

Выращивание и характеристика тканеинженерной конструкции из гладкомышечных клеток коронарной артерии сердца человека

Сульгин А.А.¹, Сидорова Т.Н.², Сидоров В.Ю.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Vanderbilt University Medical Center
1211, Medical Center Dr., Nashville, 37232, USA

³ Vanderbilt University
1221, Stevenson Center Ln., Nashville, 37240, USA

РЕЗЮМЕ

Цель. Оптимизировать биоинженерную платформу I-Wire для выращивания тканеинженерных конструкций (ТК) из гладкомышечных клеток (ГМК) артериальных сосудов и охарактеризовать механоэластические свойства полученных ТК.

Материалы и методы. Клеточную смесь на основе фибрина засеивали в канал матрицы из полидиметил-оксана с вставками из титановой проволоки на противоположных концах канала для горизонтальной поддержки конструкции. Размеры канала: глубина 3 мм, ширина 2 мм и длина 12 мм. Для измерения деформации ТК использовали гибкий зонд диаметром 365 мкм и длиной 42 мм. Отклонение кончика зонда при различной силе растяжения, приложенной к ТК, регистрировали с помощью системы оптической регистрации на основе инвертированного микроскопа. Модуль упругости вычисляли на основе диаграмм растяжения ТК. Были оценены механоэластические свойства конструкций в контроле и под действием изопроterenолола (Изо), ацетилхолина (Ацх), блебистатина (Бб) и цитохалазина Д (Цито-Д). Для структурной характеристики конструкций использовали метод иммуногистохимического окрашивания конструкций на α -актин гладких мышц, десмин и ядра клеток.

Результаты. Формирование конструкций происходило на 5–6-й день инкубации. Последующие измерения в течение 7 дней не выявили значительных изменений эластичности. Значения величины модуля упругости конструкций составили $7,4 \pm 1,5$ кПа в первый день после их формирования, $7,9 \pm 1,4$ кПа – на 3-й и $7,8 \pm 1,9$ кПа – на 7-й день культивирования. Изменения механоэластических свойств ТК в ответ на последовательное применение Бб и Цито-Д имели двухфазный характер, что демонстрирует возможность выделения активного и пассивного элементов эластичности гладкомышечных конструкций. Добавление 1 мкМ Изо приводило к увеличению значения величины модуля упругости с $7,9 \pm 1,5$ кПа до $10,2 \pm 2,1$ кПа ($p < 0,05$, $n = 6$). Добавление Ацх не вызывало значимого изменения эластичности.

Заключение. Представленная система позволяет количественно оценивать механоэластические свойства ТК в ответ на фармакологическое воздействие и может быть полезна в моделировании патологических изменений в ГМК сосудов.

Ключевые слова: тканевая инженерия, васкулярные гладкомышечные клетки, гладкомышечная тканеинженерная конструкция.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Национального института здравоохранения (NIH, USA), Национального центра содействия трансляционным наукам (NCATS, USA), Национального института неврологических расстройств и инсульта (NINDS, USA) и Национального института здоровья детей и развития человека им. Юнис Кеннеди Шрайвер (NICHD), грант № 1UG3TR002097-01,

✉ Сидоров Вениамин Юрьевич, e-mail: v.sidorov@vanderbilt.edu.

а также Фонда Зимина (Zimin Foundation). Содержание работы является исключительной ответственностью авторов и не обязательно отражает официальные взгляды национальных институтов здравоохранения.

Для цитирования: Сулгин А.А., Сидорова Т.Н., Сидоров В.Ю. Выращивание и характеристика тканеинженерной конструкции из гладкомышечных клеток коронарной артерии сердца человека. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (2): 85–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-85-95>.

Growth and characterization of a tissue-engineered construct from human coronary artery smooth muscle cells

Sulgin A.A.¹, Sidorova T.N.², Sidorov V.Y.³

¹ Siberian State Medical University
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Vanderbilt University Medical Center
1211, Medical Center Dr., Nashville, 37232, USA

³ Vanderbilt University
1221, Stevenson Center Ln., Nashville, 37240, USA

ABSTRACT

Aim. To optimize a bioengineered I-Wire platform to grow tissue-engineered constructs (TCs) derived from coronary artery smooth muscle cells and characterize the mechano-elastic properties of the grown TCs.

Materials and methods. A fibrinogen-based cell mixture was pipetted in a casting mold having two parallel titanium anchoring wires inserted in the grooves on opposite ends of the mold to support the TC. The casting mold was 3 mm in depth, 2 mm in width and 12 mm in length. To measure TC deformation, a flexible probe with a diameter of 365 μm and a length of 42 mm was utilized. The deflection of the probe tip at various tensile forces applied to the TC was recorded using an inverted microscope optical recording system. The elasticity modulus was calculated based on a stretch-stress diagram reconstructed for each TC. The mechano-elastic properties of control TCs and TCs under the influence of isoproterenol (Iso), acetylcholine (ACh), blebbistatin (Bb), and cytochalasin D (Cyto-D) were evaluated. Immunohistochemical staining of smooth muscle α -actin, desmin and the cell nucleus was implemented for the structural characterization of the TCs.

Results. The TCs formed on day 5–6 of incubation. Subsequent measurements during the following 7 days did not reveal significant changes in elasticity. Values of the elastic modulus were 7.4 ± 1.5 kPa on the first day, 7.9 ± 1.4 kPa on the third day, and 7.8 ± 1.9 kPa on the seventh day of culturing after TC formation. Changes in the mechano-elastic properties of the TCs in response to the subsequent application of Bb and Cyto-D had a two-phase pattern, indicating a possibility of determining active and passive elements of the TC elasticity. The application of 1 μM of Iso led to an increase in the value of the elastic modulus from 7.9 ± 1.5 kPa to 10.2 ± 2.1 kPa ($p < 0.05$, $n = 6$). ACh did not cause a significant change in elasticity.

Conclusion. The system allows quantification of the mechano-elastic properties of TCs in response to pharmacological stimuli and can be useful to model pathological changes in vascular smooth muscle cells.

