

## **БИО- И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА, ЗАСЕЛЕННЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ И ГЛАДКОМЫШЕЧНЫМИ КЛЕТКАМИ, ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ В БРЮШНУЮ АОРТУ МЫШАМ SCID**

**Ш. Б. СААЯ<sup>1</sup>, И. С. ЗАХАРОВА<sup>1,2,3</sup>, М. К. ЖИВЕНЬ<sup>1,2,3</sup>, А. И. ШЕВЧЕНКО<sup>1,2,3</sup>,  
А. М. СМИРНОВА<sup>1,4</sup>, П. П. ЛАКТИОНОВ<sup>1,3</sup>, А. О. СТЕПАНОВА<sup>1,3</sup>, А. В. РОМАЩЕНКО<sup>2</sup>,  
А. М. ВОЛКОВ<sup>1</sup>, Е. Л. ЗАВЬЯЛОВ<sup>2</sup>, Е. А. ПОКУШАЛОВ<sup>1</sup>, Л. Н. ИВАНОВА<sup>2,4</sup>,  
С. М. ЗАКИАН<sup>1,2,3,4</sup>, А. А. КАРПЕНКО<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup>*Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия*

<sup>3</sup>*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия*

<sup>4</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

**Введение.** Современное развитие химии и химических технологий позволяет изготавливать синтетические материалы, которые демонстрируют физические характеристики, близкие к характеристикам тканей организма, обладают удовлетворительной биосовместимостью и тромборезистентностью. Такие материалы востребованы в сосудистой хирургии, однако для их практического использования требуется повысить их биологические свойства, а именно способность формировать нормальный эндотелий на внутренней поверхности и клеточные слои внутри стенки. Биodeградируемые синтетические полимерные 3D-матрицы, заселенные функциональными эндотелиальными (ЭК) и гладкомышечными (ГМК) клетками реципиента, могут быть подходящим вариантом при реконструктивных оперативных вмешательствах на сосудах.

**Цель исследования.** Оценить био- и гемосовместимость тканеинженерных конструкций из поликапролактона, заселенных донорскими ЭК и ГМК в эксперименте *in vivo*.

**Материалы и методы.** 3D-матрицы, изготовленные из поликапролактона с желатином методом электроспиннинга, заселяли *in vitro* человеческими ЭК и ГМК, которые были получены из сердечной ткани. Клетки культивировали на матрицах в течение 7 дней, затем имплантировали матрицы с клетками в брюшную аорту 23 мышей SCID. Для контроля 12 мышам были имплантированы 3D-матрицы без клеточного состава. Спустя 2, 4, 12 и 24 недели после имплантации выполняли УЗИ и МРТ брюшной аорты, иммуногистологические исследования эксплантированных заплат.

**Результаты.** Заплаты из поликапролактона, заселенные функциональными ЭК и ГМК, усиливают локальную неоваскуляризацию в области их имплантации с развитием васкуляризированной фиброзной капсулы, способствуют адгезии и пролиферации ЭК и ГМК, обеспечивают хорошую проходимость брюшной аорты мышей в течение 24 недель наблюдения.

**Заключение.** Клеточно-заселенные конструкции из поликапролактона могут быть использованы для создания пациент-специфических сосудистых трансплантатов.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия сосудов, 3D-матрицы из поликапролактона с желатином, человеческие эндотелиальные и гладкомышечные клетки, поликапролактон.

## **BIO- AND HEMOCOMPATIBLE TISSUE-ENGINEERED POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS SEEDDED BY HUMAN ENDOTHELIAL AND SMOOTH MUSCLE CELLS AFTER IMPLANTATION IN THE ABDOMINAL AORTA OF SCID MICE**

**SH. B. SAAYA<sup>1</sup>, I. S. ZAKHAROVA<sup>1,2,3</sup>, M. K. ZHIVEN<sup>1,2,3</sup>, A. I. SHEVCHENKO<sup>1,2,3</sup>,  
A. M. SMIRNOVA<sup>1,4</sup>, P. P. LAKTIONOV<sup>1,3</sup>, A. O. STEPANOVA<sup>1,3</sup>, A. V. ROMASHENKO<sup>2</sup>,  
A. M. VOLKOV<sup>1</sup>, Y. L. ZAVYALOV<sup>2</sup>, Y. A. POKUSHALOV<sup>1</sup>, L. N. IVANOVA<sup>2,4</sup>,  
S. M. ZAKIAN<sup>1,2,3,4</sup>, A. A. KARPENKO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Federal State Institution Academician E.N.Meshalkin Novosibirsk State Research Institute Of Circulation Pathology Rusmedtechnology, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

<sup>4</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

**Introduction.** The modern development of chemistry and chemical technologies allow us to produce synthetic materials that exhibit physical characteristics similar to the characteristics of the tissues of the body, a satisfactory biocompatible and thromboresistant. Such materials are demanded in vascular surgery, but their practical use is required to improve their biological properties, namely the ability to form normal endothelium on the inner surface and the cell layers inside the wall. Biodegradable synthetic polymeric 3D matrices, populated by functional endothelial (EC) and smooth muscle (SMC) cells of the recipient can be a suitable option for reconstructive surgical interventions on the vessels.

**The purpose.** To evaluate bio - and hemocompatible of the tissue-engineered polycaprolactone scaffolds, seeded by donors EC and SMC in experiment in vivo.

**Materials and methods.** 3D-matrices (polycaprolactone+ gelatin) made by electrospinning method, seeded in vitro human EC and SMC, which were obtained from heart tissue. Cells were cultured on these matrices for 7 days, then were implanted in the abdominal aorta of 23 SCID mice. 3D matrices without cells were implanted 12 mice for control. After 2, 4, 12 and 24 weeks after implantation, performed ultrasound scan and MRI of the abdominal aorta, immune histological studies explanted patches.

**Results.** Polycaprolactone patches seeded by functional EC and SMC enhanced local neovascularization in the area of their implantation, with the development of a vascularized fibrous capsule, promote adhesion and proliferation of EC and SMC, provide good patency of the mice abdominal aorta during 24 weeks of observation.

**Conclusion.** Cell-populated polycaprolactone matrices can be used to create patient-specific vascular grafts.

**Key words:** tissue engineering of blood vessels, 3D matrices of polycaprolactone with gelatin, human endothelial and smooth muscle cells, polycaprolactone.

## Введение

В настоящее время для восстановления проходимости артерий малого диаметра предпочтительными являются аутологичные сосуды, так как длительность их функционирования больше, чем искусственных протезов. В виду отсутствия у многих больных подходящих аутологичных сосудов часто используются искусственные протезы из полиэтилентерэфталата (ПЭТ) и политетрафторэтилена (ПТФЭ) [39].

Одним из вариантов изготовления протезов сосудов и 3D-матриц, пригодных для реконструирования стенки сосудов, является использование метода электроспиннинга. Изготовленные при помощи этой технологии материалы обладают хорошей механической прочностью, эластичностью, близкой к эластичности стенки сосудов. Нано/микроволокна, полученные при помощи этой технологии, укладываются в трехмерную структуру, которая представляет собой хорошую подложку для культивирования клеток [8]. В зависимости от используемого основного полимера и дополнительно введенных компонентов матрицы могут демонстрировать более или менее высокую биосовместимость, интегра-

цию с окружающими тканями, гемосовместимость [9, 11]

Наряду с использованием различных 3D-матриц для повышения гемо- и биосовместимости протезов сосудов были попытки эндотелизации внутреннего просвета клетками. Известно, что ЭК и ГМК, вырабатывая биологически активные вещества (БАВ) и межклеточный матрикс (МКМ), способствуют сохранению сосудистого просвета на долгое время [16,17]. В качестве источника сосудистых клеток для заселения тканеинженерных сосудистых скаффолдов были использованы моноклеарные клетки костного мозга, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, однако испытания заселенных клетками скаффолдов не продемонстрировали существенного улучшения их биологических свойств [17, 40]. Следует отметить, что прочность связывания клеток с матриксом, и, следовательно, стабильность эндотелиального слоя в кровотоке зависит как от прочности взаимодействия клеток с материалом, так и от структуры материала [9,47]. Характер взаимодействия клеток с материалом меняется в зависимости от времени – с увеличением времени пролиферации

клеток на поверхности материала увеличивается прочность их прикрепления благодаря формированию структурированных актиновых филаментов и наработке межклеточного матрикса, кроме того, показан вклад плотности клеток при заселении [7].

