

На правах рукописи

СААЯ Шораан Биче-оолович

**ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ
КЛЕТОЧНО-ЗАСЕЛЕННОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА**

**14.01.26 Сердечно-сосудистая хирургия;
03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Подпись
соискателя

Новосибирск – 2017

**Работа выполнена в Центре сосудистой патологии и гибридных технологий
ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России**

Научный руководитель д-р медицинских наук, профессор

КАРПЕНКО Андрей Анатольевич

Научный руководитель д-р биологических наук, профессор

ЗАКИЯН Сурен Минович

Официальные оппоненты:

ФОКИН Алексей Анатольевич, доктор медицинских наук профессор, заслуженный врач РФ, (факультет послевузовского и дополнительного профессионального образования ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; Уральский федеральный округ, 454092 Челябинск ул.Воровского,64; заведующий кафедрой хирургии)

ГУЛЯЕВА Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, (лаборатория молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», ул. Тимакова 2/12, г. Новосибирск, 630117; кафедра молекулярной биологии и кафедры химии окружающей среды ФЕН Новосибирского Государственного университета руководитель лаборатории; профессор кафедры)

Ведущая организация:

**Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации.
(121552, Москва, Ул. 3-я Череповская, д. 15а)**

**Защита состоится 20.12. 2017 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.063.01 при ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.
Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;**

e-mail: Lenko@meshalkin.ru

http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli

**С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
и на сайте http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli**

Автореферат разослан .11. 2017 года

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
д-р мед. наук, профессор

Ленько Евгений Владимирович

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БПВ – большая подкожная вена

БПШ - бедренно-подколенное шунтирование

ГМК – гладкомышечные клетки

ЛСК – линейная скорость кровотока

ЭК – эндотелиальные клетки

МРТ – магнитно-резонансная томография

МПВС – малопроницаемый внутренний слой

ПКЛ – поликапролактон

ПЛА – полилактид-ко-гликолид

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ПЭТ – полиэтилентетрафталат

ТИС – тканеинженерные сосуды

СД – сахарный диабет

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УЗДГ - ультразвуковая доплерография

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По различным данным заболевания сердечно-сосудистой системы занимают лидирующее место в смертности и инвалидизации населения. Однако точная распространенность облитерирующих заболеваний остается окончательно неопределенной. Установлено четкая связь между распространенностью ЗПА и увеличением возраста. Например, в возрасте от 40 до 49 лет заболеваниями периферических артерий страдает 0.9% населения, от 50 до 59 лет 2.5%, от 60 до 69 лет 4.7%, более 69 лет 14.5%.

Для хирургического лечения при длинных стено-окклюзионных заболеваний артериальных сосудов нередко используются шунтирующие операции или операции протезирования кровеносного сосуда биологическими сосудами или синтетическими протезами.

Из биологических сосудов наиболее предпочтительными для использования являются аутологичные сосуды, такие как аутоартерии, аутовены. Однако, последние не всегда имеются в достаточном количестве у человека или могут быть не пригодны по медицинским показаниям. Основными недостатками известных аутоотрансплантатов являются их тромбоз или гиперплазия интимы анастомоза. Протоколы децеллюляризации ксено- или аллогraftов оказались неэффективны при обработке кровеносных сосудов малого калибра, так как они либо не полностью удаляют клетки из ткани, либо серьезно повреждают экстрацеллюлярный матрикс, из-за чего происходит их аневризматическая трансформация.

В отличие от аутологических сосудов использование синтетических протезов, особенно при поражениях сосудов среднего и малого диаметра (менее 6мм) показывают неудовлетворительные отдаленные результаты.

В связи с этим разработка тканеинженерных протезов обладающими свойствами близкими к естественным сосудам остается актуальной.

В целом работы по оптимизации заселения трансплантатов сосудов сосудистыми клетками с использованием компонентов естественного

матрикса сосудов являются очень перспективными и в дальнейшем позволят создавать персонализированные клеточно-наполненные протезы сосудов. Таким образом, представленная работа направлена на решение актуальных современных задач и является перспективным направлением инженерии сосудистых трансплантатов.

НАУЧНАЯ ГИПОТЕЗА:

Предварительное заселение внутренней стенки сосудистого протеза функциональными эндотелиальными клетками, а наружной – гладкомышечными клетками будет способствовать образованию внутреннего функционального монослоя эндотелия и соединительно-тканной капсулы в перипротезном пространстве.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать технологию получения клеточно-заселенного сосудистого протеза и оценить его эффективность в эксперименте.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработать методику получения эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда выходного отдела правого желудочка человека.

2. Провести функциональную характеристику полученных эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vitro*.

3. Охарактеризовать функциональные свойства выделенных клеток на биологической модели *in vivo*.

4. Оценить неоэндотелизацию и тромборезистентность клеточно-наполненных тканеинженерных сосудистых трансплантатов на биологической модели *in vivo*.

Научная новизна исследования

1. Впервые разработан протокол получения эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда человека.
2. Разработана методика двухслойного заселения эндотелиальными и гладкомышечными клетками 3D матрицы, потенциально пригодной для протезирования сосудов.
3. Определен тип 3D матрицы, характеризующийся оптимальным заселением эндотелиальными и гладкомышечными клетками, сохраняющими функциональные свойства.
4. Проведена оценка неоэндотелизации и тромборезистентности полученных клеточно-заселенных 3D матриц из ПКЛ с МПВС в биологической модели.

Отличия полученных новых научных результатов от результатов, полученных другими авторами

По литературным данным для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов использовались клеточные популяции из различных источников. В нашей работе нами впервые разработан протокол получения функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда человека. Мы показали, что синтетические матрицы из поликапролактона и полилактида-когликолида полученные методом электроспиннинга обеспечивают хорошую интеграцию клеток в их структуру, заселенные клетки пролиферировали и поддерживали жизнедеятельность. Мы выполнили двухстороннее заселение заплат из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем человеческими эндотелиальными (с внутренней стороны) и гладкомышечными (с наружной стороны) клетками. В эксперименте *in vivo* после имплантации в брюшную аорту мышей клеточно-заселенные матрицы обеспечивали хорошую проходимость, показали хорошую интеграцию имплантированных заплат с окружающими тканями.

Достоверность выводов и рекомендаций

Дизайн исследования, достаточное количество наблюдений, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к анализу с применением современных методов статистической обработки свидетельствуют о достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Представленные в настоящей работе выводы не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

Практическая значимость полученных новых научных знаний

По результатам эксперимента определена оптимальная технология подготовки клеточных популяций для ремоделирования сосудистого просвета, разработана технология создания клеточно-заселенных ткане-инженерных конструкций, проведена оценка их биологической совместимости в эксперименте *in vivo*. Разработанный нами метод позволяет рекомендовать его в практике ССХ в качестве создания персонализированных клеточно-наполненных трансплантатов.

Краткая характеристика клинического материала (объекта исследования) и научных методов исследования

Разработан протокол получения функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда человека.

Работа содержит результаты исследований полученных клеток *in vitro* и *in vivo*, исследования клеток в составе различных сосудистых матриксов и результаты *in vivo* эксперимента клеточно-заселенных заплат из поликапролактона с МПВС после имплантации в брюшную аорту иммунодефицитных мышей SCID (35 штук). Проходимость области аорты, в которую имплантирована клеточно-заселенная заплата оценивали на 2, 4, 12 и 24 недели с помощью МРТ и УЗИ.

Также выполняли иммуногистологические исследования эксплантованных заплот (иммунофлуоресцентная микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином). Для накопления данных и их первичной сортировки использовался Microsoft Excel 2010. Результаты исследований были обработаны с использованием пакета программ для статистической обработки “Statistica 7” в среде Windows 7 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены простым указанием количества, средним \pm стандартное отклонение, медиана (25; 75 перцентиль), доли в процентах. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента. Для оценки связи между показателями вычислялся коэффициент линейной корреляции Пирсона. Сравнения качественных признаков проводились тестом Хи-квадрат. Различия считали статистически значимыми при $< 0,05$.

Методы исследования и используемая аппаратура

- Ростовая среда для культивирования клеток кардиальных эксплантов состояла из DMEM/F12, 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Autogene Bioclear), 1×L-glutamine, 1× PenStrep, 1×nonessential amino acid (NEAA), 1×sodium pyruvate (Invitrogen)
- Коммерческие ростовые среды для культивирования эндотелиальных (EGM-2) и гладкомышечных клеток (SmGM) были следующего состава:

Среда для эндотелиальных клеток: EGM-2 - Endothelial Cell Growth Medium - 2 (EBM-2 Basal Medium 500 ml, EGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors: Heparin, hydrocortisone, R3 -IGF - 1 (Recomb. Long R insulin - like growth factor - 1), Ascorbic Acid, VEGF (Endothelial growth factor vascular human recombinant), rhEGF (Epidermal growth factor, human recombinant), rhFGF - B (Human fibroblast growth factor - B) GA - 1000 (Gentamicin sulfate amphotericin - B), Lonza)

Среда для гладкомышечных клеток: SmGM-2 Smooth Muscle Growth Medium-2(SmBM Basal Medium 500 ml, SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors: rhEGF (Epidermal growth factor, human recombinant), rhFGF – B (Human fibroblast growth factor – B), Insulin (recombinant human), GA – 1000 (Gentamicin sulfate amphotericin – B), Lonza). В ходе работы клетки культивировали в инкубаторах при 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. Клеточная сортировка проводилась согласно протоколу фирмы-производителя антител *Miltenyi Biotec*.

