

УДК 611.018.74:576.5:616.1

DOI 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93

СОЗДАНИЕ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЕННОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА *IN VITRO*

М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, Т.В. Глушкова, В.Г. Матвеева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Цель	Создание персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра в условиях пульсирующего биореактора.
Материалы и методы	Методом электроспиннинга изготовлены трубчатые каркасы из смеси биodeградируемых полимеров поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) и поли(ε-капролактона) (PCL). Внутренняя поверхность модифицирована фибрином. Трубчатые каркасы заселяли культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток и культивировали в статических условиях в течение двух суток. Клеточнозаселенные протезы продолжили культивировать в течение пяти суток в системе пульсирующего биореактора с итоговым напряжением сдвига 2,85 дин/см ² .
Результаты	Выявлены преимущества культивирования клеточнозаселенных сосудистых протезов в условиях пульсирующего биореактора. Выбранный режим культивирования клеточнозаселенных сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см ² не оказывал повреждающего воздействия на целостность эндотелиальной выстилки. Под влиянием однонаправленных механических стимулов волокна F-актина приобрели преимущественную ориентацию в направлении потока, а также увеличилась экспрессия F-актина, белка фокальной адгезии Talin, специфических эндотелиальных маркеров – CD309, CD31, vWF.
Заключение	Создание персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра с функциональным эндотелиальным монослоем возможно благодаря использованию аутологичных эндотелиальных клеток, аутологичного фибрина и культивированию в условиях пульсирующего потока.
Ключевые слова	Тканеинженерный сосудистый протез малого диаметра • Клеточные технологии • Тканевая инженерия • Пульсирующий проточный биореактор • Напряжение сдвига • Механотрансдукция

Поступила в редакцию: 30.04.2021; принята к печати: 20.06.2021

DEVELOPMENT OF PERSONALIZED CELL-POPULATED VASCULAR GRAFT *IN VITRO*

M.Yu. Khanova, E.A. Velikanova, T.V. Glushkova, V.G. Matveeva

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Aim	To create a personalized cell-populated small-diameter vascular prosthesis in a pulsating bioreactor.
Methods	Tubular grafts were made by electrospinning from mixtures of biodegradable polymers, poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly(ε-caprolactone) (PCL). The inner surface is modified with fibrin. Tubular scaffolds were colonized with cultured colony-forming endothelial cells and grown under static conditions for 2 days. Then, the cell-populated prostheses continued to be cultivated for 5 days in a pulsating bioreactor system with a final shear stress of 2.85 dynes/cm ² .

Для корреспонденции: Марьям Юрисовна Ханова, khanovam@gmail.com; адрес: Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Mariam Yu. Khanova, khanovam@gmail.com; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Results

The advantages of the cultivation of cell-populated vascular prostheses in a pulsating bioreactor have been revealed. The selected mode of cultivation of cell-populated vascular prostheses under conditions of a pulsating flow with a shear stress of 2.85 dynes/cm² did not have a damaging effect on the integrity of the endothelial monolayer. Moving unidirectional mechanical stimuli of chaotic orientation fibers of F-actin changed to a predominant orientation in the direction of flow, and also increased the expression of F-actin, Talin focal adhesion protein, and specific endothelial markers CD309, CD31, vWF.

Conclusion

The creation of a personalized cell-populated small-diameter vascular prosthesis with a functional endothelial monolayer is possible due to the use of autologous endothelial cells, autologous fibrin, and cultivation under conditions of a pulsating flow.

Keywords

Tissue-engineered small-diameter vascular graft • Cell technologies • Tissue engineering • Pulsatile flow bioreactor • Shear stress • Mechanotransduction

Received: 30.04.2021; accepted: 20.06.2021

Список сокращений

КФЭК – колониеформирующие эндотелиальные клетки PNBV – полигидроксibuтират/валерат
 CD – кластер дифференцировки vWF – фактор фон Виллебранда
 PCL – поликапролактон

Введение

Проблема создания сосудистого протеза малого диаметра до сих пор не решена. Разработка персонифицированного сосудистого протеза из биодеградируемых полимеров и собственных клеток пациента позволит избежать таких осложнений, как тромбоз и реакция организма на чужеродный агент, после имплантации подобного протеза в сосудистое русло. Культивирование клеток в условиях пульсирующего потока выступит в качестве preconditionирования эндотелиального монослоя к условиям естественного кровотока [1].