В представленной работе мы исследовали способность ЭК и ГМК клеток, культивируемых на матриксе из ПКЛ с 10% желатина и малопроницаемым внутренним слоем, сохранять свою жизнеспособность, функциональный статус и способность поддерживать формирование эндотелия в условиях непрерывного кровотока.

### Материалы и методы исследования

Для выполнения эксперимента нами был раз-

работан дизайн исследования, представленный на рисунке 1. Оценка био- и гемосовместимости проводилась на 35 мышах. Чтобы исключить индукцию иммунного ответа на человеческие клетки для эксперимента использовали иммунодефицитных мышей SCID линии Crl:SHO-PrkdcscidHrhr, которые содержались в ЦКП «SPF»-виварий ИЦиГ СО РАН.

*1.1. Изготовление 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатина и малопроницаемым внутренним слоем, её наполнение с ЭК и ГМК, полученными из кардиоэкспланта человека.*

Синтетические биодegradуемые скаффолды из поликапролактона с 10% желатином кожи свиньи (Sigma, США, кат №G2500-100G) и малопроницаемым внутренним слоем (МПВС) изготовлены согласно статье [9].



Рисунок 1. Дизайн исследования

### 1.2 Получение клеток.

Человеческие ЭК и ГМК из миокарда получали по разработанному нами протоколу [10]. После механического измельчения фрагментов миокарда человека проводили ферментативный гидролиз в растворе 0,1% коллагеназы NB (Life Technologies) при 37 °С. Полученные клетки высаживали на пластик, обработанный человеческим коллагеном 4-го типа (Sigma), в культуральных средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных или гладкомышечных клеток EGM-2 и SmGM-2 (Lonza). Клетки культи-

вировались в условиях 5% CO<sub>2</sub>, 37 °С. В полученных клетках наличие маркеров ЭК и ГМК и их функциональная способность была доказана методом проточной цитофлуориметрии, иммунофлуоресцентного окрашивания, электронной микроскопии.

### 1.3 Заселение 3D матрикса.

Схема заселения 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатина представлена на рисунке 2. В процессе эксперимента для выявления пригодности клеточному заселению нами были протестированы различные сосудистые матриксы (ксеноперикард (NeoCor), децеллюляризованная гомоартерия,

ПТФЭ (Gore-Tex), ПЭТ (Intergard) матриксы полученные методом электроспиннинга – ПЛГА и ПКЛ с МПВС). Площадь заселяемой поверхности подложек составляла 2 см<sup>2</sup>. Заселение двумя типами клеток проводили постадийно: сначала одну из поверхностей заселяли гладкомышечными клетками в среде SmGM (Lonza). Через 24 часа подложку переворачивали и заселяли другую сторону эндотелиальными клетками в комбинированной

среде EGM+SmGM (Lonza). Время культивирования и оценка проводились в период от 2 до 7 дней. Клетки культивировали в условиях 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C. Учитывая сохранение жизнеспособности заселенных клеток и удовлетворительную наработку межклеточного матрикса по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания в составе ПКЛ с МПВС, этот материал выбран для дальнейшего исследования *in vivo* [11].

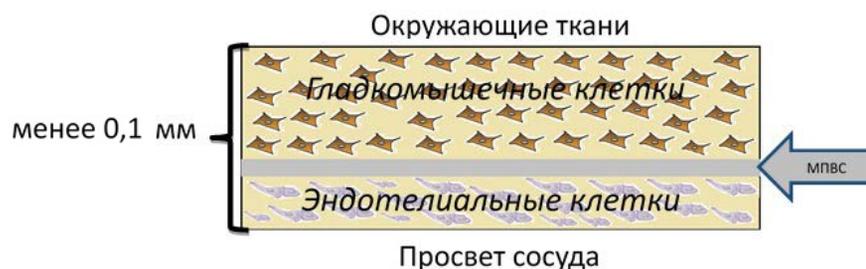


Рисунок 2. Заселение 3D матрикса из ПКЛ+МПВС с ЭК и ГМК

#### 1.4 Протокол операции.

3D матриксы, заселенные клетками, и контрольные 3D матриксы без клеток были имплантированы в брюшную аорту 35 самок мышей SCID, в возрасте 6-7 недель, средняя масса тела 24±4гр. Мыши разделены на 2 группы: в экспериментальную группу вошли 23 мыши, которым имплантированы заплатки с предварительным клеточным заселением, контрольную группу составили 12 мышей с имплантированными заплатками без клеток. Исследование на животных проводили, соблюдая «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложения к приказу Министерства здравоохранения СССР № 565 от 04.10.1977).

После обработки операционного поля под ингаляционным наркозом 1-3% изофлюрана в 100% кислороде при скорости потока 1L/min под 10×-40× увеличением срединным лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту ниже почечных артерий до бифуркации аорты. Аорту ниже почечных артерий и выше бифуркации брали на держалки (нити prolene 8/0). Далее проводили клампинг аорты держалками. Затем выполняли продольную аортотомию брюшной аорты длиной до 0,5мм. Далее в аортотомический дефект вшивалась заплатка с размерами 0,5x0,5мм 4 узловыми швами нитью «Premilene» 10/0. Запуск кровотока. Гемостаз. Послойное зашивание передней брюшной стенки и кожи нитями 6/0. Об-

работка антисептиком. Асептическая повязка. После операции мыши не получали антикоагулянты или антиагреганты.

#### 1.5 Оценка проходимости брюшной аорты по МРТ и УЗИ.

Проходимость брюшной аорты оценивали через 4, 12 и 24 недели после операции. Исследование проводили с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла. Для этого использовали T1-взвешенные изображения, полученные методом FLASH (Fast Low Angle SHot) с параметрами импульсной последовательности (TE = 2,5 мс, TR = 200 мс), и изображением (размер 3 × 3 см; на матрице 128 × 128 точек; толщиной срезов 0.31 мм и расстоянием между срезами 0,33 мм).

В эти же сроки проводили ультразвуковое исследование. Под наркозом тилетамил (золетил 50, 5 мг/кг) и ксилазин (ксилаВет, 3 мг/кг) оценивали проходимость аорты, скорости кровотока в области имплантированной заплатки через 2, 4, 12 и 24 недели при помощи аппарата Vivid 4 с линейным сосудистым датчиком.

#### 1.6 Эксплантация заплат, гистологическое и иммуногистохимическое исследования *ex vivo*.

Биологические материалы забирали на 2, 4, 12 и 24 неделе после имплантации. После однократного подкожного введения тилетамил (золетил 50, 5 мг/кг) и ксилазин (ксилаВет, 3 мг/кг) под 10×-40× увеличением лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту. После пережа-

тия аорты выполняли ее поперечное иссечение проксимальнее и дистальнее заплаты. Мышей забивали смещением шейных позвонков. После продольного рассечения задней стенки аорты из забранного материала изготавливали два вида препаратов: 1) фиксировали материал для иммуофлуоресцентной окраски и 2) заключали в реактив О.С.Т. – compound (Tissue Tek) для приготовления криосрезов, охлаждали до  $-22^{\circ}\text{C}$ . С помощью прибора Криостат НМ 550 изготавливали криосрезы толщиной 8-10 мкм. Препараты криосрезов фиксировали в течение 30 минут в 4% растворе формальдегида с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин). Для иммуногистохимической окраски пермеабелизовали препараты обработкой 1% Triton X-100 в течение часа на шейкере при комнатной температуре с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин.). Центры неспецифической сорбции ингибировали, инкубируя препараты в PBS с 1% BSA (bovine serum albumin) в течение 30 минут. Затем препараты инкубировали с первичными антителами в течение ночи при  $+4^{\circ}\text{C}$  и отмывали от избытка антител PBS (2 раза по 15 минут) при комнатной температуре. Затем препараты инкубировали со вторичными антителами, мечеными флуорохромом, в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте, отмывали от избытка антител PBS как описано выше. Ядра клеток окрашивали 0,001% DAPI. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 780 (Zeiss) в ЦКП Микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Список использованных антител и их каталожные номера представлены в нашей ранее опубликованной научной статье [11].

### 1.7 Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

#### Предобработка криосрезов перед FISH

Препараты криосрезов инкубировали в ксиле в течение 10 мин. с последующей дегидратацией в 100% этаноле 2 раза по 5 мин., далее по 5 мин в 90%, 80%, 70-75%, 50% этаноле. После этого препараты отмывались в PBS 15 мин. и инкубировались в 1% растворе Triton X-100 в течение ночи. На следующий день препараты отмывались в PBS 15 мин., переносились в предварительно разогретый до  $80^{\circ}\text{C}$  на водяной бане 10 mM раствор цитрата натрия и инкубировались в течение 1 часа. Далее препараты споласкивали в PBS и инкубировали 10 мин. в предвари-

но разогретом до  $37^{\circ}\text{C}$  0.01% растворе пепсина. После этого препараты переносили в стакан с 1% BSA, далее – инкубировали 2 раза по 5 минут в 2XSSC (раствор хлорида и цитрата натрия, (1XSSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) с последующей инкубацией в растворе Triton X-100 (0.7%)/HCl (0.1N). Препараты отмывались в 2XSSC 2 раза по 5 минут.