При имплантации заплат в аорту мышей использовали операционный микроскоп OPMI PICO (Carl Zeiss, Германия), МРТ и УЗДГ, микроскоп Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия), криостат «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия). Криосрезы окрашивали: гематоксилин - эозином на микроскопе AxioVision FL-40 (Carl Zeiss, Германия). Для иммуногистохимии были применены: маркер ЭК - anti-CD31, маркер ГКМ - anti- α -sma, маркеры межклеточного матрикса - anti-collagen I и antifibronectin, маркер фибробластов anti-CD90, маркер ЭК (Isolectin GS-IB4), а также вторичные антитела (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Готовые препараты заключали в среду «Vectashield mounting medium with DAPI» (Vector laboratories, США) и анализировали с помощью лазерного сканирующего инвертированного флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM710. Для визуализации расположения клеток в области инъекции использовали эндотелиальные клетки, меченные прижизненным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRed FM (MitoTracker DeepRedFM, # M22426, Invitrogen). Сигнал детектировали с помощью прибора Kodak In-vivo Multispectral Imaging System. УЗИ выполняли при помощи аппарата Vivid 4 (GE Medical Systems Israel Ltd., Ultrasound, Израиль). Магнитно-резонансной томография (МРТ) выполнялась на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла.

Личный вклад автора в получении новых научных результатов данного исследования

Автор принимал участие в процессах получения и культивирования эндотелиальных и гладкомышечных клеток, их *in vitro* и *in vivo* характеристики. Автором лично выполнены все операции по имплантации и забору исследуемых заплат, а также контроль над состоянием животных на протяжении всего срока наблюдения. Участвовал при неинвазивной оценке проходимости брюшной аорты мышей с помощью ультразвукового доплеровского сканирования и МРТ-диагностики, исследовал послеоперационные морфологические и гистологические результаты. Провел статистическую обработку данных с применением пакетов программ “Statistica 7” и Excel 2010; анализ и интерпретацию полученных данных.

Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, постоянное внимание и организационную помощь в выполнении этого исследования своим научным руководителям, а именно: доктору медицинских наук, профессору Карпенко А.А. и доктору биологических наук, профессору Закияну С.М. Сотрудникам лаборатории эпигенетики развития к.б.н. Захаровой И.С., к.б.н. Шевченко А.И., заведующему лаборатории молекулярной медицины к.б.н. Лактионову П.П., а также искренне благодарит за дружеское участие Покушалова Е.А., Сергеевича Д.С., Живень М.С., Степанову А.О.

Реализация и внедрение результатов исследований

Основные положения диссертации полученные в процессе исследования способствуют созданию персонализированных клеточно-заселенных сосудистых трансплантатов.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

1. Захарова И.С., Шевченко А.И., Живень М.К., **Саая Ш.Б.**, Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Иванова Л.Н., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Разработка метода получения клеточно-наполненного сосудистого трансплантата с использованием направленной васкулярной дифференцировки стволовых клеток человека // Материалы 1-го Национального Конгресса по регенеративной медицине. 4-6 декабря 2013. Москва. «МЕДИ Экспо». С. 93.
2. Захарова И.С., Шевченко А.И., Живень М.К., **Саая Ш.Б.**, Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Иванова Л.Н., Караськов А.М., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Подходы к получению васкулярных клеток и их применение в тканевой инженерии сосудов // Симпозиум «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». 2-6 сентября 2014. Новосибирск. С.21.
3. Захарова И.С., Шевченко А.И., Живень М.К., **Саая Ш.Б.**, Струнов А.А., Смирнова А.М., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Закиян С.М., Иванова Л.Н. Получение функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеток из материала кардиальных эксплантов человека // Материалы 2-го Национального Конгресса по регенеративной медицине. 2015. Москва. «МЕДИ Экспо». С. 72-73.
4. **Саая Ш.Б.**, Захарова И.С., Живень М.К., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Иванова Л.Н., Шевченко А.И., Закиян С.М. Создание сосудистых трансплантатов с клеточным заселением // Материалы XXX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. 25–27 июня 2015. Сочи // Ангиология и сосудистая хирургия. 2015. Т. 21. № 2 (приложение). С. 528-530.
5. **Саая Ш.Б.** «Разработка тканеинженерных сосудистых трансплантатов, заселенных эндотелиальными и гладкомышечными клетками человека, и их оценка на модели иммунодефицитных мышей SCID» // XXXII

Международная конференция «Открытые и эндоваскулярные операции в сосудистой хирургии». 23-25 июня 2016г. Калининград. С. 301-302.

6. Smirnova A., Zakharova I.S., Zhiven' M.K., **Saaya S.B.**, Strunov A.A., Zakian S.M. Development of tissue-engineered chitosan-polycaprolactone blends for vascular surgery // 12nd International Congress of cell biology. 2016. Prague. P.179.

7. **Saaya S.** Development of polycaprolactone scaffolds seeded with human endothelial and smooth muscle cells, in vivo evaluation in SCID mice. International Symposium Charing Cross, 25-28 April 2017, London. United Kingdom

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликованы 5 печатных работ в журналах из перечня ВАК.

1. **Захарова И.С., Живень М.К., Саая Ш.Б., Карпенко А.А., Шевченко А.И., Струнов А.А., Покушалов Е.А., Закиян С.М.** Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов. ПАТОЛОГИЯ КРОВООБРАЩЕНИЯ И КАРДИОХИРУРГИЯ (2015) Т. 19. No 4–2. С. 43–54.

2. **Саая Ш.Б., Захарова И.С., Живень М.К., Шевченко А.И., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Иванова Л.Н., Закиян С.М.** Оценка функциональных свойств человеческих эндотелиальных и гладкомышечных клеток после заселения на поверхности из естественных и синтетических материалов. ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ том XVIII № 3–2016. С. 94-101. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101

3. **I. S. Zakharova, M. K. Zhiven, Sh. B. Saaya, A. I. Shevchenko, A. M. Smirnova, A. Strunov, A.A. Karpenko, E. A. Pokushalov, L. N. Ivanova, P. I. Makarevich, Y. V. Parfyonova, E. Aboian, S. M. Zakian.**

Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts. *Journal of Translational Medicine* 2017 15:54 DOI: 10.1186/s12967-017-1156-1.

4. **Захарова И.С., Смирнова А.М., Живень М.К., Саая Ш.Б., Шевченко А.И., Закиян С.М. Иванова Л.Н.** Разработка тканеинженерных конструкций на основе смеси хитозана и поликапролактона для сосудистой хирургии // *ГЕНЫ И КЛЕТКИ*. 2016. Т. 11. №4. С. 50-56.

5. **Саая Ш.Б., Захарова И.С., Живень М.К., Шевченко А.И., Смирнова А.М., Лактионов П.П., Степанова А.О., Ромащенко А.В., Волков А.М., Завьялов Е.Л., Покушалов Е.А., Иванова Л.Н., Закиян С.М., Карпенко А.А.** Био- и гемосовместимость тканеинженерных конструкций из поликапролактона, заселенных человеческими эндотелиальными и гладкомышечными клетками, после имплантации в брюшную аорту мышам SCID. *КОМПЛЕКСНЫЕ ПРОБЛЕМЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ* 2017 №3. С. 47-63.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, содержащих обзор литературы, описание используемых материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Указатель литературы содержит 3 отечественных и 163 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 34 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клетки, полученные ферментативным гидролизом коллагеназой из миокарда выходного отдела правого желудочка при помощи магнитного

сортинга и культивирования в среде EGM, являются эндотелиальными, при культивировании в среде SmGM – гладкомышечными.

2. Полученные эндотелиальные клетки обладают функциональной активностью *in vitro* – образуют капилляроподобные структуры в матрикеле, метаболизируют ацетилированную форму липопротеидов низкой плотности, содержат в цитоплазме функциональные микровезикулы – тельца Вейбеля-Паладе.

3. Клетки, выделенные предложенным способом, обладают паракринным эффектом при изучении *in vivo* в моделях с ишемией конечности и составе матригельного абдоминального трансплантата.

4. Тканеинженерные конструкции из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем и с клеточным заселением при наблюдении *in vivo* способствуют формированию целостного эндотелиального монослоя с внутренней стороны и прорастают васкуляризированной фиброзной капсулой с наружной стороны.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

В соответствии поставленной целью и намеченными задачами было решено выполнить исследование в три этапа. Первый этап включал получение и характеристику эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vitro* и *in vivo*. Вторым этапом стало исследование полученных клеток на различных сосудистых матриксах и выявление типа материала обеспечивающего наилучшую фиксацию и поддержание жизнеспособности клеток. Третьим этапом выполнили эксперимент *in vivo*. Провели сравнительную оценку изготовленных клеточно-заселенных полимерных заплат и подобных заплат без заселения на иммунодефицитных мышах SCID.

Клеточные популяции были получены из миокарда человека. По данным проточной цитофлуориметрии доля эндотелиальных клеток в этой популяции составила 16,4%. После магнитного сортирования и культивирования их в среде содержащей факторы роста (EGM) доля ЭК увеличилась до 72,6%. При

культивировании гладкомышечных клеток в среде SmGM (среда для гладкомышечных клеток) процентное содержание ГМК увеличилась с 88% до 96% (рисунок 1).

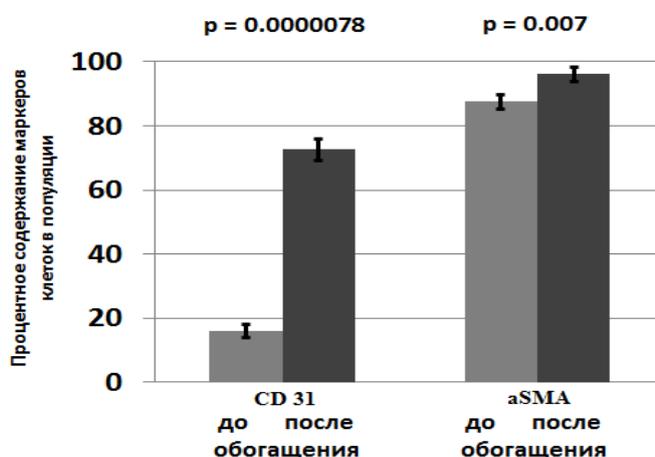


Рисунок 1. Характеристика поверхностных и внутриклеточных антигенов методом проточной цитофлуориметрии в культурах клеток кардиальных эксплантов до и после магнитного сортирования. Сравнение клеток, культивированных в среде для эндотелиальных клеток до и после магнитного сортирования (левая картина). Сравнение клеток, культивированных в среде для гладкомышечных клеток (SmGM) на втором и пятом пассажах (правая картина). CD 31, VEGFR2 – маркеры эндотелиальных клеток, αSMA – маркер гладкомышечных клеток, CD 90 – маркер фибробластных и мезенхимальных стволовых клеток.