Key words: tissue engineering, vascular smooth muscle cells, smooth muscle tissue construct.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. This study was supported by the National Institutes of Health (NIH), National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS), National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) under Award Number 1UG3TR002097-01, and the Zimin Foundation. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

For citation: Sulgin A.A., Sidorova T.N., Sidorov V.Y. Growth and characterization of a tissue-engineered construct from human coronary artery smooth muscle cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 2020; 19 (2): 85–95. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-85-95>.

ВВЕДЕНИЕ

Васкулярные гладкомышечные клетки (ГМК) являются основным типом клеток сосудистой системы, которые определяют тонус сосудов, а также периферическое и артериальное давление. Особенность ГМК – их неполная дифференциация и, как следствие, высокая пластичность, связанная с изменениями между сократительным и секреторным фенотипами в ответ на биохимическую либо механическую стимуляцию [1]. Показано, что изменение фенотипа ГМК задействовано в таких патологиях, как атеросклероз, аневризм аорты и артериальная гипертензия [2–4].

В настоящее время в большинстве экспериментальных работ по изучению механизмов сосудистых заболеваний *in vitro* традиционно используют двухмерные культуры ГМК. Подобные экспериментальные модели представляют не физиологичное окружение, что делает невозможным поддержание исходного фенотипа клеток и усложняет интерпретацию данных. Современное развитие методов тканевой инженерии позволяет достаточно хорошо воспроизводить основные физиологические свойства различных типов тканей [5–7]. Преимуществами трехмерных тканеинженерных конструкций (ТК) являются: соответствующее механическое окружение, обеспечение стабильности ответа на внешнюю стимуляцию в течение длительного временного промежутка, относительная легкость проведения генетических манипуляций и уникальный потенциал для изучения биофизических характеристик ткани *in vitro* [8].

Таким образом, создание адекватной модели *in vitro*, как для изучения механизмов сосудистых заболеваний, так и для тестирования лекарственных препаратов, является актуальной задачей. Целью данной работы было оптимизировать недавно разработанную на базе Университета Вандербильта биоинженерную платформу I-Wire [9, 10] для выращивания ТК с использованием артериальных ГМК и охарактеризовать механоэластические свойства полученных конструкций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление матрицы из полидиметилсилоксана и клеточной смеси. В работе была использована ПДМС-матрица с горизонтальной поддержкой ТК (титановая проволока диаметром 0,25 мм и длиной 12 мм, Sigma-Aldrich, США). В процессе приготовления матрицы сначала был сделан шаблон с шестью полостями из монолитного акрилового пластика при помощи сверла диаметром 0,79 мм и фрезерного станка с числовым программным управлением

(MicroProtoSystems, США). В каждую полость были вставлены две тонкие кромки из того же материала для формирования каналов для поддерживающей титановой проволоки.

Полости заливали жидким ПДМС (SYLGARD 184 kit, DowCorning, США), смешанным с отвердителем в пропорции 10:1, и дегазировали. Затем собранную конструкцию помещали в печь на 6 ч для полимеризации при 65 °С. Конечная ПДМС-матрица имела канал глубиной 3 мм, шириной 2 мм и длиной 12 мм, а также две борозды для размещения анкерной проволоки. Далее каждую ПДМС-матрицу переносили в лунку 6-луночного планшета, где приклеивали ко дну при помощи жидкого ПДМС. Каналы ПДМС-устройств были обработаны 0,2%-м раствором Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, США) для увеличения гидрофобности стенок и промыты деионизированной водой. Затем планшеты были стерилизованы ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин.

Для выращивания ТК из коммерческих ГМК (HCASMC, ThermoFisher, США) была приготовлена клеточная смесь на основе фибрина. Показано, что продукты деградации фибрина в процессе созревания конструкции способствуют пролиферации ГМК и стимулируют формирование внеклеточного матрикса [11]. В предварительных экспериментах по оптимизации условий формирования конструкции использовали клеточную смесь фибробластов и ГМК в пропорции 1:10. В случае использования только ГМК конечная концентрация клеток и остальных компонентов среды была той же самой.

Сердечные фибробласты (NHCF-V, Lonza, США) и ГМК были собраны с культуральных флаконов T-175 (Thermo Fisher Scientific, США) при помощи TrypLE Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific, США). Общая концентрация клеток была доведена до 10^6 , 2×10^6 либо 4×10^6 клеток/мл, после чего клетки смешали с фибриногеном (100 мкл, 20 мг/мл, Sigma-Aldrich, США), апротинином (33 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), тромбином (10 мкл, 100 ЕД/мл, Sigma-Aldrich, США), а также добавили антибиотики пенициллин и стрептомицин (1%-й, Gibco, США). Помимо этого, в зависимости от условий добавляли Matrigel (100 мкл, BD Biosciences, США). После разведения конечная концентрация клеток была $0,5 \times 10^6$, 10^6 или 2×10^6 клеток/мл. Затем смесь была пипетирована в канал каждого ПДМС-устройства. Планшеты инкубировали при 37 °С и 5%-м CO_2 в течение 1 ч для полимеризации фибрина, после чего в каждую лунку добавили по 3 мл среды Gibco Medium 231 (Thermo Fisher Scientific, США) с апротинином (33 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), транексамовой

кислотой (400 мкМ, Sigma-Aldrich, США), антибиотиками (1%-й, Gibco, США) и ростовой добавкой для пролиферации (Gibco Smooth Muscle Growth Supplement, SMGS; Thermo Fisher Scientific, США) либо для дифференциации клеток (Gibco Smooth Muscle Differentiation Supplement, SMDS; Thermo Fisher Scientific, США).

Среду заменяли каждый 2-й день. После формирования ТК, их механоэластические свойства были измерены с помощью системы оптической регистрации на основе инвертированного микроскопа (рис. 1). Созревшие гладкомышечные волокна имели 350–450 мкм в диаметре и 7 мм в длину (рис. 2, а).