#### Подготовка зондов

В качестве зондов для детекции клеток человека и мыши использовались фракции ДНК быстроренатурирующих повторов Human Cot-1 DNA (15279011, Thermo Fisher Scientific) и mouse Cot-1 DNA (18440016, Thermo Fisher Scientific). Зонды были помечены флуоресцентными красителями biotin 16-dUTP (11093070910, Roche) или digoxigenin-11-dUTP (11558706910, Roche) в 30 циклах DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR) с праймером MW6 [48]. Меченые зонды Cot-1 ДНК человека и мыши (по 100 нг каждого зонда) смешивали с ДНК спермы лосося (1 мг/мл), добавляли 2 объема 100% этанола и лиофилизировали в вакуумной центрифуге. Лиофилизированные зонды растворяли в 10 мкл гибридизационной смеси, содержащей 50% формамида, 10% декстран-сульфата, 2XSSC, 1% Tween20 в течение 1 часа на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$ . Зонды в гибридизационной смеси денатурировали 5 мин. при  $75^{\circ}\text{C}$  и быстро переносили в лед во избежание обратной ренатурации.

#### Гибридизация зондов с препаратами криосрезов

Препараты криосрезов были денатурированы в предварительно разогретой смеси 70% formamide/2XSSC 20 мин. при  $70^{\circ}\text{C}$  с последующей инкубацией в 2XSSC 2 мин. Препараты высушивали при комнатной температуре. 10 мкл зонда наносили на предварительно подогретое покровное стекло, совмещали его с препаратом и инкубировали во влажной камере на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. На следующий день препараты отмывали в растворе 2XSSC/50% formamide 4 раза по 3 мин. при  $37^{\circ}\text{C}$  на водяной бане, затем в 2XSSC 4 раза по 3 мин. при  $37^{\circ}\text{C}$  и переносили в раствор 4XSSC/0.1% Tween 20 комнатной температуры.

#### Детекция

Биотинилированные зонды детектировали в системе fluorescein-avidin (A-2011, Vector Laboratories)/biotinylated anti-avidin system (BA-0300, Vector Laboratories). Меченную ди-

гоксигенином ДНК детектировали в системе anti-digoxigenin rhodamine Fab fragments (11207750910, Roche). Ядра окрашивали DAPI. Результаты гибридизации визуализировали при помощи микроскопа Nikon Ni-E.

*1.8 Окрашивание заплат с гематоксилином и эозином.*

По вышеописанной методике выполняли криосрезы заплат. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопирование препаратов выполняли посредством световой микроскопии с помощью микроскопа AXIO Lab.A1 ZEISS при увеличениях 100× и 400×. На полученных микрофотографиях оценивали строение эндотелиального слоя, структуру синтетической заплаты и наличие в них клеток, а также состав наружной фиброзной капсулы.

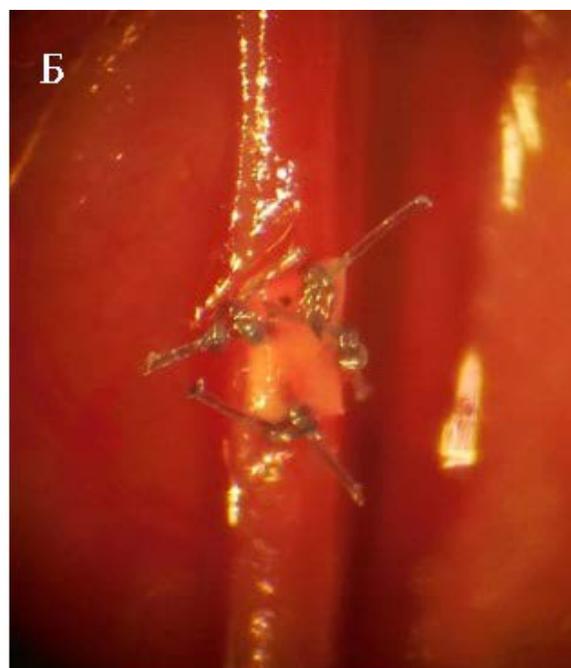
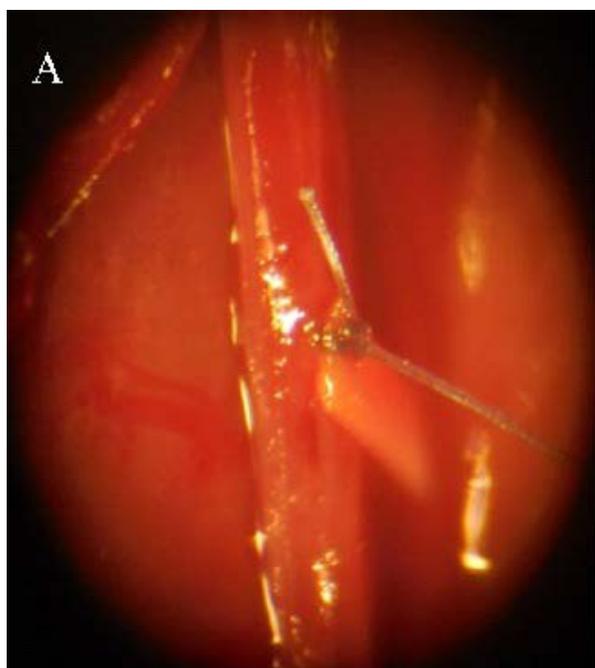
### Результаты

Этапы имплантации заплаты показаны на рисунке 3. При прошивании нитями прорезывания и деформации заплат не отмечались. Места проколов не зияли, кровотечения из них после запу-

ска кровотока не было. Это связано с наличием в этих 3D-матрицах МПВС. Он выступает в роли эластомерного слоя, плотно обволакивающего нити и не позволяющего крови течь через прокол. Заплата к аорте прилежала плотно за счет волокнистой структуры, которая обеспечивает 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.

На первые сутки после операции у двух мышей наблюдалась тотальная мышечная контрактура задних конечностей. Вероятно, аорта была критически сужена при наложении сосудистых швов, что привело к тромбозу аорты. Одна мышшь из контрольной группы на 20-й неделе умерла по причине, не связанной с оперативным вмешательством. Остальные мыши были живы в течение 24 недель.

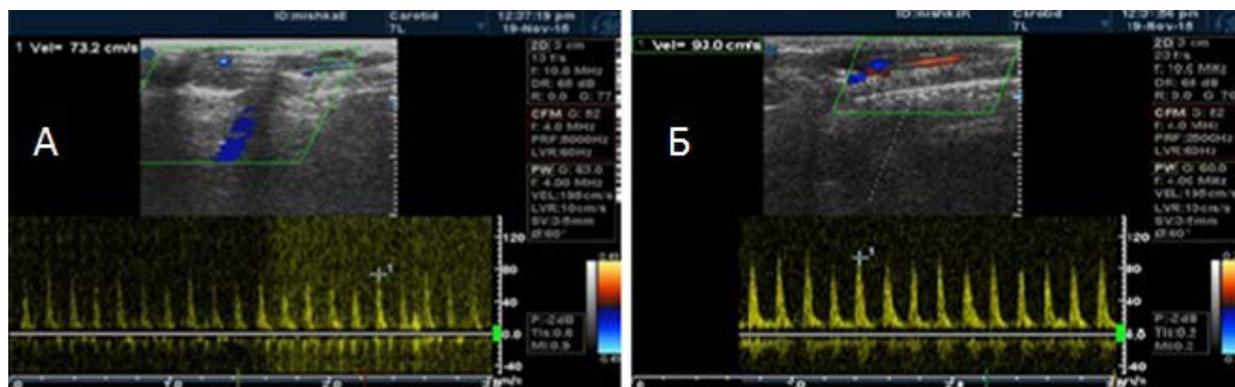
In vivo оценка имплантированной в брюшную аорту заплаты.