Иммунофлуоресцентное окрашивание подтвердило что клетки окрашиваются маркерами характерными для эндотелиальных клеток (CD31) и гладкомышечных клеток (αSMA) и нарабатывают межклеточный матрикс – фактор Вон-Виллебранда (vWF), эластин, фибронектин и коллаген (рис. 2).

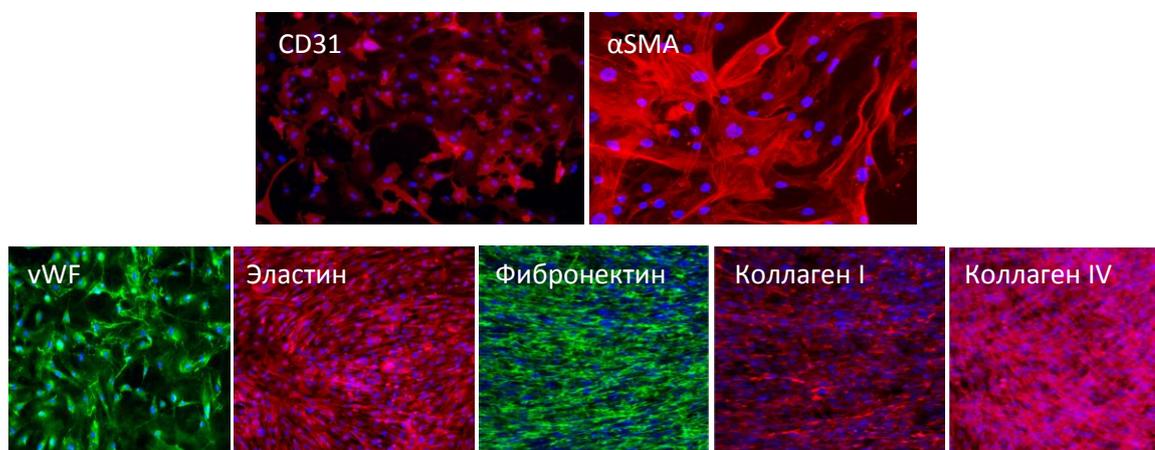


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных и гладкомышечных клеток.

Примечание: CD 31 – ЭК, αSMA – ГМК, vWF, эластин, фибронектин, коллаген I и IV – межклеточный матрикс.

Методом просвечивающей электронной микроскопии показано наличие в исследуемой популяции телец Вейбеля-Паладе (рис. 3). Проведены стандартные тесты, проводимые для функциональной оценки эндотелиальных клеток: 1 - образование капилляроподобных структур в матрикеле, 2 - метаболизирование ацелированной формы липопротеина низкой плотности (acLDL), 3 - окрашивание антителами к CD31 (рис 4).

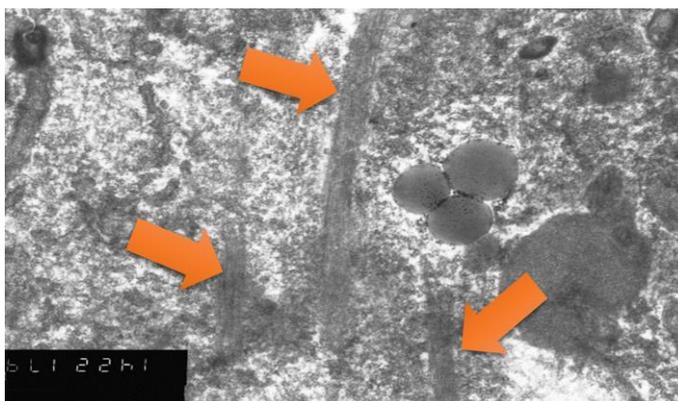


Рисунок 3. Ультраструктура обогащенных эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека. Электронная микроскопия эндотелиальной клетки.

Примечание: Стрелками обозначены тельца Вейбеля-Паладе

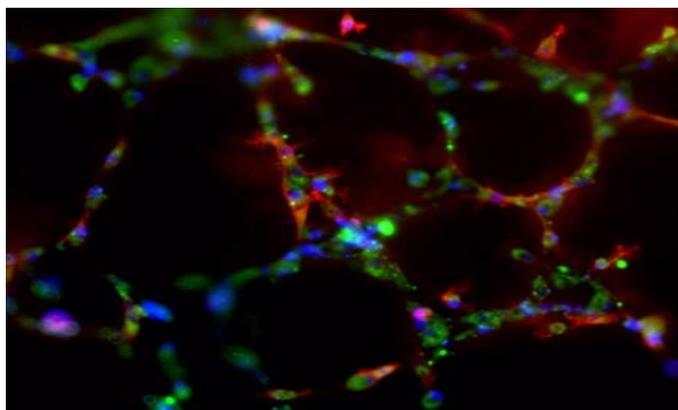


Рисунок 4. Сеть капилляроподобных структур в матрикеле, образованных ЭК, сортированными по маркеру CD31 из кардиальных эксплантов человека.

Примечание: зеленым цветом показаны липопротеиды низкой плотности поглощенные эндотелиальными клетками, окрашивание антителами к CD31 показан красным цветом.

Для оценки функциональных свойств *in vivo* обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток мы провели 2 эксперимента. Для исключения реакции отторжения клеточно-заселенного трансплантата для

проведения этих тестов мы использовали иммунодефицитных мышей Nude и SCID. По результатам этих исследований было выявлено, что введение смеси ЭК и ГМК способствует более сильной локальной неоваскуляризации в отличие от изолированного введения только ЭК и контрольных растворов (рисунок 5 и 6).

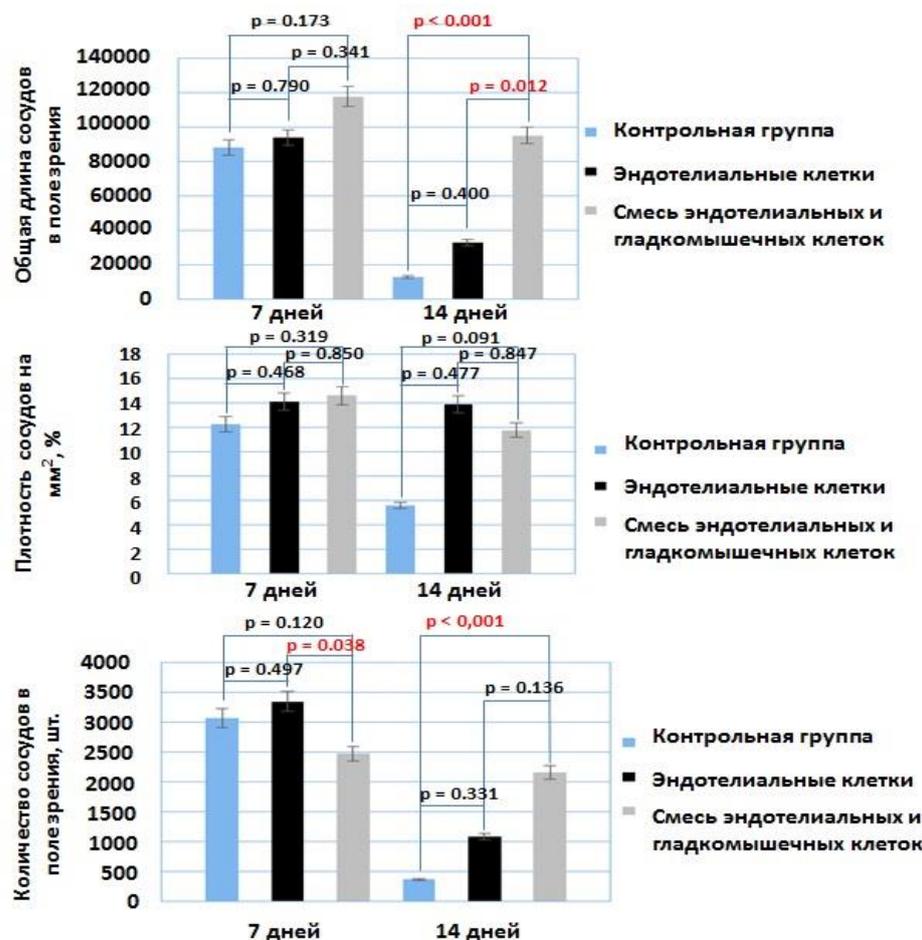


Рисунок 5. Гистограмма количества, плотности и общей длины сосудов на 7 и 14 день после инъекции клеток в ишемическую область

Примечание: Количество сосудов в поле зрения и общая длина сосудов в поле зрения в группе где вводились смесь ЭК и ГМК на 14 сутки достоверно выше чем контрольной группы. Общая длина сосудов поле зрения в группе где вводились смесь ЭК и ГМК на 14 сутки достоверно выше чем в группе в которой вводились изолированные ЭК.