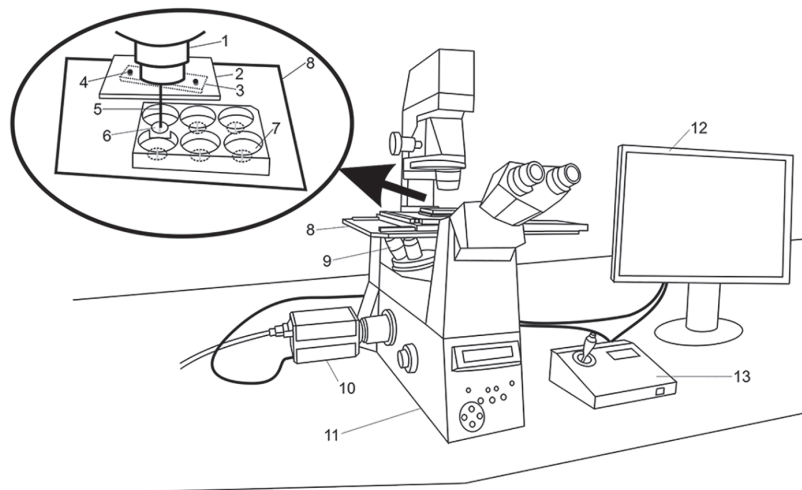


Рис. 1. Схема установки для измерения механоэластических свойств тканеинженерных конструкций: 1 – конденсор, 2 – пластина-держатель, 3 – консоль, 4 – магнит, 5 – гибкий сенсор, 6 – ПДМС-матрица с конструкцией, 7 – лунка планшета, 8 – моторизованная платформа, 9 – объектив, 10 – камера, 11 – инвертированный микроскоп, 12 – компьютер, 13 – микроконтроллер

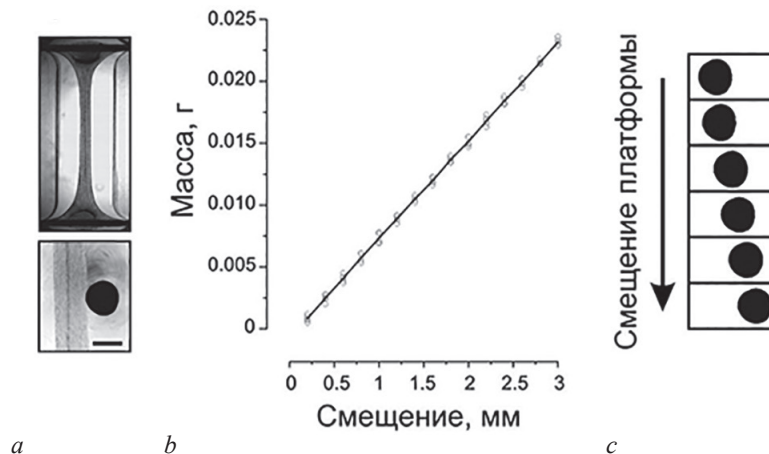


Рис. 2. Калибровочный график упругости и кадры смещения кончика гибкого сенсора: а – общий вид тканевой конструкции и центральная часть с концом гибкого сенсора, размер масштабной шкалы 300 мкм; б – график, показывающий линейную зависимость изменения массы от смещения положения консоли с гибким сенсором ($n = 5$, $r = 0,99997$); в – обработанные бинарные изображения положения сенсора при поэтапном смещении моторизованной платформы с планшетом

Устройство для измерения механоэластических свойств тканеинженерных конструкций. Для измерения модуля продольной упругости был использован гибкий зонд из полиэфирэфиркетона (Putnam Plastics, США) с наружным диаметром 365 мкм, диаметром отверстия 120 мкм и длиной 42 мм. Зонд был приклеен к консоли из органического стекла, которая в свою очередь прикрепленна к пластине-держателю с двумя

магнитами для контроля положения зонда. Консоль, пластина-держатель и гибкий зонд были смонтированы при помощи фрикционного крепления к конденсору инвертированного флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ti, Nikon, США), оснащенного микроконтроллером (MS-2000 Flat-Top XYZ Automated Stage, ASI, США), который позволяет точно перемещать платформу по двум измерениям (см. рис. 1).

Упругость гибкого сенсора была откалибрована и имела линейную зависимость деформации от приложенной силы (рис. 2, *b*). Оптическая регистрация смещения кончика гибкого зонда осуществлялась при помощи цифровой камеры (Zyla sCMOS Camera, Andor Technology, Северная Ирландия) через равные интервалы смещения платформы с планшетом так, что каждое смещение соответствовало определенной приложенной силе, величину которой вычисляли, используя калибровочный график.

Протоколы измерений и иммуногистохимическое окрашивание. В эксперименте применяли два протокола. Первый протокол заключался в серии последовательных измерений положения конца гибкого зонда при смещении платформы на каждые 200 мкм перед внесением веществ и после инкубации с веществами в течение двух часов. Согласно второму протоколу, регистрации были проведены при постоянной приложенной силе = 0,062 мН в течение 95 мин. В течение первых 15 мин были выполнены контрольные регистрации, после чего были последовательно внесены блеббистатин (Бб) в концентрации 30 мкМ через 20 мин и цитохалазин Д (Цито-Д) в концентрации 50 мкМ через 55 мин от начала протокола. Для оценки способности клеток отвечать на β -адренергическую и холинэргическую стимуляцию ТК был инкубирован в стандартных средах, содержащих 1 мкМоль изопротеренола (Изо) (Sigma-Aldrich, США) и 5 мкМ ацетилхолина (Ацх) (Sigma-Aldrich, США) в течение 60 мин. В данных экспериментах применяли первый протокол.

Блеббистатин и Цито-Д применяли для оценки влияния фармакологических стимулов на сократительную функцию и эластичность внеклеточного матрикса ТК. Блеббистатин является обратимым ингибитором АТФ-азной активности миозина II [12], в то время как цитохалазин Д блокирует полимеризацию актина, тем самым нарушает организацию сети филаментов цитоскелета и при этом не влияет на внеклеточный матрикс [13].