**Рисунок 3. Имплантация заплаты. А – наложение 1 узлового шва; Б – конечный вид**

Результаты УЗИ и МРТ брюшной аорты исследуемых мышей представлены на рис. 4 и 5. По данным ультразвукового триплексного исследования, у всех мышей контрольной и экспериментальной групп на всех контрольных точках брюшная аорта была проходима, скорость кровотока в

пределах нормы с магистральным типом кровотока (рис. 4). Учитывая сохранение нормального кровотока без повышения линейной скорости кровотока в области имплантации заплаты, можно исключить гемодинамически значимое сужение и/или окклюзию брюшной аорты. Таким образом,

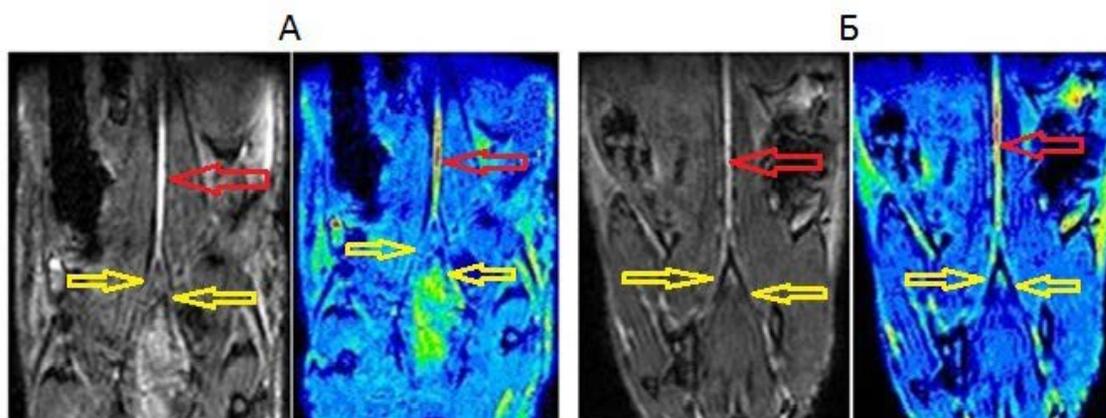


**Рисунок 4.** Ультразвуковая оценка кровотока по брюшной аорте через 2 недели после имплантации заплат. Отмечается кровоток магистрального типа. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа

это указывает на то, что имплантированные заплаты в обеих группах обеспечивают хорошую тромборезистентность в течение 24 недель.

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

трольной группах визуализированы брюшная аорта и подвздошные артерии без дефектов наполнения, что исключает гемодинамически значимые стенозы или окклюзии брюшной аорты. Отсутствие аневризм и разрывов заплат характеризует их механическую прочность (рис. 5).



**Рисунок 5.** МРТ брюшной аорты в ангиорезиме через 4 недели после операции. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа. Красными стрелками указана проходимость брюшная аорта, желтыми стрелками указаны проходимость подвздошные артерии

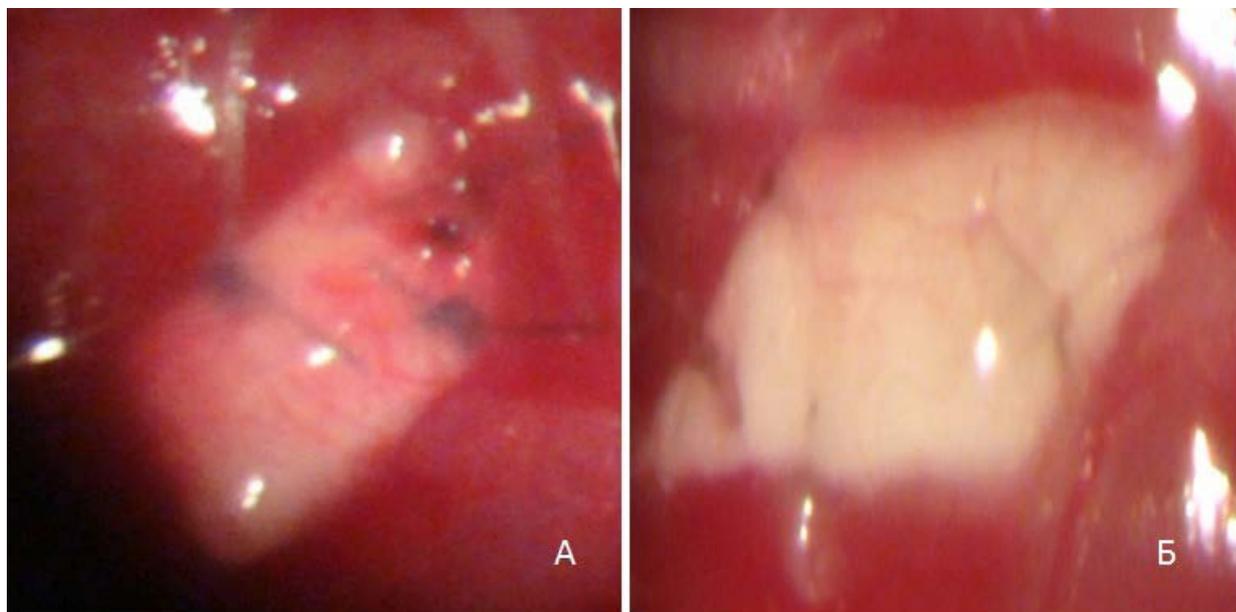
Имунофлуоресцентное окрашивание заплат имплантированных в брюшную аорту мышам (SCID).

После МРТ и УЗИ диагностики брюшную аорту резецировали вместе с имплантированной синтетической заплатой для дальнейшего иммуногистологического исследования. При выделении аорты в экспериментальной группе, где имплантированы заплаты с ЭК и ГМК, визуально наблюдалась более выраженная локальная неоваскуляризация в области наружной поверхности имплантированной заплаты (рис. 6А), в отличие от контрольной группы (рис.

6Б), где новообразованные сосуды были менее развиты.

После продольного рассечения задней стенки брюшной аорты на внутренней поверхности отмечается область имплантированной заплаты, которая контактировала с кровью после имплантации (рис.7). Визуально в этой области отмечается незначительное углубление. Дном этого углубления является заплата, покрытая полупрозрачной пленкообразной субстанцией, переходящей на внутреннюю поверхность аорты.

При исследовании предварительно заселенных заплат уже спустя 2 недели после имплан-