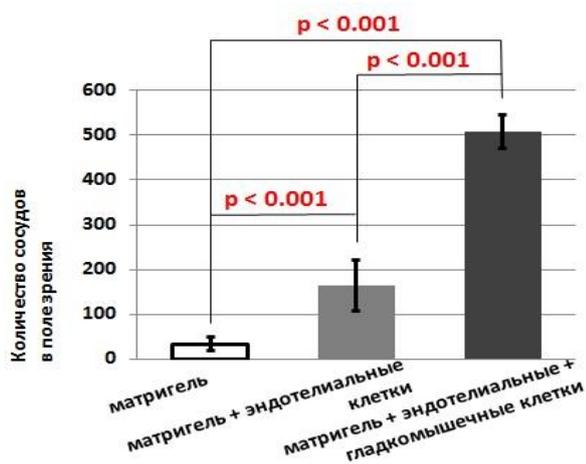


Рисунок 6. Гистограмма количества сосудов в поле зрения

Примечание: Количество сосудов в поле зрения в группе где вводились матригель с ЭК достоверно выше чем в контрольной группе. Количество сосудов в поле зрения в группе в которой вводились матригель со смесью ЭК и ГМК достоверно выше от двух остальных групп

Одна из ключевых задач тканевой инженерии сосудов – выбрать такой материал для 3D матрикса (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.

Мы изучили способность эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из кардиальных эксплантов человека, к адгезии и пролиферации на подложках из синтетических материалов, широко используемых в настоящее время в клинической практике: полиэтилентерефталате (ПЭТ, лавсан, дакрон, Intergard) и политетрафторэтилене (ПТФЭ, Gore-Tex), на подложке из ксеноперикарда (Neocor), а также на подложках из синтетических материалов поликапролактона (ПКЛ с МПВС) и полилактид-

ко-кликорида (ПЛГА), полученных методом электроспиннинга в лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН (рис. 8).

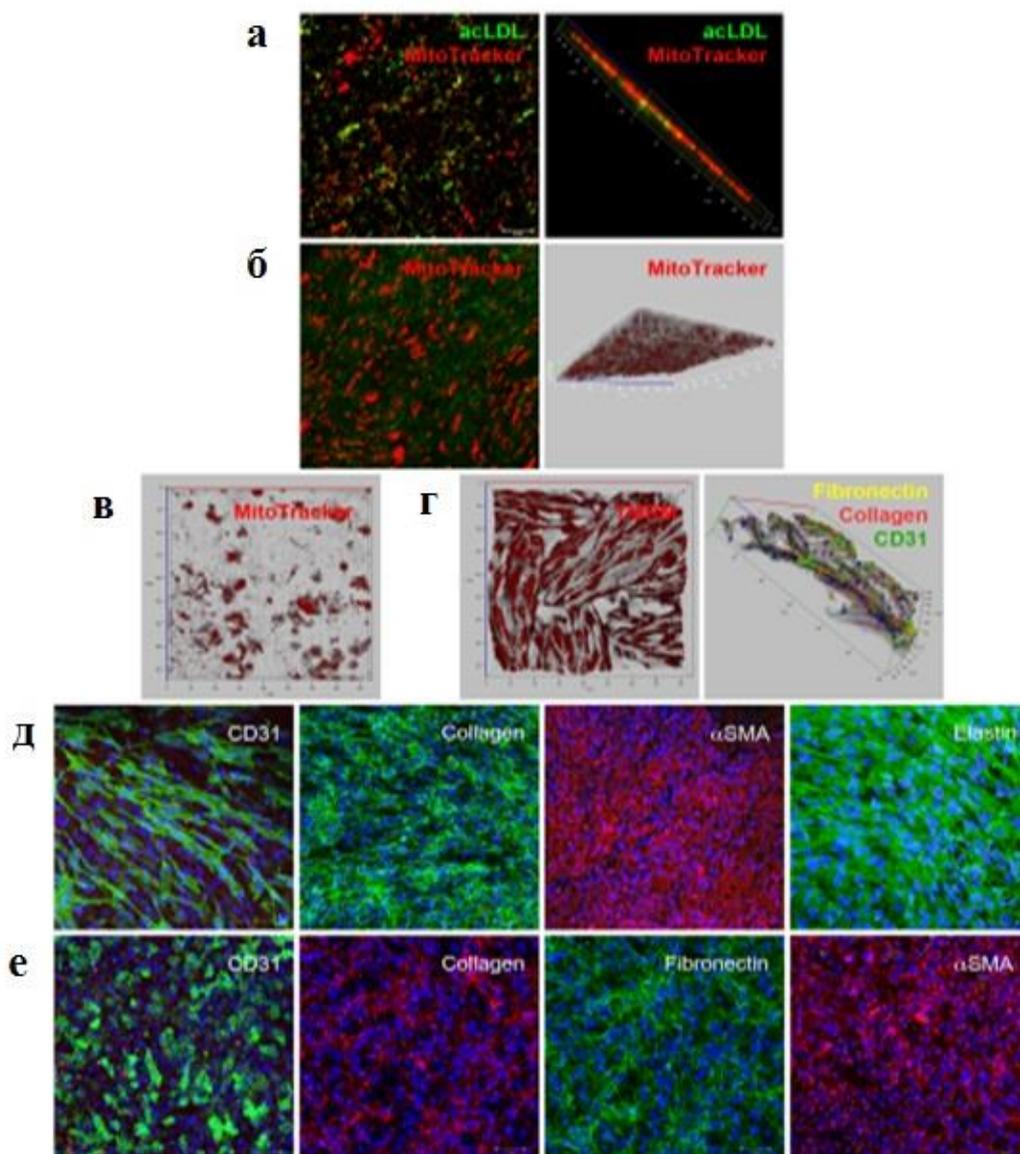


Рисунок 8. Клетки заселенные на сосудистые матрицы

Примечание: а – ксеноперикард, б – децеллюляризованная гомоартерия, в – ПТФЕ, г – ПЭТ. Окраска клеток с acLDL, митотрейкером (прижизненный краситель клеток, д – ПКЛ с МПВС, е – ПЛГА. Окраска клеток на CD31, α SMA, коллаген, эластин и фибронектин. а-г – неудовлетворительная плотность заселения клеток на поверхности материалов, монослоя клеток не визуализируется. д-е – удовлетворительная наработка межклеточного вещества (эластина, коллагена и фибронектина) и сохранение специфических маркеров ЭК и ГМК.

По результатам эксперимента, наиболее оптимальными для создания клеточно-заселенных тканеинженерных сосудов малого диаметра являются синтетические биodeградируемые ткани, полученные из волокон полимеров поликапролактона (ПКЛ) и полилактид-ко-гликолида (ПЛГА). Схема

заселения 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатином, представлена на рисунке №9.

Экспериментальная часть *in vivo*



Рисунок 9. Схема заселения 3D матрицы из ПКЛ с МПВС эндотелиальными и гладкомышечными клетками

Примечание: На стороне заплаты, которая контактировала с кровотоком, заселяли ЭК, на другой стороне, где заплата контактировала с окружающими тканями, заселяли ГМК. Между этими слоями расположен малопроницаемый внутренний слой (МПВС) для поддержания 2х-слойности трансплантата. Толщина заплаты менее 100мкм. (0,1мм)

Для выполнения такого эксперимента нами был разработан дизайн исследования, представленный на рисунке 10. Оценка био- и гистосовместимости проводилась на 35 мышах. Чтобы исключить индукцию иммунного ответа на человеческие клетки для эксперимента использовали иммунодефицитные мыши SCID линии *Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}*, которые содержались в ЦКП «SPF»-виварий ИЦиГ СО РАН.

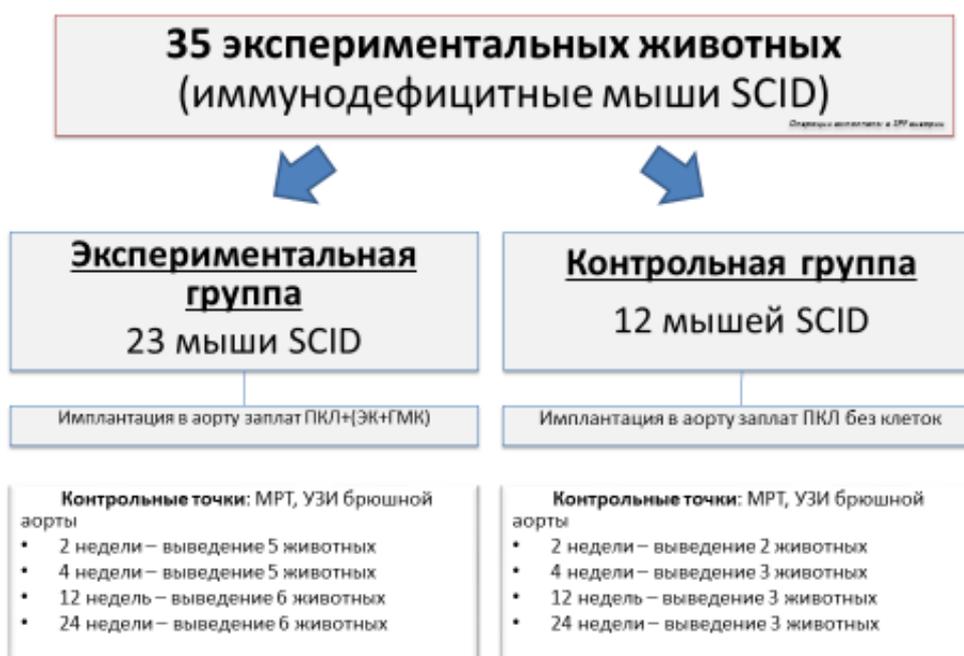


Рисунок 10. Дизайн эксперимента *in vivo*

Были прооперированы 35 мышей согласно протоколу (см. материалы и методы). Этапы имплантации заплаты показаны в рисунке 11. При прошивании нитями прорезывании и деформации заплат не отмечались. Места проколов не зияли, кровотечения из них после запуска кровотока не было. Это связано с наличием в этих 3D матрицах среднего слоя - МПВС, выступающего в роли эластомерного слоя, плотно обволакивающего нить и герметизирующего прокол. Заплата к аорте прилежала плотно за счет волокнистой структуры, которая обеспечивала многочисленные контакты со стенкой аорты. Хирургически значимого кровотечения после запуска кровотока не было, гемодинамически значимой деформации области имплантации заплат не наблюдалось, пульсация аорты проксимальнее и дистальнее места операции была удовлетворительной. Достоверной разницы времени операции, времени окклюзии аорты и гемостаза между 2мя группами не выявлено (таблица 1).