Для иммуногистохимического окрашивания тканевые конструкции сначала фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида в течение 15 мин, отмывали трехкратно с помощью натрий-фосфатного буфера, затем помещали в парафиновые блоки и делали срезы толщиной 5 мкм. Доступность антигенов обеспечивали инкубацией срезов при 94 °С в 10 мМ растворе цитрата натрия (рН 6,0) в течение 10 мин. Были использованы первичные мышинные моноклональные антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -SMA) (Sigma-Aldrich, США), моноклональные антитела кролика к десмину (Abcam, США) и вторичные антитела против мыши (Thermo Fisher,

США) и кролика (Thermo Fisher, США), конъюгированные с Alexa (568 и 488 нм), а также краситель для окрашивания ядер DAPI (Fluoromount-G 368/451, Southern Biotech, США). Регистрацию цветных изображений делали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ и статистическая обработка данных. Анализ изображений проводили в программной среде MATLAB (MathWorks, США). Контрастность кадра была подобрана таким образом, чтобы оставался виден только конец гибкого зонда, после чего создавалось бинарное изображение и вычислялись координаты центра окружности в каждом кадре (рис. 2, *c*). На основе полученных данных вычислялись изменение длины ТК, значение силы, действующей вдоль конструкции (F_c), и значение модуля упругости. Детальное описание вычисления модуля упругости и диаграмма геометрии конструкции содержатся в дополнительном материале ранее опубликованной работы [9]. Поэтому здесь приведем только краткое описание процедуры вычисления.

Модуль упругости рассчитывали как отношение зависимости деформации от напряжения по формуле [14]:

$$E = \frac{L_0 F_c}{A_0 \Delta L},$$

где F_c – сила, действующая вдоль ТК, L_0 – исходная длина ТК, A_0 – площадь поперечного сечения, ΔL – изменение длины ТК.

Учитывая положение ТК в пространстве, формула для вычисления модуля упругости была модифицирована следующим образом [9]:

$$E = \frac{2L_0 F_t \sqrt{(d_s - d_t)^2 + a^2}}{\pi D^2 \Delta L (d_s - d_t)},$$

где F_t – сила, прикладываемая гибким зондом, d_s – расстояние между начальным и текущим положением платформы, d_t – расстояние между начальным и текущим положением конца гибкого зонда, a – половина длины конструкции в расслабленном состоянии, D – диаметр тканеинженерной конструкции. Диаметр ТК вычислялся на основе среднего значения трех измерений – в срединной точке и двух точках на расстоянии 1 мм справа и слева от срединной точки.

Статистический анализ проводился с помощью коммерческих программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и OriginLab R2018 (OriginLab Corporation, США). Статистические сравнения между контрольной и опытной группой были сделаны

при помощи *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок, одномерного дисперсионного анализа для повторных измерений (ANOVA) в случае трех и более групп, а также с использованием непараметрического парного критерия Вилкоксона. Изменение длины в ответ на приложенную силу, измеренное в процентах от изначальной длины препарата, представлено в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Различия в полученных результатах считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. В процессе калибровки гибкого сенсора для оценки линейности его упругих свойств в зависимости от нагрузки применяли корреляционный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты предварительных экспериментов по оптимизации протокола показали следующее: использование культуральной среды с добавкой SMDS не вызывало формирование тканевых фибрилл; добавление Matrigel ускоряло конденсацию геля и образование гладкомышечных тканеинженерных структур; концентрация ГМК 106 клеток/мл

является оптимальной и способствует быстрому формированию конструкций; добавление 10% фибробластов не влияло на скорость формирования конструкций.

Для структурной характеристики конструкций использовали метод флуоресцентной микроскопии. На рис. 3 представлено иммуногистохимическое окрашивание ТК на α -актин гладких мышц, десмин и ядерное ДНК с использованием DAPI, а также окраска гематоксилином и эозином. Наибольшую белковую фракцию в ГМК составляет α -актин, он также выполняет основную роль в сокращении при взаимодействии с миозином и через полимеризацию участвует в формировании цитоскелета [15]. Десмин является основным белком, составляющим промежуточный филамент сократительного аппарата, и локализован в Z-пластинке поперечно полосатой мышцы и в плотных тельцах гладкой мышечной ткани [16]. Данные иммуногистохимического окрашивания демонстрируют структурную однородность тканеинженерных волокон, равномерное и плотное распределение гладкомышечных клеток в конструкциях.

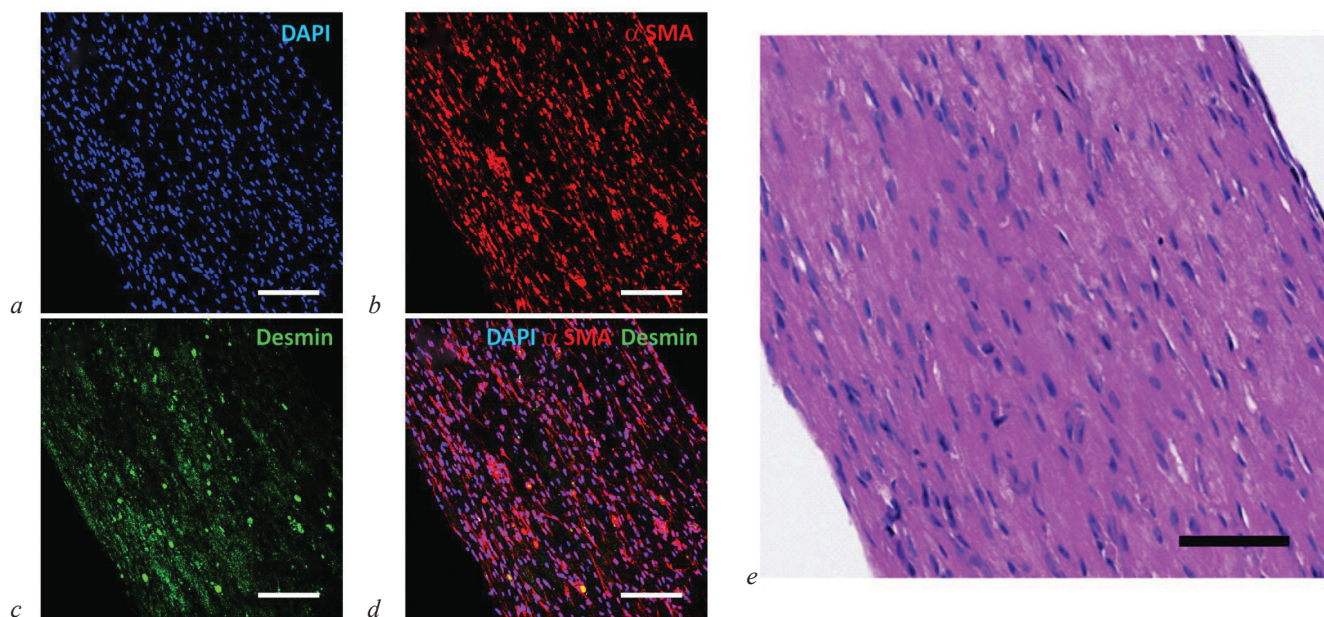


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ продольных срезов конструкции: *a* – окраска ядерной ДНК при помощи DAPI; *b*, *c* – окрашивание на основные маркеры сократительного фенотипа α -актин (красный) и десмин (зеленый); *d* – объединенное изображение; *e* – окраска гематоксилином и эозином. Размер масштабной шкалы – 100 мкм

