho M., Platt J.L. Fusion of approaches to the treatment of organ failure // *Am. J. Transplant.* 2004. Vol. 4. Suppl 6. P. 74–7.
- Nugent H.M., Edelman E.R. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease // *Circ. Res.* 2003. Vol. 92. № 10. P. 1068–78.
- Olausson M., Patil P.B., Kuna V.K., Chougule P., Hernandez N., Methe K., Kullberg-Lindh C., Borg H., Ejnell H., Sumitran-Holgersson S. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study // *Lancet (London, England).* 2012. Vol. 380. № 9838. P. 230–7.
- Nerem R.M., Ensley A.E. The tissue engineering of blood vessels and the heart // *Am. J. Transplant.* 2004. Vol. 4. Suppl 6. P. 36–42.
- Pate M., Damarla V., Chi D.S., Negi S., Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response // *Adv. Clin. Chem.* 2010. Vol. 52. P. 109–30.
- Tara S., Rocco K.A., Hibino N., Sugiura T., Kurobe H., Breuer C.K., Shinoka T., Vessel bioengineering // *Circ. J.* 2014. Vol. 78. № 1. P. 12–9.
- Wang H., Zhou J., Liu Z., Wang C. Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction // *J. Cell. Mol. Med.* 2010. Vol. 14. № 5. P. 1044–55.
- L'Heureux N., McAllister T.N., de la Fuente L.M. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization // *N. Engl. J. Med.* 2007. Vol. 357. № 14. P. 1451–3.
- Shin'oka T., Matsumura G., Hibino N., Naito Y., Watanabe M., Konuma T., Sakamoto T., Nagatsu M., Kurosawa H. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005. Vol. 129. № 6. P. 1330–8.
- Rufaihah A.J., Huang N.F., Kim J., Herold J., Volz K.S., Park T.S., Lee J.C., Zambidis E.T., Reijo-Pera R., Cooke J.P. Human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells exhibit functional heterogeneity // *Am. J. Transl. Res.* 2013. Vol. 5. № 1. P. 21–35.
- Nolan D.J., Ginsberg M., Israely E., Palikuqi B., Poulos M.G., James D., Ding B.-S., Schachterle W., Liu Y., Rosenwaks Z., Butler J.M., Xiang J., Rafii A., Shido K., Rabbany S.Y., Elemento O., Rafii S. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration // *Dev. Cell.* 2013. Vol. 26. № 2. P. 204–19.
- Павлова С.В., Перовский П.П., Чепелева Е.В., Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной мышцы человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2013. № 3. С. 132–140
- Couffinhal T., Silver M., Zheng L.P., Kearney M., Witzensbichler B., Isner J.M., Mouse model of angiogenesis // *Am. J. Pathol.* 1998. Vol. 152. № 6. P. 1667–79.
- Yamahara K., Sone M., Itoh H., Yamashita J.K., Yurugi-Kobayashi T., Homma K., Chao T.-H., Miyashita K., Park K., Oyamada N., Sawada N., Taura D., Fukunaga Y., Tamura N., Nakao K. Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells // *PLoS One.* 2008. Vol. 3. № 2. P. e1666.
- Lai W.-H., Ho J.C.Y., Chan Y.-C., Ng J.H.L., Au K.-W., Wong L.-Y., Siu C.-W., Tse H.-F. Attenuation of hind-limb ischemia in mice with endothelial-like cells derived from different sources of human stem cells // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. № 3. P. e57876.
- S.H. Bhang, Lee S., Lee T.-J., La W.-G., Yang H.-S., Cho S.-W., Kim B.-S. Three-dimensional cell grafting enhances the angiogenic efficacy of human umbilical vein endothelial cells // *Tissue Eng.* 2012. Part A. Vol. 18. № 3–4. P. 310–9.
- Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur. Spine J.* 2008. Vol. 17. Suppl 4. P. 467–79.
- Rosenbaum A.J., Grande D.A., Dines J.S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment // *Organogenesis.* 2008. Vol. 4. № 1. P. 23–7.

### Development of cell technologies for design of cell contained vascular grafts

Zakharova I.S.<sup>1,2,3\*</sup>, Zhiven' M.K.<sup>1,2,3</sup>, Saaya Sh.B.<sup>3</sup>, Shevchenko A.I.<sup>1,2,3</sup>, Strunov A.A.<sup>1</sup>, Ivanova L.N.<sup>1,4</sup>, Karpenko A.A.<sup>3</sup>, Pokushalov E.A.<sup>3</sup>, Zakiyan S.M.<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 10 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Siberian Branch of the Russian Federation Academy of Sciences, 8 Lavrentieva Avenue, 630090 Novosibirsk, Russian Federation

<sup>4</sup> Novosibirsk National Research State University, 2 Pirogova St., 630090 Novosibirsk, Russian Federation

\* Corresponding author. Email: zakharova.is@gmail.com

A new protocol for production of functional endothelial and mural cells from human cardiac explants has been developed. The endothelial cells are characterized by the presence of mature endothelial markers: CD 31, VE-cadherin and VEGFR2. Functionally they could take up ac-LDL, form tube-like structure in matrigel, contains functional cytoplasmic microvesicles Weibel-Palade bodies, in cytoplasm microvesicles – metabolized form of acetylated low-density lipoprotein, form capillary-like structures in Matrigel and produces extracellular matrix. The smooth muscle cells expressed a specific marker  $\alpha$ SMA and produces extracellular matrix. The derived cell populations exhibit functional properties in hindlimb ischemia model. It was shown that the endothelial and the smooth muscle cells retain their specific surface antigens and the ability to produce an extracellular matrix on polycaprolactone and polylactide-co-glycolide surfaces. These cells can be used to develop a vascular tissue-graft.

**Key words:** vascular tissue engineering; endothelium; smooth muscle cells; extracellular matrix

Received 19 September 2015. Accepted 27 November 2015.