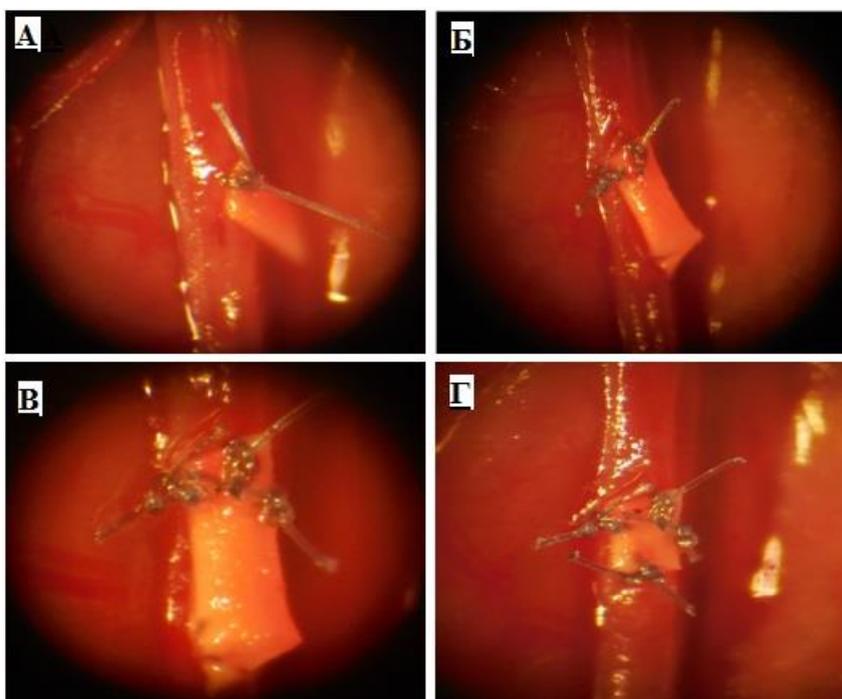


Рисунок 11. Заплата, имплантированная в брюшную аорту мыши

Примечание: Этапы имплантации заплаты. А,Б,В – наложение 1го, 2го и 3го узла, Г – перед наложением 4го узлового шва деформированная часть заплаты иссекалась

Согласно дизайну исследования, мыши были разделены на 2 группы: 1-ая группа экспериментальная – в брюшную аорту имплантировалась заплата из ПКЛ с МПВС, заселенная ЭК и ГМК, 2-я группа контрольная – в брюшную аорту имплантировалась заплата из ПКЛ с МПВС без заселения клеток. Достоверных различий некоторых параметров в этих двух группах не выявлено (таблица 1)

Таблица 1

Характеристика прооперированных животных

Характеристика	Экспериментальная группа	Контрольная группа	P
Количество	23 (65,7%)	12 (34,3%)	-
Возраст (недели)	7	7	1,00
Ср. масса животных (гр.)	24,26±1,15	23,66±1,22	0,63
Диаметр аорты (мкм)	600±35	600±35	1,00
Площадь имплантированной заплат (мм ²)	0,5	0,5	1,00
Тромбоз	1 (4,3%)	1 (8,3%)	0,58

По одной мышке из каждой группы на вторые сутки после операции умерли от тромбоза брюшной аорты. На первые сутки после операции у обеих умерших мышечей наблюдалась тотальная мышечная контрактура задних конечностей вследствие тромбоза аорты. Вероятно, аорта была критически сужена при наложении сосудистых швов. Одна мышка из контрольной группы на 20 неделе умерла по причине, не связанной с оперативным вмешательством. Остальные мыши в течение 24 недель были живы. Достоверных различий в продолжительности операций и окклюзий аорты в экспериментальных группах не выявлено (таблица 2). На каждой точке у всех мышечей оценивалась проходимость брюшной аорты при помощи УЗИ и МРТ.

Продолжительность операции и окклюзии аорты в экспериментальных группах

Тип заплаты	Общее время операции (минут)	Время окклюзии аорты (минут)	Время гемостаза (минут)
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	50,34 [47,85; 52,83]	32,26 [30,43; 34,08]	2,95 [2,59; 3,31]
Заплата из ПКЛ без клеток	53,83 [50,45; 57,21]	35,75 [34,41; 37,08]	2,83 [2,37; 3,28]
P	1,00	0,07	0,71

Результаты УЗИ и МРТ брюшной аорты исследуемых мышей представлены на рисунках 12 и 13. По результатам ультразвукового триплексного исследования у всех мышей контрольной и экспериментальной групп на всех контрольных точках брюшная аорта была проходима, скорости кровотока в пределах нормы с магистральным типом кровотока (рис 12). Учитывая сохранение нормального кровотока без повышения линейной скорости кровотока в области имплантированной заплаты мы исключили гемодинамически значимое сужение и/или окклюзия брюшной аорты. Таким образом, это указывает на то, что имплантированные заплаты в обеих группах обеспечивают хорошую тромборезистентность в течение 24 недель.

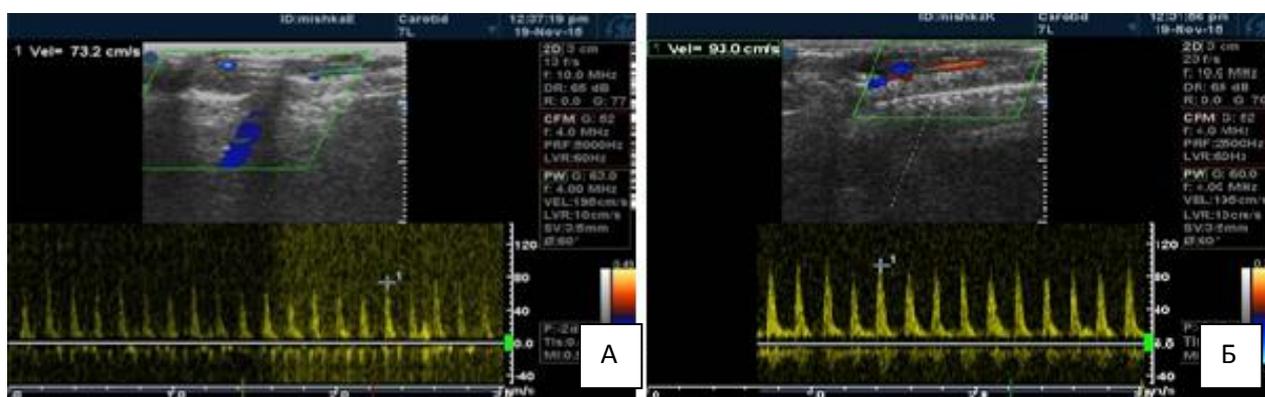


Рисунок 12. Дуплексное сканирование аорты в области имплантированной заплаты через 2 недели после операции. Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Израиль)

Примечание: Отмечается кровоток магистрального типа. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа. Скорости кровотока в пределах допустимых значений.

Таблица 3

Ультразвуковая характеристика кровотока в оперированной аорте

Тип заплаты	Линейная скорость кровотока в зоне имплантации заплаты на 4 неделе наблюдения (см/сек)			P
	Проксимальнее заплаты	В области заплаты	Дистальнее заплаты	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	74,47	84,82	81,13	0,36
Заплата из ПКЛ без клеток	77,66	81,25	85,75	0,09
P	0,93	0,10	0,49	

Примечание: Как видно из таблицы 3 – характеристики кровотока на 4 неделе наблюдения в исследуемых группах не отмечались.

Таблица 4

Ультразвуковая оценка кровотока в оперированной аорте

Тип заплаты	Линейная скорость кровотока в зоне имплантации заплаты на 24 неделе наблюдения (см/сек)			P
	Проксимальнее заплаты	В области заплаты	Дистальнее заплаты	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	84,69	83,69	83,78	0,66
Заплата из ПКЛ без клеток	83,58	84,33	83,01	0,45
P	0,15	0,63	0,10	

Примечание: Как видно из таблицы 4 – характеристики кровотока на 24 неделе наблюдения в исследуемых группах не отмечались.

По данным ультразвукового доплеровского сканирования линейная скорость кровотока (ЛСК) в области имплантации заплаты достоверно не отличалась между двумя группами ($p > 0,10$) на 4 неделе наблюдения (таблица 3). Аналогично достоверной разницы линейной скорости кровотока через 24 недели между экспериментальным и контрольным группами также не выявлено (таблица 4). Средняя линейная скорость кровотока в брюшной аорте у неоперированных мышей была равна 87,51 см/с.

Проподимость брюшной аорты также была подтверждена по результатам МРТ брюшной полости. Как в экспериментальной, так и в

контрольной группах визуализированы брюшная аорта и подвздошные артерии без дефектов наполнения, что исключало гемодинамически значимые стенозы или окклюзии брюшной аорты. Отсутствие аневризм и разрывов заплат характеризует их механическую прочность (рис 13).