Для проверки стабильности механоэластических свойств ТК были выполнены контрольные измерения в течение 7 дней после формирования конструкций. Диаграмма растяжения представлены на рис. 4, *a*. Линейную часть диаграммы использовали для вычисления модуля упругости (рис. 4, *b*). Существенное удлинение ТК наблюдается при приложении попе-

речной силы растяжения (F) больше 0,07 мН. Анализ диаграмм растяжения не выявил статистически значимых изменений между измерениями в 1-, 3- и 7-й дни ($F(2,10) = 0,225$; $p = 0,8$; $n = 6$). Значение модуля упругости составило $7,4 \pm 1,5$ кПа в начале эксперимента, $7,9 \pm 1,4$ кПа на 3-й день и $7,8 \pm 1,9$ кПа – на 7-й день соответственно.

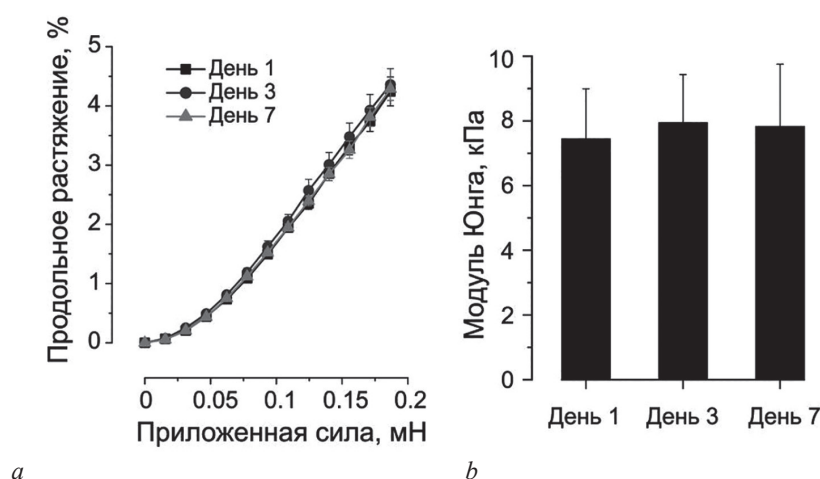


Рис. 4. Стабильность механоэластических свойств тканеинженерных конструкций: *a* – диаграмма растяжения конструкции. Повторные измерения на 1-, 4- и 7-й день; *b* – рассчитанный модуль упругости (модуль Юнга), $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$. Статистические отличия между тремя группами отсутствуют

В литературе данные эластичности гладкомышечных ТК варьируют в зависимости от способа выращивания – при статической либо переменной нагрузке; состава среды культивирования; геометрии конструкций – кольцевые [5, 6], фибрилообразные [7]; типа наполнителя клеточной смеси – коллаген, фибрин, а также от происхождения клеток и их количественного соотношения с наполнителем [5, 17–20]. Данные, полученные в отдельных ГМК, менее вариабельны и в основном определяются фенотипом клеток [21–23]. В частности, при измерении эластичности методом атомно-силовой микроскопии в конструкциях, выращенных с использованием гладкомышечных клеток, изолированных из грудной части аорты обезьяны (*Macaca fascicularis*) и коллагенового матрикса, были получены значения модуля упругости в пределах $13,7 \pm 2,4$ и $23,3 \pm 3,0$ кПа [24].

Наблюдаемую вариабельность авторы связывают с возрастными изменениями экспрессии актина и $\beta 1$ -субъединицы интегрина [25]. Оценка эластичности с помощью того же метода, проведенная в отдельных ГМК, полученных из грудной аорты здоровых молодых крыс линии Вистар, варьирует в пределах 5–14 кПа [21, 23]. Близкие значения модуля эластичности ($\sim 13,7$ кПа) были продемонстрированы в отдельных ГМК, изолированных из артериол скелетных мышц крысы линии Спрег-Дуоли и культивированных в течение 3–7 дней после первого пассажа [22].

Изометрическое измерение эластичности, выполненное D. Seliktar и соавт. с помощью датчика силы в кольцевых трехмерных гладкомышечных конструкциях, выращенных в коллагеновом матриксе (2 мг/мл) из клеток грудной аорты крыс (10^6 клеток/мл),

после 8 дней культивирования показало значения равное 68 кПа [18]. В другой работе, где авторы сравнивали эластические свойства кольцевых конструкций, созданных на основе фибрина (2 мг/мл) и коллагена (2 мг/мл) с использованием того же типа ГМК (аорта крысы, 106 клеток/мл), было показано, что после 5 дней культивирования коллагеновые конструкции обладают значительно большей жесткостью (191 кПа) по сравнению с фибриновыми (19 кПа) [20]. Увеличение концентрации коллагена и фибрина в клеточной смеси до 4 мг/мл увеличивало жесткость до 242 и 28 кПа соответственно.

Показатели эластичности гладкомышечных ТК, полученные в нашей работе, близки к таковым в отдельных ГМК. Это объясняется использованием фибрина в клеточной смеси. Матрикс на основе фибрина широко применяется в тканевой инженерии [26]. Фибриновый гель обладает вазоактивными и высокими адгезивными свойствами, способствует быстрой адаптации и пролиферации клеток в конструкциях [11], но вследствие структурных особенностей имеет значительную эластичность [27]. Следует отметить, что поскольку ГМК обладают высокой пластичностью [28, 29], эластичность конструкций может значительно изменяться в течение культивирования [18, 19]. Это может усложнять интерпретацию данных, особенно в длительных экспериментах, как, например, с применением продолжительной механической стимуляции [18]. Использование в нашей работе ингибиторов фибринолизина (апротинин, транексамовая кислота) и ростовой добавки с низким содержанием сыворотки (SMDS) способствовало устойчивости эластических свойств ТК после их созревания (см. рис. 4).