Цель исследования – создание персонифицированного клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра в условиях пульсирующего биореактора.

Материалы и методы

Трубчатые каркасы (диаметром 4 мм) изготавливали методом электроспиннинга из смеси биодеградируемых полимеров 10% поли(ε-капролактона) (PCL) и 5% поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (PNBV), растворенных в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1:2. Для модификации внутренней поверхности полимерных каркасов из плазмы выделяли фибриноген в концентрации 30–40 мг/мл [2]. Каркасы методом погружения пропитывали фибриногеном, затем осуществляли полимеризацию нанесением на поверхность протеза тромбино-кальциевой смеси (тромбин 500 ЕД/мл и CaCl₂ 40 ммоль/л). После полимеризации трубчатый каркас погружали в фосфатно-солевой буфер-

ный раствор с ε-аминокапроновой кислотой в объеме 2 мг/мл до последующего заселения клетками. Для заселения использовали культуру колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК), которую получали культивированием моноклеарной фракции из крови пациентов с ишемической болезнью сердца в питательной среде EGM-2MV (Lonza, Швеция) с содержанием 5% эмбриональной бычьей сыворотки [3]. На внутреннюю поверхность биодеградируемых протезов с фибриновым покрытием вносили 7×10^5 КФЭК и культивировали в течение двух суток в статических условиях в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Затем клеточнозаселенные образцы подключали к системе проточного биореактора и продолжали культивирование в течение пяти суток при следующих параметрах: объем выброса – 0,7 мл, частота выброса – 20 уд/мин, итоговое напряжение сдвига – 2,85 дин/см².

Контрольную группу составили аналогичные сосудистые протезы, культивируемые в статических условиях. Структуру внутренней поверхности до и после модификации фибрином исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии на микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония). Влияние напряжения сдвига на жизнеспособность эндотелиальных клеток исследовали с помощью окрашивания флуоресцентными красителями (DAPI/EtBr). Методом лазерной сканирующей микроскопии детектировали белки эндотелиального профиля – CD31, CD309 и фактора фон Виллебранда (vWF), структурный белок F-актин, белок точечной адгезии Talin; ядра окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США). Количественный

анализ плотности популяции определяли как количество ядер на 1 мм^2 . Количественный анализ репрезентативных изображений проводили в программе ImageJ. Результаты представлены как средняя интенсивность флуоресценции (усл. ед.) и процент положительно окрашенной площади в поле зрения (%). Статистический анализ результатов и построение графиков проведены в программе Prism 7 (GraphPad, США). Данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (25%, 75%). Межгрупповые различия проанализированы при помощи U-критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

Результаты

Сравнительный анализ структуры поверхности полимерного каркаса до и после полимеризации фибрином показал, что фибрин выровнял полимерную поверхность, образовав более плотное переплетение фибрилл. На фидерном слое PNBV/PCL/фибрин-каркасов обнаружены хорошо распластанные клетки.

Оценка целостности эндотелиальной выстилки включала анализ жизнеспособности эндотелиальных клеток и плотности клеточной популяции. Выявлена полная сохранность жизнеспособности (100%) независимо от условий культивирования. Также не обнаружено статистически значимых отличий в плотности клеточной популяции ($p = 0,059$). Эти результаты свидетельствуют о том, что данный режим культивирования в проточном пульсирующем биореакторе не оказывал повреждающего эффекта и адгезивных свойств фидерного слоя из фибрина было достаточно для формирования устойчивой адгезии.

При культивировании в динамических условиях регистрировали изменения, свидетельствовавшие об их адаптации к напряжению сдвига. В динамических условиях культивирования процент положительно окрашенной площади в поле зрения рецептора 2 к фактору роста эндотелия сосудов CD309 (VEGFR2) был выше в 1,5 раза и составил 3,1 [2,7; 4,3] %, в статических условиях – 2,0 [1,8; 2,3] % ($p < 0,01$). Количественный анализ экспрессии специфического эндотелиального маркера CD31 продемонстрировал, что средняя интенсивность флуоресценции CD31 в статических условиях была равна 50,5 [40,8; 55,3] усл. ед., в динамических – 56,0 [53,5; 62,3] усл. ед. ($p < 0,05$). Ответ эндотелиальных клеток на напряжение сдвига отразился трехкратным увеличением секреторной активности в отношении vWF. При культивировании в условиях пульсирующего потока процент положительно окрашенной площади vWF в поле зрения составил 17,5 [13,5; 23,3] %, в статических условиях – 5,5 [4,0; 7,3] % ($p < 0,001$).