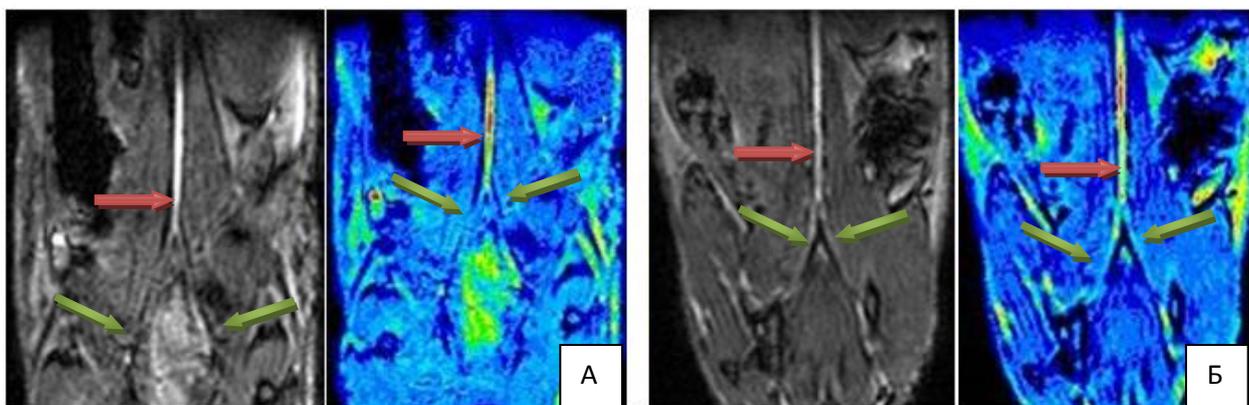


Рисунок 13. МРТ брюшной аорты в ангиорежиме через 4 недели после операции. BioSpec 117/16 USR (Bruker)

Примечание: Красными стрелками указана проходимость брюшной аорты, зелеными стрелками указаны проходимые подвздошные артерии. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа

После оценки проходимости брюшной аорты по МРТ и УЗИ на каждой контрольной точке мы выполняли иммуногистологические исследования имплантированных заплат.

При выделении брюшной аорты в экспериментальной группе, где имплантированы заплаты с ЭК и ГМК человека, визуально отмечалась более выраженная локальная неоваскуляризация в области наружной поверхности имплантированной заплаты (рис 14А), в отличие от контрольной группы (рис 14Б), где новообразованные сосуды менее развиты. Такое различие подтверждает наличие паракринного эффекта апплицированных на заплаты клеток.

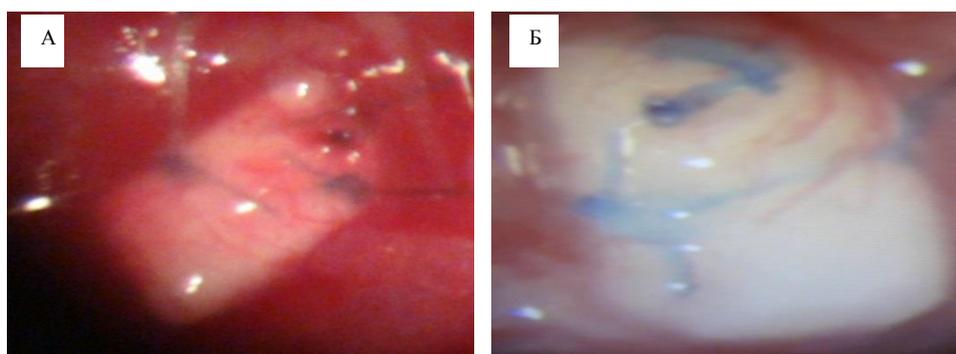


Рисунок 14. Имплантированные в брюшную аорту заплаты

Примечание: Вид снаружи. В области заплаты экспериментальной группы (А) неоваскуляризация более выражена, чем в области заплаты контрольной группы (Б).

Для того, чтобы доказать то, что имплантированные в дефект брюшной аорты заплаты контактировали с кровотоком, после эксплантации аорты вместе с заплатой выполняли продольное рассечение задней стенки сосуда противоположной имплантированной заплате таким образом, чтобы при разведении краев стенки аорты на внутренней ее поверхности определялась имплантированная заплата, контактирующая с протекающей кровью (рис 15). Визуально в этой области отмечалось незначительно углубление. Дном этого углубления являлась заплата, покрытая полупрозрачной пленкообразной субстанцией, переходящей на внутреннюю поверхность аорты.

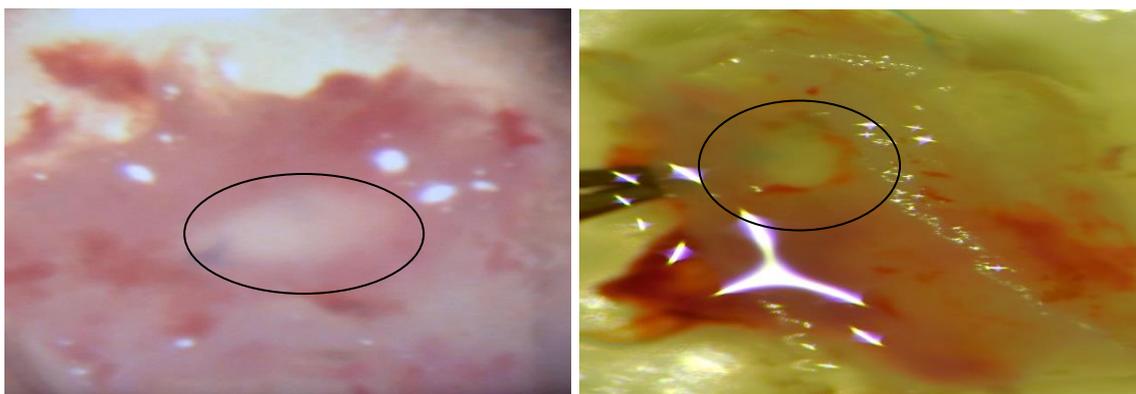


Рисунок 15. Имплантированные в брюшную аорту заплаты

Вид изнутри аорты. Область внутренней поверхности имплантированных в брюшную аорту заплат, контактировавших с кровотоком, обведены черными кругами.

До имплантации выполнено измерение толщины заплат. Выявлено незначительное утолщение клеточно-заселенных заплат в отличие от

клеточно-незаселенных. Такое утолщение, вероятно, связано с пропитыванием заплат в питательной среде во время клеточного заселения. Однако через 24 недели в экспериментальных заплатах изменения толщины не наблюдается. Толщина контрольных заплат через 24 недели после имплантации в брюшную аорту незначительно увеличилась, несмотря на это достоверной разницы не выявлено (таблица 5).

Таблица 5

Измерение толщины заплат

Тип заплаты	Толщина заплат в зависимости от срока наблюдения (мкм)		P
	До имплантации (мкм)	Через 24 недели после имплантации (мкм)	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	90,47	90,30	0,28
Заплата из ПКЛ без клеток	90,33	91,41	0,53
P	0,39	0,63	

Примечание: При обзорной микроскопии достоверной разницы толщины заплат до имплантации и через 24 недели после имплантации не выявлено. Достоверной разницы толщины заплат между группами не выявлено.

Для сравнения наличия клеточных элементов мы выполнили иммунофлуоресцентное окрашивание заплат, забранных у умерших на вторые сутки мышей. После окрашивания заплат красителем, который детектирует клеточные ядра (DAPI), выявлено, что в проекции клеточно-заселенной заплаты отмечается флуоресценция синего цвета – клеточные ядра. В контрольной группе в области заплаты наличие клеточных ядер было минимальным (рис. 16).

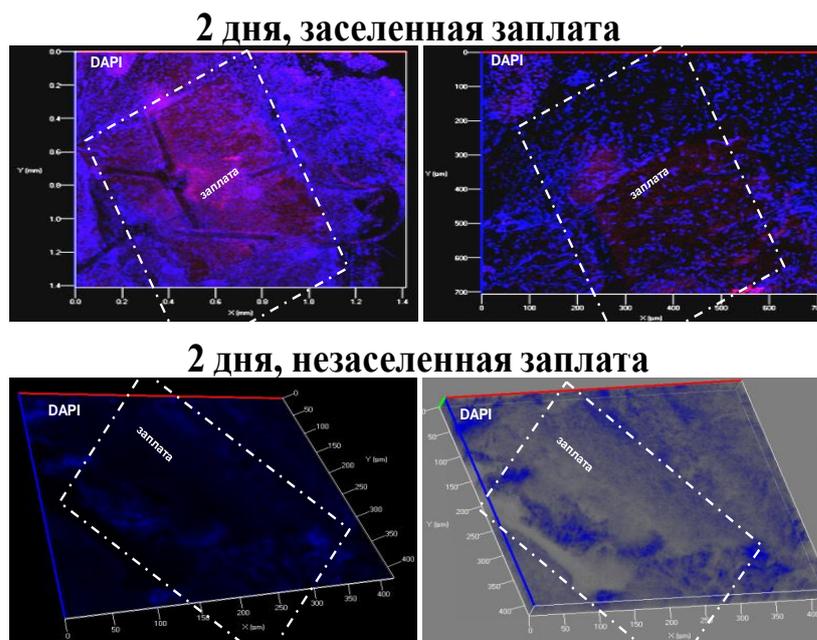


Рисунок 16. Иммунофлуоресцентное окрашивание заплат через 2 дня после имплантации

Примечание: Окраска DAPI – синяя флуоресценция указывает наличие ядерных элементов клеток в заселенной заплате. В контрольной заплате флуоресценция почти не отмечается.

При исследовании предварительно заселенных заплат уже спустя 2 недели после имплантации на внутренней поверхности были обнаружены не только человеческие эндотелиальные клетки (hCD31), но и эндотелиальные клетки мыши (mCD31) (рис.17А). На 4 и 12 неделях по результатам исследований на внешней стороне заплат идентифицировались заселенные *in vitro* гладкомышечные клетки (αSMA, SMMHC), которые ограничивались проекцией заплаты. При этом мышинный маркер ЭК (mCD31) с 4 недели в области заплат прослеживался в минимальном количестве. Несмотря на хорошую плотность клеточных ядер в области заплат, флуоресценция маркера человеческих ЭК на 24 неделе незначительно уменьшалась в отличие от 12 недель. Флуоресценция маркеров гладкомышечных клеток на 12 неделе ограничивалась пределами заплат, а на 24 неделе выходит за границы заплат. Кроме того, в экспериментальных заплатках динамика синтеза межклеточного матрикса на протяжении всего периода наблюдения остается удовлетворительной (рис. 17 Б-Г).