**Рисунок 6. Макроскопический вид заплатки снаружи. А – экспериментальная группа, Б – контрольная группа**

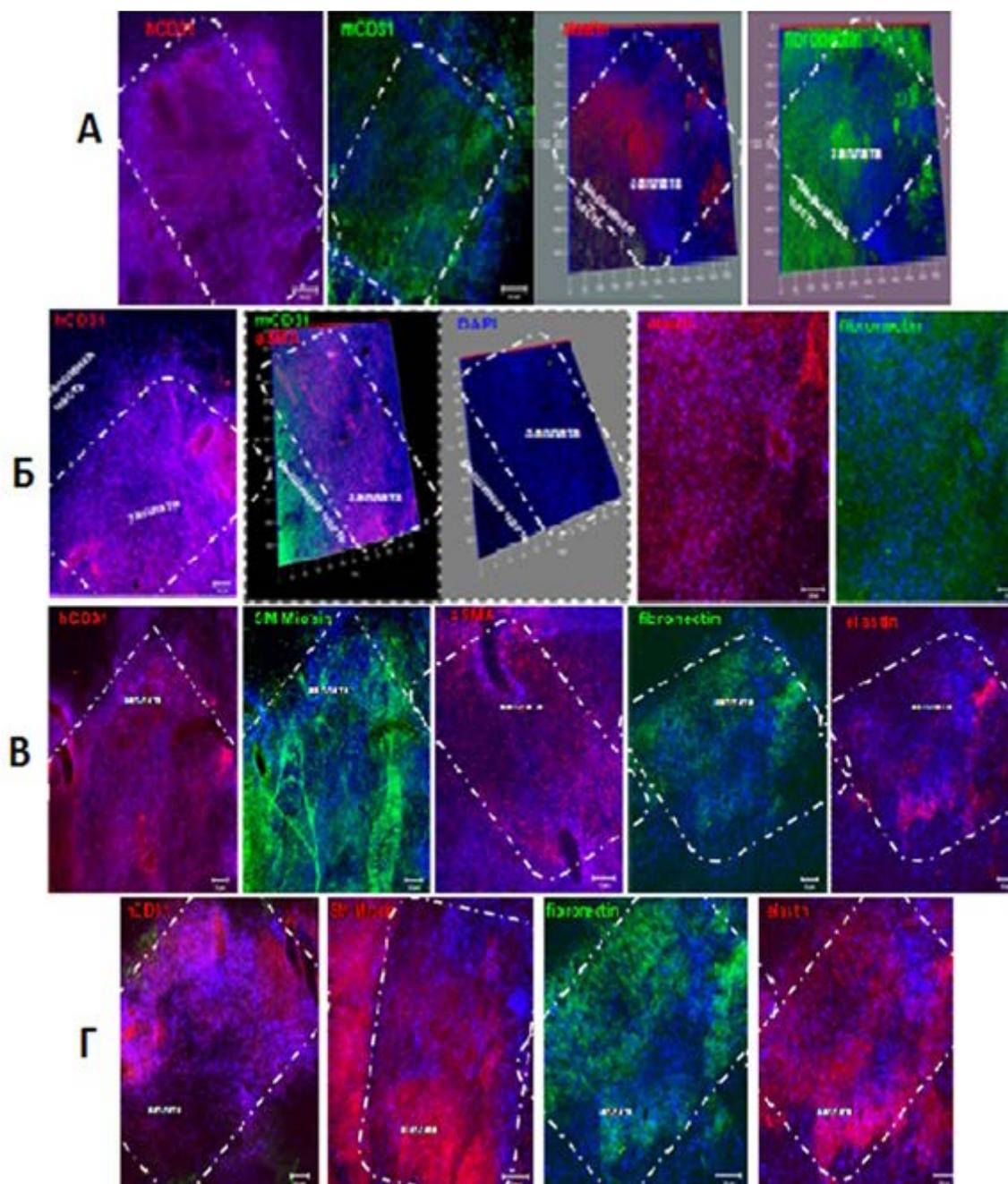


**Рисунок 7. Макроскопический вид заплатки со стороны внутренней стенки аорты**

тации на внутренней поверхности заплат были обнаружены не только человеческие эндотелиальные клетки (hCD31), но и эндотелиальные клетки мышцы (mCD31) (рис. 8А). На 4 и 12 неделях по результатам исследований на внешней стороне заплат можно уверенно идентифицировать заселенные *in vitro* гладкомышечные клетки (αSMA, SM Myosin), которые ограничиваются областью проекции заплаты. При этом мышинный маркер ЭК (mCD31) с 4-й недели в области проекции заплат прослеживается в минимальном количестве. Несмотря на хорошую плотность клеточных ядер в области проекции заплат, флуоресценция маркера человеческих ЭК на 24-й неделе незначительно уменьшается в отличие от 12 недель. Флуоресцен-

ция маркеров гладкомышечных клеток на 12-й неделе ограничивается пределами заплат, а на 24-й неделе выходит за пределы проекции заплат. Кроме того, в экспериментальных заплатках динамика синтеза межклеточного матрикса на протяжении всего периода наблюдения остается удовлетворительной (рис. 8 Б-Г).

Было обнаружено, что спустя 2 недели после имплантации предварительно не обработанная клетками заплата заселяется собственными мышинными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. При этом заселяющие заплату мышинные клетки не склонны к наработке межклеточного матрикса. После 12 и 24 недель специфические маркеры ЭК и ГМК обнаружи-



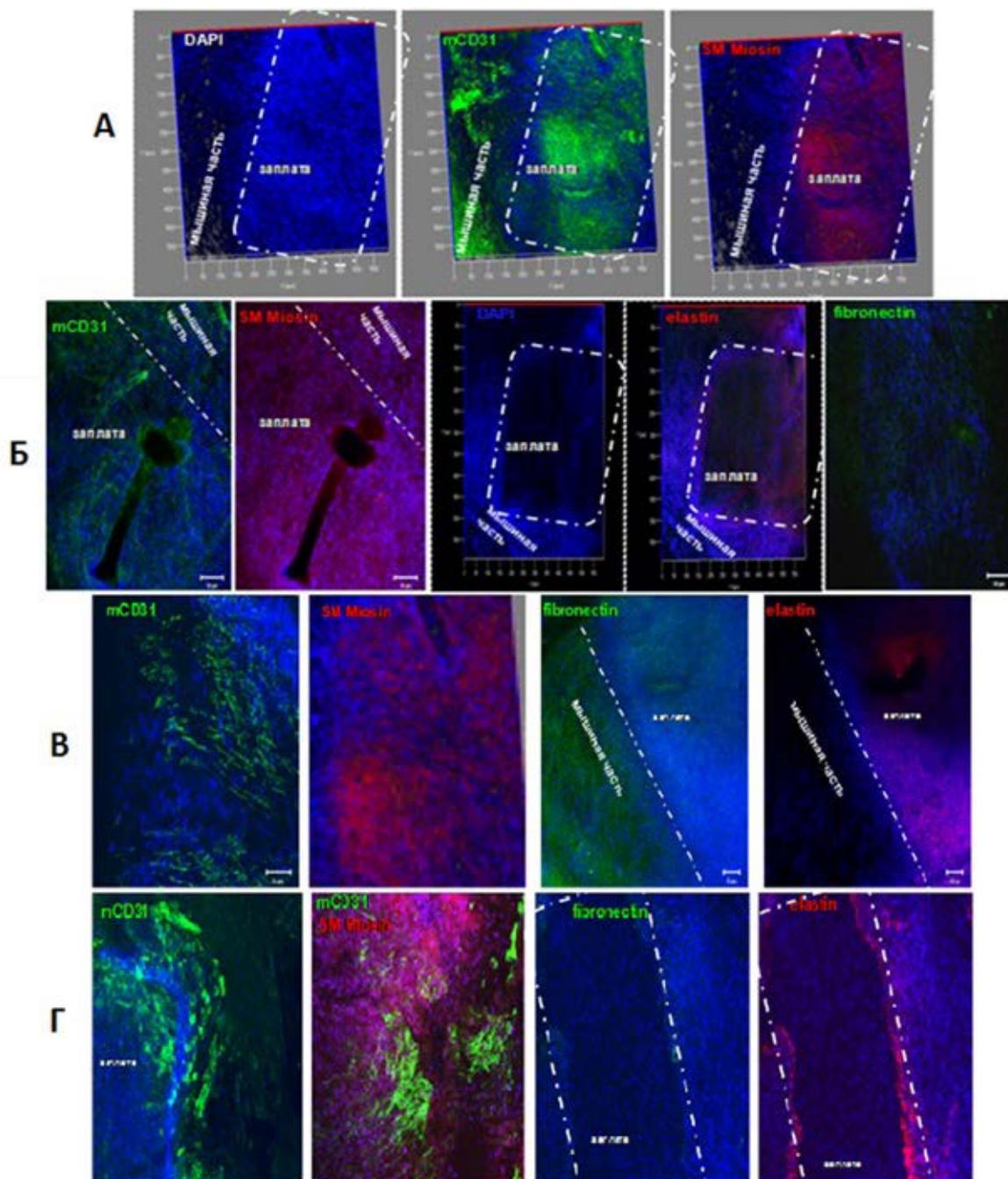
**Рисунок 8. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточно-заселенных заплат на контрольных точках исследования А – 2 недели, Б – 4 недели, В – 12 недель, Г – 24 недели (пунктирными линиями отмечены граница заплат)**

ваются в незначительном количестве. Нарботка фибронектина эндотелиальными клетками в динамике уменьшается, однако эластин, вырабатываемый гладкомышечными клетками, сохраняется, хотя и в незначительном количестве (рис.9).

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 мыши. Было обнаружено, что в предварительно клеточно-заселенных заплатках отмечаются ДНК мыши (mCot) и человека (hCot) (рис.10). Этот метод исследования также подтверждает, что заселенные человеческие клетки не теряются и поддерживают жизнеспособность в течение 4-5 недель в условиях непрерывного кровотока.