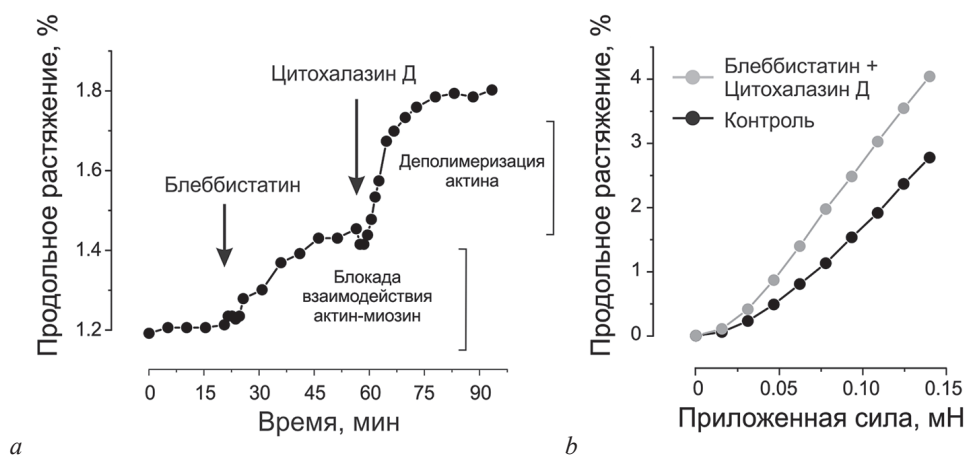


Рис. 5. Влияние блеббистатина и цитохалазина Д на механоэластические свойства тканеинженерных конструкций: *a* – кривая динамики изменения растяжения конструкции в ответ на последовательное применение 30 мкМ блеббистатина и 50 мкМ цитохалазина Д при постоянной приложенной силе 0,062 мН; *b* – диаграмма растяжения конструкции в контроле и после инкубации с блеббистатином и цитохалазином Д

На рис. 5 показаны результаты отдельного эксперимента по тестированию механоэластических свойств ТК под воздействием Бб и Цито-Д. Видно, что добавление 30 мкМоль Бб вызывает увеличение растяжения ТК с 1,2 до 1,45% (рис. 5, *a*). Последующая обработка Цито-Д в концентрации 50 мкМоль способствует дальнейшей релаксации ТК и увеличению растяжения до 1,8%. Это соотносится с изменениями эластичности, соответствующими приложенной силе 0,062 мН на диаграмме растяжения конструкции, представленной на рис. 5, *b*. Известно, что Бб является селективным ингибитором АТФ-азной активности различных изоформ миозина II в поперечнополосатых [12] и ГМК [30], тогда как Цито-Д изменяет механические свойства путем деполимеризации актиновых филаментов цитоскелета клеток [13]. Соответственно, добавление Бб ингибирует связанное с миозином сокращение, а последующая инкубация с Цито-Д разрушает актиновое тоническое сокращение и увеличивает релаксацию ТК.

Адренергическая и холинергическая стимуляции являются одними из наиболее важных систем, задействованных в регуляции сердечно-сосудистого тонуса. С одной стороны, известно, что β -адренергическая стимуляция через активацию аденилатциклазы и увеличение цАМФ влияет на уровень внутриклеточного Ca^{2+} [31, 32]. Релаксацию обуславливают следующие предложенные механизмы: гиперполяризация через Ca^{2+} активируемые калиевые каналы, уменьшение чувствительности сократительных элементов к Ca^{2+} вследствие фосфорилирования киназы легких цепей миозина, уменьшение содержания цитозольного Ca^{2+} через регуляцию Ca^{2+} -транспортирующих систем саркоплазматического ретикулума и плазмалеммы и

др. [33, 34]. С другой стороны, васкулярные ГМК находятся в близком структурном и функциональном взаимодействии с клетками эндотелия, который может регулировать тонус сосудов через паракринное взаимодействие либо через межклеточные каналы, соединяющие два типа клеток [35]. Поэтому возможна опосредованная адренергическая регуляция сократимости ГМК с участием эндотелиальных клеток [35–37].

В наших экспериментах инкубация ТК с Изо в концентрации 1 мкМ вызвала небольшое, но значимое уменьшение эластичности при увеличении приложенной силы растяжения свыше 0,05 мН ($p < 0,05$, $n = 6$), а также значимое увеличение модуля упругости ($p < 0,05$, $n = 6$) с $7,9 \pm 1,5$ кПа до $10,2 \pm 2,1$ кПа (рис. 6). В ранних работах по изучению влияния β -адренергической стимуляции на тонус сосудов и на сократимость ГМК, эксперименты в основном проводились *in vivo* либо *in vitro* на изолированных препаратах сосудов животных, где типичным является релаксирующий эффект [32, 33, 35]. На изолированных ГМК был продемонстрирован двойной механизм регуляции кальциевых каналов, когда при наноконцентрациях Изо увеличивал ток кальциевых каналов L-типа, в то время как при микроконцентрациях его действие было обратным [38]. Поскольку для выращивания конструкций нами использовались только ГМК, зависимость механизма ответа от концентрации Изо может лежать в основе наблюдаемого эффекта уменьшения эластичности.

Действие Ацх на васкулярные ГМК осуществляется через M_3 -мускариновые рецепторы [39]. Согласно концепции участия эндотелиальных клеток в гуморальной регуляции тонуса сосудов, первичную

роль в ответ на холинергическую стимуляцию выполняют эндотелиальные клетки, а примыкающие к ним ГМК являются пассивными реципиентами монооксида азота [40], хотя из ранних работ известно, что в случае прямого воздействия на ГМК, Ацх,

связываясь с M_3 -рецептором, активирует фосфолипазу С и через инозитолтрифосфатный путь может индуцировать сократительный эффект [41]. В наших экспериментах применение Ацх вызывало незначительное уменьшение эластичности ТК (рис. 6, *b*).