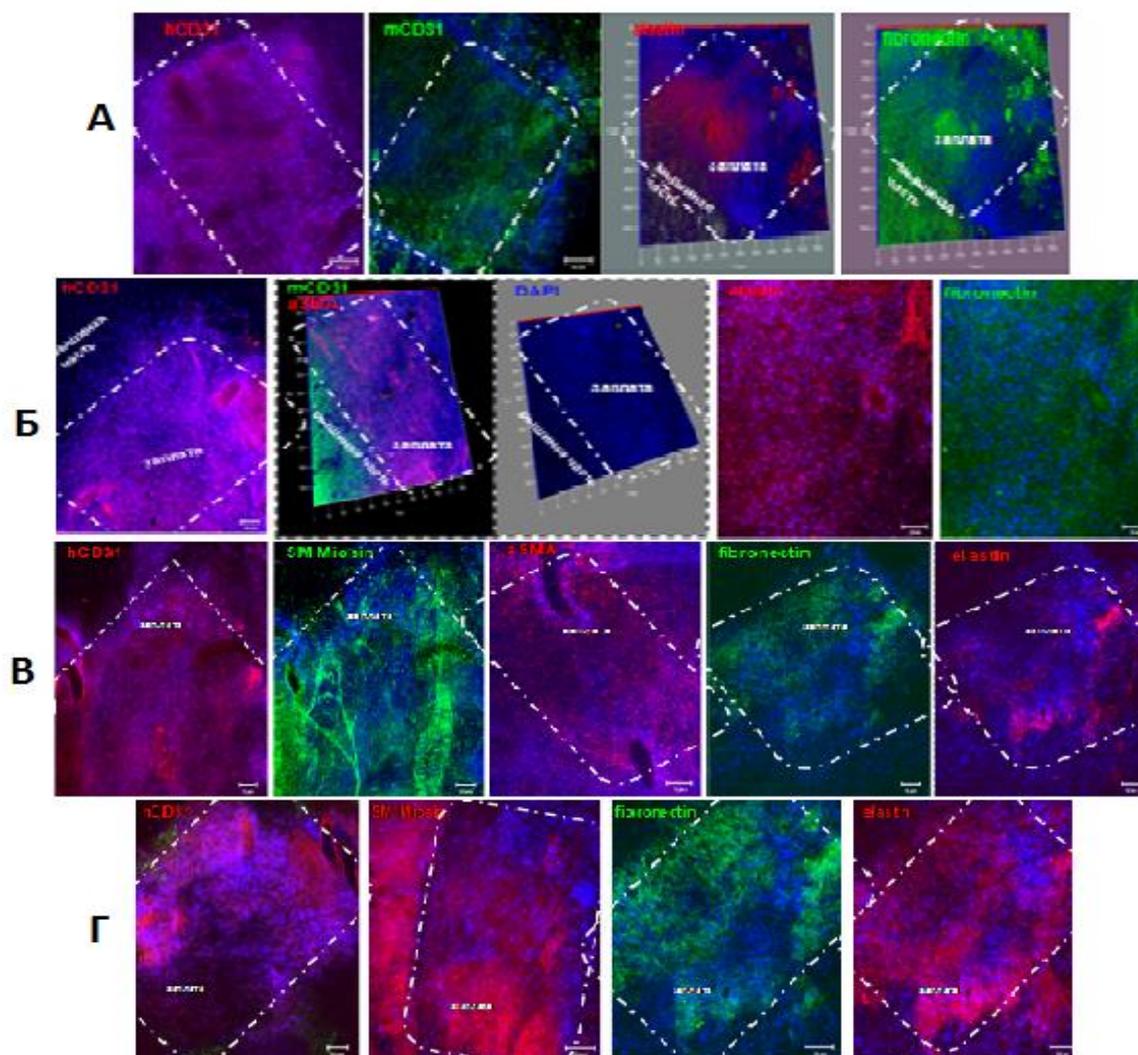


Рисунок 17. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточно-заселенных заплат на контрольных точках исследования

Примечание: А – 2 недели, Б – 4 недели, В – 12 недель, Г – 24 недель. Пунктирными линиями отмечены границы заплат.

При исследовании клеточно-незаселенных заплат было обнаружено, что спустя 2 недели после имплантации заплата заселяется собственными мышинными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. При этом расположенные на заплате мышинные клетки были не склонны к наработке межклеточного матрикса. После 12 и 24 недель на предварительно незаселенных заплатах специфические маркеры ЭК и ГМК обнаруживались в незначительном количестве. Нарботка фибронектина эндотелиальными клетками в динамике уменьшалась, однако эластин, вырабатываемый

гладкомышечными клетками сохранялся, хотя и в незначительном количестве (рис.18А-Г).

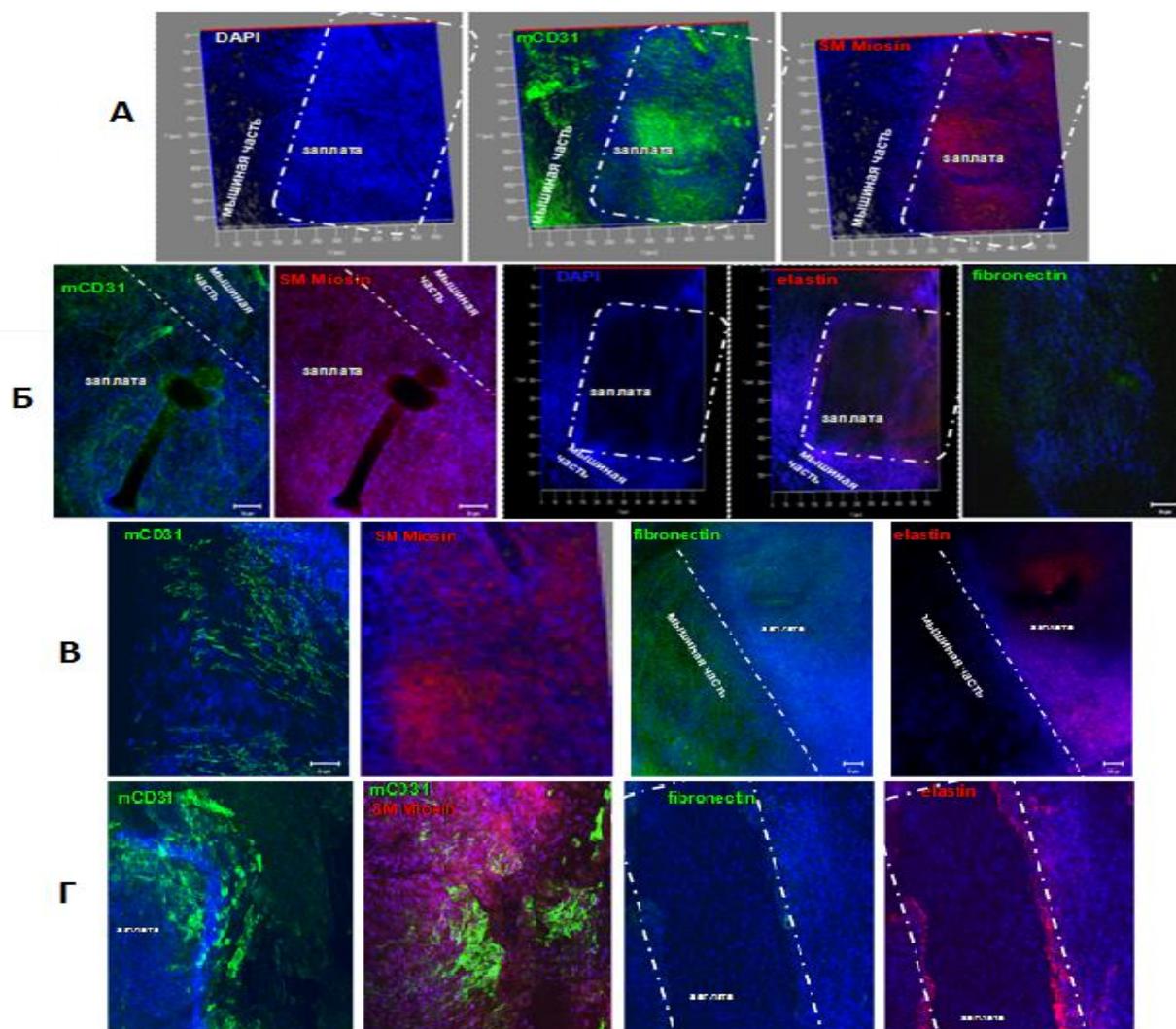


Рисунок 18. Иммунофлуоресцентное окрашивание заплат без клеточного заселения на контрольных точках исследования

Примечание: А – 2 недели, Б – 4 недели, В – 12 недель, Г – 24 недель. Квадратными линиями отмечены границы заплат.

Для того, чтобы оценить наличие человеческих клеток, которыми были заселены заплаты, дополнительно была выполнена флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) криосрезов трансплантатов с флуоресцентно-меченой ДНК человека и ДНК мыши. Было обнаружено, что в предварительно клеточно-заселенных заплатах отмечается ДНК мыши (mCot) и человека (hCot) (рис.19). Этот метод исследования также подтверждает, что заселенные человеческие клетки не теряются и поддерживают

жизнеспособность в течение 4-5 недель в условиях непрерывного артериального кровотока.