Гистологическое исследование в экспериментальной группе показало, что ядра клеточных

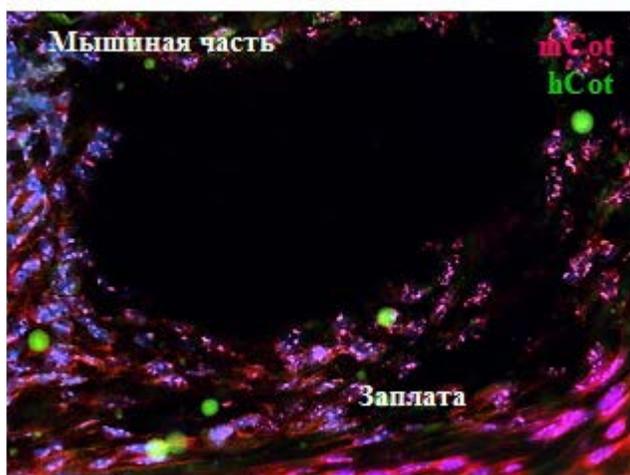


**Рисунок 9. Иммунофлуоресцентное окрашивание контрольных заплат на контрольных точках исследования А - 2 недели, Б - 4 недели, В - 12 недель, Г - 24 недель (пунктирными линиями отмечены граница заплат)**

элементов в толще заплат прослеживаются на протяжении всего периода наблюдения по всех контрольных точках (рис. 11, А-Г). На внутренней стороне заплат, контактировавших с кровотоком, в течение всего эксперимента визуализирован 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-й и 4-й неделях. Это указывает на то, что структура с 3D-матрикса не пре-



**Рисунок 10. Поперечный срез заплата с зондами ДНК мыши (mCot) и человека (hCot). FISH (Флуоресцентная *in situ* гибридизация) через 4 недели**

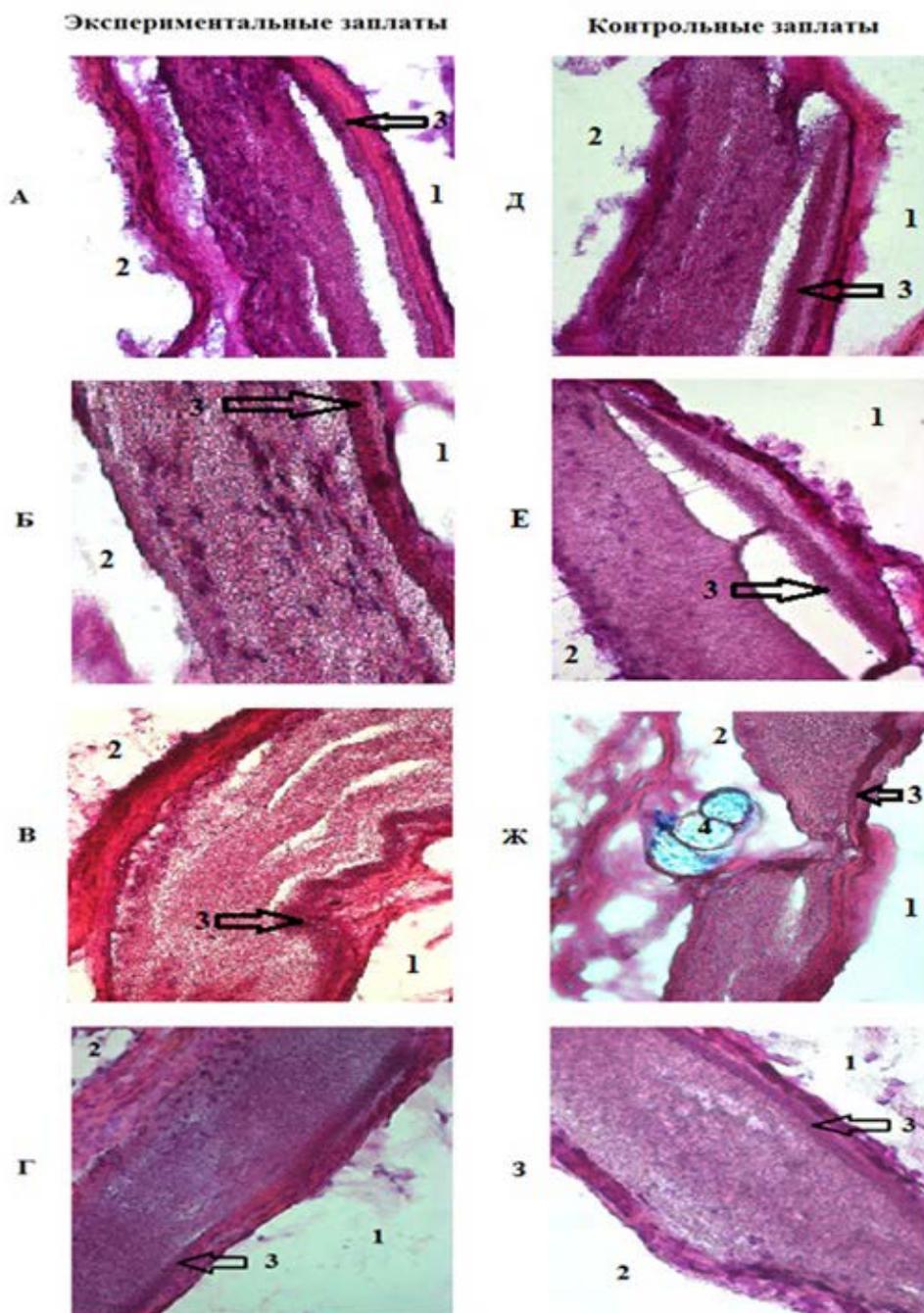
пятствуют миграции клеток внутрь (рис. 11 Д,Е). Несмотря на это, через 12 и 24 недели гистологические исследования показывают уменьшение количества клеточных ядер в составе заплата (рис. 11, Ж,З). Вероятно, заплата контрольной группы *in vivo* заселяется в первую очередь не пролиферирующими клетками крови (например, лимфоцитами), которые впоследствии погибают путем апоптоза [1]. Первичное заселение не пролиферирующими 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 детектировались 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 заплата. По внутренней поверхности заплата 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.

### Обсуждение

В доступной научной литературе описано множество попыток изготовления 3D-матрик-

сов для тканевой инженерии сосудов. Были отестированы как синтетические, так и природные полимеры, стабильные и биodeградирующие матриксы, и в том числе с различным клеточным наполнением [17,40]. Были предприняты попытки изготовления клеточно-наполненных матриксов. Тем не менее, до настоящего времени широкого применения в клинической практике такие протезы сосудов и материалы, из которых они изготовлены, не получили. Первые попытки их клинического применения имели место в педиатрии и в качестве гемодиализных шунтов [12,13]. Проблемы протезирования сосудов маленького диаметра упираются в необходимость формирования однослойного эндотелия, нормальное функционирование которого требуется для предотвращения гиперплазии интимы и стенозирования протеза или места восстановления дефекта в длительной перспективе. Несмотря на ряд неудачных попыток заселения протезов сосудов клетками перед их имплантацией, тем не менее, такой способ подготовки протеза к заселению, рассматривается как перспективный [24,25]. Действительно, не только клетки как таковые, но и «подготовленная» такими клетками среда (внеклеточный матрикс, а именно его состав, ориентация и т.д.) может обеспечить наиболее привлекательные условия для адгезии клеток – предшественников эндотелиоцитов и пролиферации эндотелиальных клеток в замещаемом участке [40].

В соответствии с имеющимися данными, после имплантации протезов сосудов с заранее сформированным эндотелиальным слоем большинство клеток открепляется от внутренней



**Рисунок 11.** Поперечные криосрезы заплат (окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 100$  и  $400$ ): 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)

стенки в процессе операции или под действием тока крови [43,44]. Оставшиеся клетки, тем не менее, своим паракринным эффектом могут предотвратить острый тромбоз трансплантатов в раннем послеоперационном периоде [45,46].

Как уже упоминалось во введении, прочность

связывания клеток с матриксом зависит как от прочности взаимодействия клеток с материалом, так и от структуры материала [47]. В нашем исследовании *in vitro* мы установили, что структура 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС способствует миграции клеток в толщу заплат с обеспечением

хороших условий для жизнедеятельности иммигрированных клеток. Narutoshi и др. предполагают, что заселенные клетки погибают путем апоптоза [1], хотя еще одним фактором, уменьшающим количество прикрепленных к поверхности полимерных матриц клеток, является также и их механическое смывание [7, 43, 44].

В качестве каркаса для ТИС используют различные материалы – как биологические [2,4], так и синтетические [3,5,6]. В нашей предыдущей статье [11] мы сравнили разные виды материалов и показали, что синтетические каркасы, полученные методом электроспиннинга, обеспечивают более удовлетворительное заселение клетками, их адгезию и пролиферацию в отличие от ксеноперикарда [18,19], децеллюляризированной гомоартерии [20,21,22], ПТФЭ и ПЭТ [23,24,25,7].