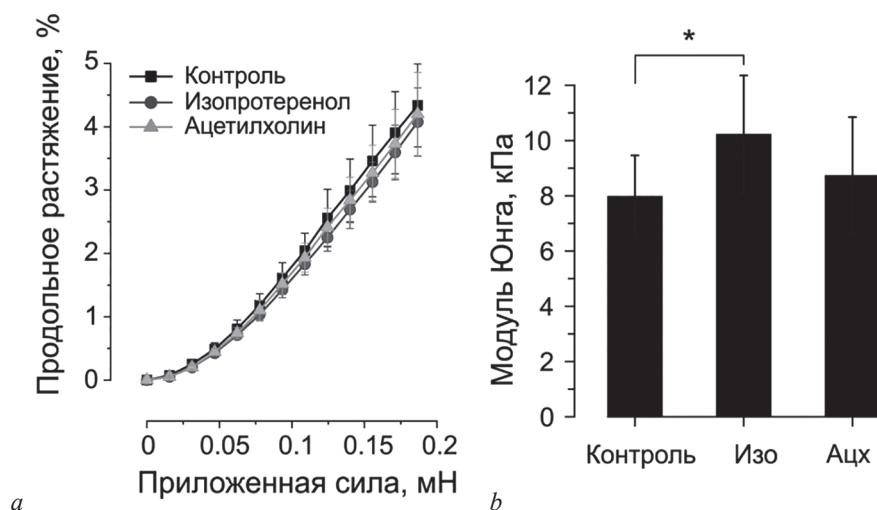


Рис. 6. Изменение упругости тканеинженерных конструкций в ответ на адренергическую и холинергическую стимуляцию: *a* – диаграмма растяжения конструкции в контроле и под действием изопротеренола и ацетилхолина; *b* – изменение модуля упругости (модуля Юнга) под действием изопротеренола и ацетилхолина, $\bar{x} \pm SEM$, $n = 6$

Незначительный эффект, скорее всего, обусловлен гомогенной клеточной популяцией, т.е. отсутствием эндотелиальных клеток в клеточной смеси при выращивании конструкций. Последующие эксперименты с добавлением фракции эндотелиальных клеток позволят оценить роль взаимодействия различных типов клеток как в холинергической, так и в адренергической регуляции сократимости гладкомышечных ТК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые была использована экспериментальная платформа I-Wire для выращивания и характеристики гладкомышечных ТК, полученных с использованием ГМК из коронарной артерии человека. Мы показали, что концентрация 10^6 клеток/мл является оптимальной для формирования тканевых фибрилл с однородным и плотным распределением клеток, при этом добавление в клеточную смесь Matrigel способствует более быстрому формированию конструкции. Совместное применение Бб и Цито-Д дает возможность вычленения и оценки активных и пассивных элементов эластичности ТК. Добавление Изо вызывало увеличение жесткости конструкций, тогда как инкубация с Ацх не оказывала значительного влияния на эластичность ТК. Поскольку клетки эндотелия играют важную роль в регуляции гладкомышечного тонуса сосудов, то для воспроизведения

более полной системы регуляции гладкомышечных ТК дальнейшие эксперименты должны включать выращивание конструкций при совместном культивировании ГМК и эндотелиальных клеток, а также использование эластина и коллагена для формирования более жесткого внеклеточного матрикса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iyemere V.P., Proudfoot D., Weissberg P.L., Weissberg P.L., Shanahan C.M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* 2006; 260 (3): 192–210. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01692.x.
2. Bennett M.R., Sinha S., Owens G.K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2016; 118 (4): 692–702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
3. Ailawadi G., Moehle C.W., Pei H., Walton S.P., Yang Z., Kron I.L., Lau C.L., Owens G.K. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 138 (6): 1392–1399. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2009.07.075.
4. Touyz R.M., Alves-Lopes R., Rios F.J., Camargo L.L., Anagnostopoulou A., Arner A., Montezano A.C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2018; 114 (4): 529–539. DOI: 10.1093/cvr/cvy023.
5. Gwyther T.A., Hu J.Z., Billiar K.L., Rolle M.W. Directed cellular self-assembly to fabricate cell-derived tissue rings for biomechanical analysis and tissue engineering. *J. Vis. Exp.* 2011; 57: e3366. DOI: 10.3791/3366.