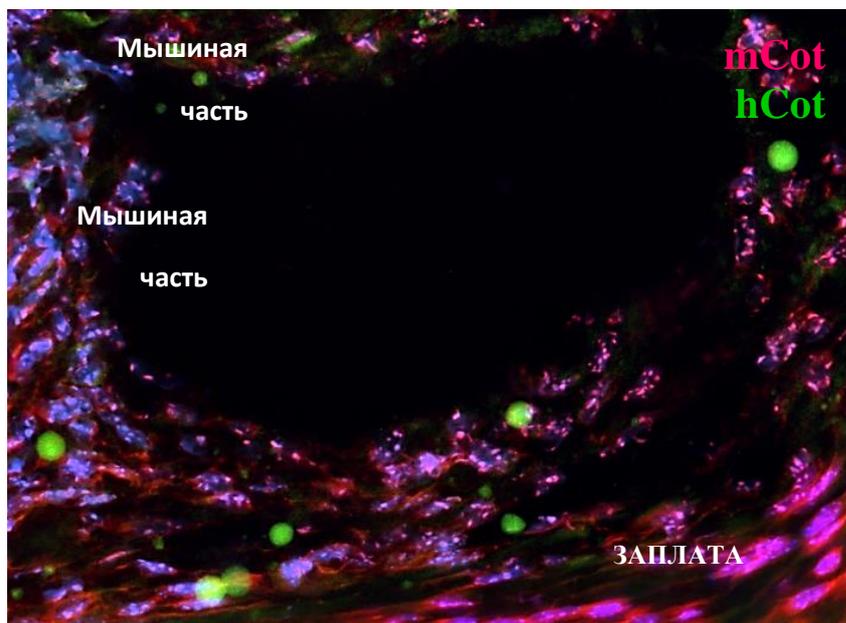


Рисунок 19. FISH (Флуоресцентная in situ гибридизация) криосреза трансплантата с зондами ДНК мыши (mCot) и человека (hCot).

Примечание: Экспериментальная заплатка через 4 недели, поперечный срез. В области имплантированной заплатки сохраняются ДНК человеческих клеток.

Гистологическое исследование в экспериментальной группе показало, что ядра клеточных элементов в толще заплат прослеживаются на всем периоде наблюдения по всем контрольным точкам (рис. 20 А-Г). На внутренней стороне заплат, контактирующей с кровотоком, в течение всего эксперимента визуализировался монослой эндотелиоцито-подобных клеток. Уже со второй недели на наружной поверхности клеточно-заселенных заплат отмечается формирование фиброзной капсулы с постепенным ее утолщением. На всех сроках исследования новообразованная капсула состоит из плотной фиброзной ткани, с большим содержанием клеток гладкомышечного и фибробластического типа с участками формирования микрососудов.

Клеточные ядра в толще контрольных заплат при окрашивании гематоксилином и эозином визуализируются на 2 и 4 неделях. Это указывает на

то, что структура 3D матрикса не препятствует миграции клеток в их внутрь (рис.20Д,Е). Несмотря на это через 12 и 24 недели гистологические исследования показывают уменьшение количества клеточных ядер в составе заплат (рис.20Ж,З). Вероятно, заплаты контрольной группы *in vivo* заселяются в первую очередь непролиферирующими клетками крови (например, лимфоцитами), которые впоследствии погибают путем апоптоза [1]. Первичное заселение непролиферирующими клетками может создавать препятствие для миграции других клеток и формирования эндотелиального монослоя. В некоторых заплатах контрольной группы отмечались участки разрыхления и даже отсутствия волокон синтетической матрицы. В этих местах возникали как отдельные коллагеновые волокна, так и очаги фиброза. Можно предположить, что при отсутствии функциональных клеток в составе 3D матрикса происходит более быстрая его деградация, которая может привести к частичной потере структурной целостности заплат. По внутренней поверхности заплат контрольной группы на всех этапах исследования целостного монослоя эндотелиоцито-подобных клеток не было отмечено. В отличие от экспериментальной группы, наружная фиброзная капсула в этой группе характеризуется менее тонким слоем из плотной фиброзной ткани с незначительным содержанием фибробластоподобных клеток.

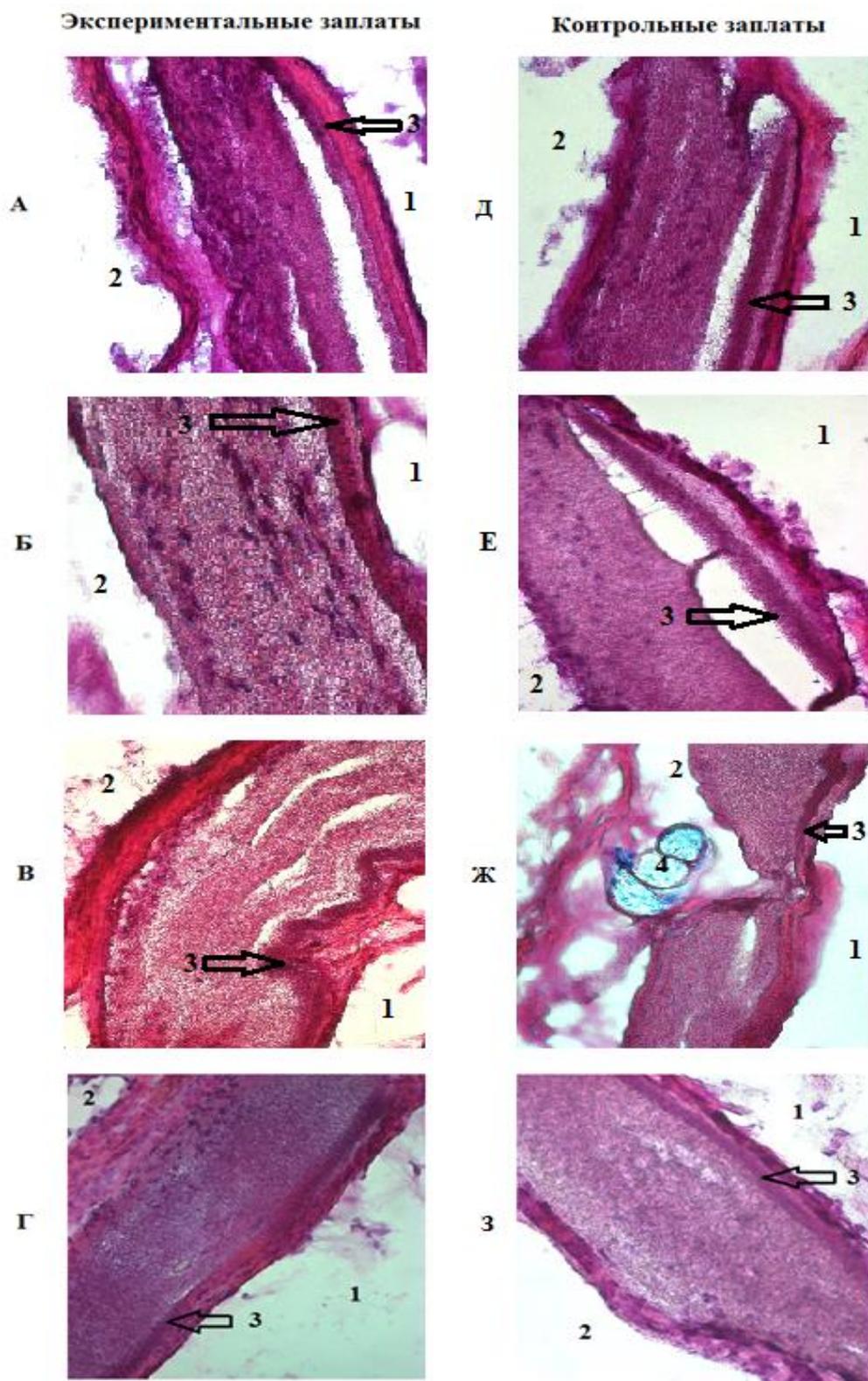


Рисунок 20. Окраска эксплантированных заплат гематоксилином и эозином.

Примечание: А – через 2 недели, Б – через 4 недели, В – через 12 недель, Г – через 24 недели. 1 – внутренняя сторона заплат, контактировавшая с кровотоком, 2 – внешняя сторона заплат, контактировавшая с окружающими тканями, 3 – малопроницаемый внутренний слой (МПВС), 4 – шовный материал (Premilene 10/0)

ВЫВОДЫ:

1. Впервые в мире разработан протокол получения функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека, и выполнена характеристика полученных эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vitro*.

2. Полученные эндотелиальные клетки характеризуются наличием маркеров эндотелиоцитов и обладают функциональной активностью, гладкомышечные клетки позитивны по маркеру гладкомышечных клеток α SMA, нарабатывают компоненты межклеточного матрикса.

3. Полученные из кардиоэкспланта эндотелиальные и гладкомышечные клетки обладают паракринным эффектом *in vivo* в зоне экспериментально-вызванной ишемии конечности и в составе матрикельного трансплантата, помещенного подкожно экспериментальному животному.

4. Заплаты из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем с предварительно апплицированными эндотелиальными и гладкомышечными клетками при имплантации в брюшную аорту экспериментальному животному обеспечивают хорошую проходимость сосудистого просвета в течение 24 недель за счет новообразованного эндотелиального монослоя. С наружной стороны они характеризуются активной интеграцией с окружающими тканями, в отличие от матриксов без клеток.

5. Синтетическая 3D матрица из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем, заселенная с внутренней стороны эндотелиальными и с наружной стороны гладкомышечными клетками, обеспечивает образование функционального эндотелиального монослоя на внутренней поверхности и наружной фиброзной капсулы, содержащей участки микрососудов и клетки гладкомышечного и фибробластического типов, в отличие от аналогичных

3D матриц без клеточного заселения, и может быть использована в качестве сосудистого трансплантата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Миокард человека может быть источником получения эндотелиальных и гладкомышечных клеток для разработки клеточно-заселенных конструкций.
2. Для повышения количества эндотелиальных клеток в популяции, их следует культивировать в среде с факторами роста для эндотелиальных клеток (EGM) после обогащения методом магнитного сортирования. Для повышения количества гладкомышечных клеток в популяции, их следует культивировать в среде с факторами роста для гладкомышечных клеток (SmGM).
3. Учитывая хорошее сохранение жизнеспособности и функциональных свойств апплицированных клеток на 3D матрицах из ПКЛ с МПВС и ПЛГА, полученных методом электроспиннинга, эти материалы могут быть применимы для производства клеточно-заселенных сосудистых протезов.