Для оценки биомеханических свойств тканеинженерных конструкций важным этапом является *in vivo* эксперимент с созданием условий непрерывного кровотока. По литературным данным, встречаются работы с применением биореакторов, которые имитируют пульсирующий кровоток [7,26]. Большинство ученых исследуют созданные ТИС после имплантации в сосудистое русло разным видам животным, например, свиньям, овцам, собакам и т.д. При имплантации ТИС в венозное русло, где давление ниже, чем в артериях, эти протезы могут ремоделироваться в неотканы, похожие на нативные вены. Такие результаты получены после имплантации в нижнюю полую вену собаке и мышши [27,28]. Также возможно использование ТИС для каво-пульмонального шунтирования [12]. В артериальной позиции клеточно-заселенные конструкции имели достаточную механическую прочность и проходимость до 26 недель [29,30]. Причем эти материалы не уступают по срокам проходимости ПТФЭ [31,32].

В литературе встречаются работы, в которых для подавления иммунитета у животных при ксенотрансплантации используются фармакологические препараты [33-35]. Однако существуют специальные линии иммунодефицитных мышей и крыс, у которых имеются генетические мутации, приводящие к неспособности вырабатывать функциональные Т- и В-лимфоциты, что приводит к стойкому ослаблению иммунитета. В связи с этим таких животных стали применять и для изучения тканеинженерных сосудов [36].

В 2009 году Tamar и др. для исследования использовали иммунодефицитных мышей. Они сконструировали сосудистый каркас из биодеградируемых полимеров с внутренним диаметром 700 мкм. Получили ЭК и ГМК из аорты человека, которые культивировали в специальных коммерческих средах EGM и SmGM фирмы LONZA. Затем после заселения синтетической матрицы сосудистыми клетками выполнили имплантацию созданной тканеинженерной конструкции в брюшную аорту 30 мышам. За период наблюдения от 4 дней до 1 года случаев разрыва, тромбоза и стеноза трансплантатов по УЗИ и микро-КТ ангиограмм не наблюдалось. По гистологическому анализу все трансплантаты показали хорошее ремоделирование с формированием монослоя эндотелия, а гладкомышечный слой содержал ГМК и межклеточный матрикс (коллаген, эластин) [36].

В 2014 г. S.Tara и др. предположили, что бесклеточные трансплантаты могут не уступать в биосовместимости и тромборезистентности. Они провели эксперимент, в котором прооперировали 28 мышей. Они разработали тканеинженерный сосуд из биоразлагаемых полимеров с внутренним диаметром 500-600 мкм, толщиной стенки 250 мкм. В послеоперационном периоде проводили неинвазивную диагностику УЗИ и КТ ангиографию. Период наблюдения составляли от 4 до 12 месяцев. По результатам КТ ангиографии исследователи установили аневризматические изменения почти половины имплантированных трансплантатов. По гистологическим срезам было выявлено образование монослоя интимы и гладкомышечного слоя с высоким содержанием эластина и коллагена. Через 12 месяцев на некоторых трансплантатах наблюдались кальцифицированные отложения, активность макрофагов в области остаточного синтетического материала была выше, чем в нормальной аорте. Это указывает на длительную воспалительную реакцию на синтетический полимерный сосудистый каркас [37].

В нашем исследовании источником ЭК и ГМК является миокард человека, из которого, по литературным данным, сосудистые клетки ранее не выделяли. Метод их выделения, разработанный нашей группой, описан в статье [10]. Стоит отметить, что доля ГМК среди клеток, выделенных из миокарда, изначально составляла 88%. При культивировании этих клеток в среде SmGM доля ГМК клеток увеличилась до 94%. ЭК клет-

ки после магнитного сортирования культивировали в среде EGM [10]. Важно отметить, что при хирургическом лечении сосудов используют не только трубчатые протезы, но и часто выполняют пластические операции при помощи синтетических или биологических заплат. Именно такой подход был использован в представленном исследовании: для имплантации в брюшную аорту мышам в качестве заплат мы использовали 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС с толщиной 50-70 мкм, размером 500x500 мкм.

Имплантация заплат осуществлялась 4 узловыми швами нитью Premilene 10/0. Важно отметить, что механические свойства заплат при наложении швов были сопоставимы с механическими свойствами стенки аорты. Время достижения гемостаза после запуска кровотока составляло до 1 минуты, что предотвращало значимую кровопотерю. Стоит отметить особенности структуры 3D-матриц, а именно наличие в них МПВС, который предотвращал пропитывание протеза кровью и попадание клеток крови во всю толщину стенки. Чрезмерное пропитывание стенки заплат тромбоцитами могло привести к развитию тромбоза. Отсутствие разрывов и аневризм заплат указывает на достаточную их прочность и применимость в клинической практике. Учитывая то, что ЭК и ГМК выделяют БАВ, вызывающие ангиогенез, можно предположить их паракринный эффект, который наблюдается в нашей экспериментальной группе, где неоваскуляризация была более выражена, чем в контрольной группе без клеточного заселения.

По нашим данным, контрольные бесклеточные 3D-матрицы через 24 недели после имплантации содержали минимальное количество коллагена и эластана в отличие от экспериментальной клеточно-заселенной группы, где наработка межклеточного матрикса оставалась удовлетворительной в течение этого периода.

Одним из важных требований для тканеинженерных 3D-матриц является инфильтрация клеток стенки трансплантата для обеспечения поддержания жизнеспособности и способности наработки межклеточного вещества. T. Siguira и др. показали, что тканеинженерные сосудистые матрицы в *in vivo* после имплантации в брюшную аорту мышам могут заселяться клетками хозяина, что также обеспечивает наработку межклеточного матрикса заселенными клетками. При этом они выявили,

что размеры пор не играют ключевую роль для миграции клеток [41]. Мы показали, что 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС обеспечивают миграцию клеток в свою стенку *in vitro* и *in vivo*. Мы отметили, что часть ЭК в экспериментальных заплатах в начальном периоде покидают заплату, а оставшиеся клетки прочно связываются волокнами заплат и остаются в течение 24 недель.

Возможность миграции клеток с наружной во внутреннюю поверхность стенки протеза показали V. Catto и др., имплантировав трубчатые протезы в подкожную клетчатку экспериментальному животному на 15 дней. С наружной стороны этих протезов сформировалась тонкая фиброзная капсула, состоящая, в основном, из фибробластов [42]. Фиброзная капсула по наружной поверхности исследованных нами заплат отличалась в обеих группах. В контрольной группе она была представлена более тонким слоем плотной фиброзной ткани с незначительным содержанием фибробластов. А в экспериментальной группе толщина фиброзной капсулы была большей, содержала микрососуды и клетки гладкомышечного и фибробластического типа. Это свидетельствует о том, что посредством паракринного эффекта предварительно заселенных клеток происходит хорошая интеграция трансплантатов с окружающими тканями. Это позволяет поддерживать взаимосвязь между ними, в том числе обмен и транспорт питательных веществ, клеточный и гуморальный иммунитет и др.

## Выводы

1. Синтетическая 3D-матрица из ПКЛ с МПВС, заселенная с внутренней стороны ЭК и наружной стороны ГМК, обеспечивает образование функционального эндотелиального монослоя на внутренней поверхности и наружной фиброзной капсулы, содержащей участки микрососудов и клетки гладкомышечного и фибробластического типа *in vivo*, в отличие от аналогичных 3D-матриц без клеточного заселения.