6. Dash B.C., Levi K., Schwan J., Luo J., Bartulos O., Wu H., Qiu C., Yi T., Ren Y., Campbell S., Rolle M.W., Qyang Y. Tissue-engineered vascular rings from human iPSC-derived smooth muscle cells. *Stem Cell Reports*. 2016; 7 (1): 19–28. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.004.
7. West A.R., Zaman N., Cole D.J., Walker M.J., Legant W.R., Boudou T., Chen C.S., Favreau J.T., Gaudette G.R., Cowley E.A., Maksym G.N. Development and characterization of a 3D multicell microtissue culture model of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2013; 304 (1): L4–16. DOI: 10.1152/ajplung.00168.2012.
8. Vunjak Novakovic G., Eschenhagen T., Mummery C. Myocardial tissue engineering: *in vitro* models. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (3): pii: a014076. DOI: 10.1101/cshperspect.a014076.
9. Sidorov V.Y., Samson P.C., Sidorova T.N., Davidson J.M., Lim C.C., Wikswa J.P. I-Wire Heart-on-a-Chip I: Three-dimensional cardiac tissue constructs for physiology and pharmacology. *Acta Biomater.* 2017; 48: 68–78. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.009.
10. Schroer A.K., Shotwell M.S., Sidorov V.Y., Wikswa J.P., Merryman W.D. I-Wire Heart-on-a-Chip II: Biomechanical analysis of contractile, three-dimensional cardiomyocyte tissue constructs. *Acta Biomater.* 2017; 48: 79–87. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.010.
11. Ahmann K.A., Weinbaum J.S., Johnson S.L., Tranquillo R.T. Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated *in vitro*. *Tissue Eng. Part A*. 2010; 16 (10): 3261–3270. DOI: 10.1089/ten.tea.2009.0708.
12. Kovacs M., Toth J., Hetenyi C., Malnasi-Csizmadia A., Sellers J.R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (34): 35557–35563. DOI: 10.1074/jbc.M405319200.
13. Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N.C., Elson E.L. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J. Cell Sci.* 2001; 114 (Pt 5): 1025–1036. PMID: 11181185.
14. Warren M.L. Forces. In: Taylor E.F. (edit.) *Introductory Physics*. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1979: 82–83.
15. Gunst S.J., Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008; 295 (3): C576–587. DOI: 10.1152/ajpcell.00253.2008.
16. Paulin D., Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp. Cell Res.* 2004; 301 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.08.004.
17. Hirai J., Kanda K., Oka T., Matsuda T. Highly oriented, tubular hybrid vascular tissue for a low pressure circulatory system. *Asaio J.* 1994; 40 (3): M383–388. PMID: 8555543 DOI: 10.1097/00002480-199407000-00027.
18. Seliktar D., Black R.A., Vito R.P., Nerem R.M. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling *in vitro*. *Ann. Biomed. Eng.* 2000; 28 (4): 351–362. PMID: 10870892. DOI: 10.1114/1.275.
19. Rowe S.L., Stegemann J.P. Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules*. 2006; 7 (11): 2942–2948. DOI: 10.1021/bm0602233.
20. Cummings C.L., Gawlitta D., Nerem R.M., Stegemann J.P. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials*. 2004; 25 (17): 3699–3706. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.073.
21. Sehgel N.L., Sun Z., Hong Z., Hunter W.C., Hill M.A., Vatner D.E., Vatner S.F., Meininger G.A. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension*. 2015; 65 (2): 370–377. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04456.
22. Hong Z., Reeves K.J., Sun Z., Li Z., Brown N.J., Meininger G.A. Vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion to collagen I modified by vasoactive agonists. *PLoS One*. 2015; 10 (3): e0119533. DOI: 10.1371/journal.pone.0119533.
23. Zhou N., Lee J.J., Stoll S., Ma B., Costa K.D., Qiu H. Rho kinase regulates aortic vascular smooth muscle cell stiffness via actin/SRF/myocardin in hypertension. *Cell Physiol. Biochem*. 2017; 44 (2): 701–715. DOI: 10.1159/000485284.
24. Qiu H., Zhu Y., Sun Z., Trzeciakowski J.P., Gansner M., Depre C., Resuello R.R., Natividad F.F., Hunter W.C., Genin G.M., Elson E.L., Vatner W.E., Meininger G.A., Vatner S.F. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ. Res.* 2010; 107 (5): 615–619. DOI: 10.1161/CIRCRESA.110.221846.
25. Zhu Y., Qiu H., Trzeciakowski J.P., Sun Z., Li Z., Hong Z., Hill M.A., Hunter W.C., Vatner D.E., Vatner S.F., Meininger G.A. Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging Cell*. 2012; 11 (5): 741–750. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00840.x.
26. Shaikh F.M., Callanan A., Kavanagh E.G., Burke P.E., Grace P.A., McGloughlin T.M. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 188 (4): 333–346. DOI: 10.1159/000139772.
27. Litvinov R.I., Weisel J.W. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol.* 2017; 60–61: 110–123. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.08.003.
28. Rensen S.S., Doevendans P.A., van Eys G.J. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth. Heart J.* 2007; 15 (3): 100–108. DOI: 10.1007/bf03085963.
29. Tuna B.G., Bakker E.N., VanBavel E. Smooth muscle biomechanics and plasticity: relevance for vascular calibre and remodelling. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110 (1): 35–41. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00794.x.
30. Eddinger T.J., Meer D.P., Miner A.S., Meehl J., Rovner A.S., Ratz P.H. Potent inhibition of arterial smooth muscle tonic contractions by the selective myosin II inhibitor, blebbistatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320 (2): 865–870. DOI: 10.1124/jpet.106.109363.
31. Tanaka Y., Horinouchi T., Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32 (7): 503–514. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2005.04222.x.

32. Eckly A.E., Stoclet J.C., Lugnier C. Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 271 (1): 237–240. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90287-9.
33. Scheid C.R., Honeyman T.W., Fay F.S. Mechanism of beta-adrenergic relaxation of smooth muscle. *Nature.* 1979; 277 (5691): 32–36. DOI: 10.1038/277032a0.
34. Mueller E., van Breemen C. Role of intracellular Ca²⁺ sequestration in beta-adrenergic relaxation of a smooth muscle. *Nature.* 1979; 281 (5733): 682–683. DOI: 10.1038/281682a0.
35. Gray D.W., Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107 (3): 684–690. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb14507.x.
36. Graves J., Poston L. Beta-adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108 (3): 631–637. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb12853.x.
37. Chalon S., Tejura B., Moreno H.Jr., Urae A., Blaschke T.F., Hoffman B.B. Role of nitric oxide in isoprenaline and sodium nitroprusside-induced relaxation in human hand veins. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47 (1): 91–98. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1999.00863.x.
38. Xiong Z., Sperelakis N., Fenoglio-Preiser C. Isoproterenol modulates the calcium channels through two different mechanisms in smooth-muscle cells from rabbit portal vein. *Pflugers Arch.* 1994; 428 (2): 105–113. DOI: 10.1007/bf00374847.
39. Walch L., Brink C., Norel X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie.* 2001; 56 (3): 223–226. PMID: 11475798.
40. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): 373–376. DOI: 10.1038/288373a0.
41. Itoh T., Fujiwara T., Kubota Y., Nishiye E., Kuriyama H. Roles of protein kinase C on the mechanical activity of vascular smooth muscles. *Am. J. Hypertens.* 1990; 3 (8 Pt 2): 216s–219s. DOI: 10.1093/ajh/3.8.216.

Сведения об авторах

Сульгин Александр Андреевич, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

Сидорова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, отделение аллергии, легочной и интенсивной терапии, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA.

Сидоров Вениамин Юрьевич, канд. биол. наук, профессор, факультет биомедицинской инженерии, Vanderbilt University, Nashville, USA.

(✉) Сидоров Вениамин Юрьевич, e-mail: v.sidorov@vanderbilt.edu.

Поступила в редакцию 13.09.2019

Подписана в печать 25.12.2019