2. Синтетические 3D-матрицы из ПКЛ с МПВС, апплицированные ЭК и ГМК, за счет новообразованного эндотелиального монослоя обеспечивают хорошую проходимость после имплантации в аорту мышей в течение 24 недель, с наружной стороны характеризуются более активной интеграцией с окружающими тканями, в отличие от матриц без клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hibino N., Duncan D.R., Nalbandian A., Yi T., Qyang Y., Shinoka T., Breuer C.K. Evaluation of the Use of an iPS Cell Sheet for the Construction of Tissue Engineered Vascular Grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 March; 143(3): 696–703. doi:10.1016/j.jtcvs.2011.06.046.
2. Vivek A. Kumar, Jeffrey M. Caves, Carolyn A. Haller, Erbin Dai, Liying Li, Stephanie Grainger, Elliot L. Chaikof. Acellular vascular grafts generated from collagen and elastin analogs. *Acta Biomater.* 2013 Sep; 9(9): 8067–8074. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.024>
3. Isayama N., Matsumura G., Sato H., Matsuda S., Yamazaki K. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.006>
4. Sion G. Jones, MD, MRCS, Yanhua Hu, MD, Qingbo Xu, MD, PhD, and Marjan Jahangiri, MD, FRCS (CTh). Stem Cells Accumulate on a Decellularized Arterial Xenograft In Vivo. <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2014.02.023>
5. Mirensky T.L., Nelson G.N., Brennan M.P., Roh J.D., Hibino N., Yi T., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1127-32. doi:10.1016/j.jpedsurg.2009.02.035
6. Tara S., Kurobe H., Maxfield M.W., Rocco K.A., Yi T., Naito Y. et al. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J Vasc Surg.* 2015 Sep; 62(3):734-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2014.03.011>
7. Miyata T., Conte M.S., Trudell L.A., Mason D., Whittemore A.D., Birinyi L.K. Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts. *J Surg Res* 1991;50(5):485–93.
8. Wu H., Fan J., Chu C.C., Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 3207 – 3215.
9. Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С., Акулов А.Е., Захарова И.С., Покушалов А.А. и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электро-спиннинга в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. Патология кровообращения и кардиохирургия/ 2015; 19 (4): 63–71.
10. Захарова И.С., Живень М.К., Саая Ш.Б., Карпенко А.А., Шевченко А.И., Струнов А.А. и др. Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015; 19(4–2): 43–54.
11. Саая Ш.Б., Захарова И.С., Живень М.К., Шевченко А.И., Карпенко А.А., Покушалов Е.А. и др. Оценка функциональных свойств человеческих эндотелиальных и гладкомышечных клеток после заселения на поверхности из естественных и синтетических материалов. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 3: 94-101. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101.
12. Sh.B. Saaya, I.S. Zakharova, M.K. Zhiven, A.I. Shevchenko, A.A. Karpenko Ye.A. Pokushalov ,et al. Evaluation of the functional properties of human endothelial and smooth muscle cells after seeding on the surface of natural and synthetic materials. *Vestnik transplaantologii I isskustvennyh organov.* 2016; 3: 94-101. DOI: 10.15825/1995-1191-2016-3-94-101.
13. Wystrychowski W., McAllister T.N., Zagalski K., Dusserre N., Cierpka L., L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *J Vasc Surg.* 2014 Nov; 60(5):1353-7. doi: 10.1016/j.jvs.2013.08.018. Epub 2013 Oct 5.
14. Latimer C.A., Nelson M., Moore C.M., Martin K.E. Effect of collagen and elastin content on the burst pressure of human blood vessel seals formed with a bipolar tissue sealing system. *Journal of Surgical Research.* 2014; 186 (1): 73–80.
15. Samouillan V., Dandurand J., Lacabanne

- C., Stella A., Gargiulo M., Degani A. et al. Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas. *Pathologie Biologie*. 2012; 60 (1): 58–65.
16. Pate M., Damarla V., Chi D.S., Negi S., Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv. Clin. Chem*. 2010; 52: 109–30.
17. S. Tara, K. A. Rocco, N. Hibino, T. Sugiura, H. Kurobe, C. K. Breuer, and T. Shinoka Vessel bioengineering. *Circ. J* 2014; 78 (1): 12–9.
18. Wong C.S., Sgarioto M., Owida A.A., Yang E., Rosenfeldt, C.S., Morsi Y.S. Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium. *Heart, Lung and Circulation*. 2006;15:371–377
19. Eybl E., Grimm M., Grabenwoger M., Bock P., Muller M.M., Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992; 104(3): 763–9.
20. Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W. et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001; 7: 1035 – 1040.
21. Simon P., Kasimir M.T., Seebacher G., Weigel G., Ullrich R., Salzer-Muhar U. et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003; 23: 1002 – 1006.
22. Quint C., Kondo Y., Manson R.J., Lawson J.H., Dardik A., Niklason L.E. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 9214 – 9219.
23. Kannan R.Y., Salacinski H.J., Sales K., Butler P., Seifalian A.M. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: A review. *Biomaterials*. 2005; 26(14): 1857–75.
24. Rotmans J.I., Heyligers J.M., Verhagen H.J., Velema E., Nagtegaal M.M., de Kleijn D.P. et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*. 2005; 112(1): 12–8.
25. Mirengi L., Ramires P.A., Pentassuglia R.E., Rotolo P., Romito A. Growth of human endothelial cells on plasma-treated polyethyleneterephthalate surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2000; 11(5): 327–31.
26. Niklason L.E., Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R. et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489 – 493.
27. Isayama N., Matsumura G., Sato H., Matsuda S., Yamazaki K. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature. *Biomaterials*. 2014; 35 (11): 3589-3595 doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.006>
28. Roh J.D., Sawh-Martinez R., Brennan M.P., Jay S.M., Devine L., Rao D.A. et al. Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 9;107(10):4669-74. doi: 10.1073/pnas.0911465107.
29. Pektok E., Nottelet B., Tille J.C., Gurny R., Kalangos A., Moeller M. et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly (epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation*. 2008; 118: 2563 – 2570.
30. Wang S., Mo XM, Jiang B.J., Gao C.J., Wang H.S., Zhuang Y.G. et al. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency. *Int J Nanomed*. 2013; 8: 2131 – 2139.
31. Cikirikcioglu M., Sedelnikov N., Osorio-Da Cruz S., Khabiri E., Donmez Antal A., Tatar T. et al. Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating. *Int J Artif Organs*. 2006; 29: 990-9.
32. Heise M., Schmidmaier G., Husmann I., Heidenhain C., Schmidt J., Neuhaus P. et al. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006; 32: 418-24.
33. McDaid J., Scott C.J., Kissenpfennig A., Chen H., Martins P.N. The utility of animal models in developing immunosuppressive agents. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 759: 295–302. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.025
34. Lasso J.M., Pe´rez Cano R., Castro Y., Arenas L., Garcı´a J., Fern´andez-Santos M.E. Xenotransplantation of human adiposederived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015 Dec;68(12):e189-97. doi: 10.1016/j.bjps.2015.07.005.

35. Sousa W.B., Garcia J.B., Nogueira Neto J., Furtado P.G., Anjos J.A. Xenotransplantation of uterine leiomyoma in Wistar rats: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2015 Jul;190:71-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.04.012.
36. Mirensky T.L., Nelson G.N., Brennan M.P., Roh J.D., Hibino N., Yi T., Shinoka T., Breuer C.K. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1127-32; discussion 1132-3. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.02.035.
37. Tara S., Kurobe H., Maxfield M.W., Rocco K.A., Yi T., Naito Y., Breuer C.K., Shinoka T. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J Vasc Surg.* 2015 Sep; 62(3):734-43. doi: 10.1016/j.jvs.2014.03.011.
38. Jones S.G., Hu Y., Xu Q., Jahangiri M. Stem Cells Accumulate on a Decellularized Arterial Xenograft In Vivo. *Ann Thorac Surg.* 2014 Jun; 97(6): 2104-10. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.02.023.
39. 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; 27 (4): 357–62.
40. Nemen-Guanzon J.G., Lee S., Berg J.R., Jo Y.H., Yeo J.E., Nam B.M. et al. Trends in tissue engineering for blood vessels. *J J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:956345. doi: 10.1155/2012/956345.
41. Sugiura T., Tara S., Nakayama H., Kurobe H., Yi T., Lee Y.U. et al. Novel Bioresorbable Vascular Graft With Sponge-Type Scaffold as a Small-Diameter Arterial Graft. *Ann Thorac Surg.* 2016 Sep;102(3):720-7. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.01.110.
42. Catto V., Farè S., Cattaneo I., Figliuzzi M., Alessandrino A., Freddi G. et al. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Sep;54:101-11. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.003.
43. Pawlowski K.J., Rittgers S.E., Schmidt S.P., Bowlin G.L. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci.* 2004; 9: 1412–21.
44. Roh J.D., Nelson G.N., Udelsman B.V., Brennan M.P., Lockhart B., Fong P.M. et al. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds. *Tissue Eng.* 2007; 13(11): 2743–9.
45. Gong Z., Niklason L.E. Blood vessels engineered from human cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16: 153 – 6.
46. Edelman E.R. Vascular tissue engineering : designer arteries . *Circ Res.* 1999; 85: 1115 – 17 .
47. Lee S. J., Atala A., Wake Forest University School of Medicine, USA. Engineering of tissues and organs. In Boccaccini A.R, Ma P.X., editors. *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers.* Cambridge: Elsevier; 2014. p. 347-353. DOI:10.1533/9780857097163.3.347

*Статья поступила 02.03.2017*

*Для корреспонденции:*

**Саая Шораан Биче-оолович**  
 Адрес: 630055, г. Новосибирск,  
 ул. Речкуновская, 15  
 Тел. +7 (913)905-40-20,  
 E-mail: shoraans@gmail.com

*For correspondence:*

**Saaya Shoraan Biche-oolovich**  
 Address: 15, Rechkunovskaya st., Novosibirsk,  
 630055, Russian Federation  
 Tel. +7 (913)905-40-20,  
 E-mail: shoraans@gmail.com