Прикрепление клеток осуществляется взаимодействием белков фокальной адгезии с трансмембранными интегринами внеклеточного матрикса.

Увеличение синтеза Talin отражает усиленное формирование адгезионных контактов с внеклеточным матриксом. Процент положительно окрашенной площади в поле зрения белка очаговой адгезии Talin в статических условиях культивирования составил 1,7 [1,6; 1,9] %, в динамических – 2,65 [2,1; 3,3] % со статистически значимым отличием ($p < 0,05$). Адгезионные белки (Talin, Zyxin, VASP, Paxillin, Vinculin, α -actinin) передают механический сигнал микрофиламентам цитоскелета, что позволяет клеткам минимизировать внутриклеточный стресс и адаптироваться к локальным изменениям [4]. Под влиянием потока отмечены упорядочивание филаментов F-актина и ориентация клеток вдоль потока, что согласовывалось с результатами других исследовательских групп [5]. Средняя интенсивность флуоресценции структурного белка F-актина была достоверно выше в динамических условиях культивирования и составила 59,7 [52,2; 64,8] усл. ед. в сравнении со статикой – 66,5 [62,7; 71,6] усл. ед. ($p < 0,01$).

Обсуждение

Целостная эндотелиальная выстилка на внутренней поверхности сосудистого протеза, устойчивая к физиологическим динамическим нагрузкам, является предпосылкой для долгосрочной проходимости. Поскольку эндотелиальный монослой образует тонкую грань между потоком крови и сосудистой стенкой, он непосредственно подвержен гемодинамическим силам. В зависимости от геометрии сосудистого древа меняется направленность механических стимулов, которая влечет за собой различные клеточные события [6]. Ответ эндотелиальных клеток на такие стимулы включает ремоделирование цитоскелета с целью минимизировать изменения, формирующие внутриклеточный стресс. Эти адаптивные изменения способствуют поддержанию гомеостаза и оказывают атеропротективный эффект [6]. Эндотелиальные клетки распознают смену локального напряжения сдвига и циклическую деформацию посредством активации механосенсоров, модулируется внутриклеточная передача сигналов, что ведет к изменениям экспрессии генов, морфологии клеток и структурному ремоделированию [7]. Также пульсирующий поток стимулирует более эффективное образование сети фибронектина – гликопротеина внеклеточного матрикса, который опосредует адгезию, рост и миграцию клеток [5, 8].

Совокупность подобных изменений подтверждена в представленном исследовании на культуре аутологических КФЭК пациентов с ишемической болезнью сердца, которую использовали для заселения поверхности протезов в условиях проточного пульсирующего биореактора. Применение аутологичного фибрина в качестве фидерного слоя способствовало формированию устойчивой адгезии и, как следствие, усилило межклеточные контакты.

Заключение

Создание персонифицированного клеточно-заселенного сосудистого протеза малого диаметра с функциональным эндотелиальным монослоем возможно благодаря использованию аутологичных эндотелиальных клеток, аутологичного фибрина и культивированию в условиях пульсирующего потока.

Конфликт интересов

М.Ю. Ханова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов с реализацией пациенто-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Информация об авторах

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8826-9244

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Author Information Form

Khanova Mariam Yu., a junior research assistant at the Laboratory of Cell Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8826-9244

Velikanova Elena A., PhD, a research assistant at the Laboratory of Cell Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Glushkova Tatyana V., PhD, a senior research assistant at the Laboratory of New Biomaterials, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Matveeva Vera G., PhD, a senior research assistant at the Laboratory of Cell Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Вклад авторов в статью

ХМЮ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ВЕА – вклад в дизайн исследования, получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГТВ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МВГ – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

KhMYu – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

VEA – contribution to the design of the study, data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GTV – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MVG – significant contribution to the concept and design of the study, contribution to the design of the study, data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yazdani S.K., Tillman B.W., Berry J.L., Soker S., Geary R.L. The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg.* 2010; 51 (1): 174–83. doi: 10.1016/j.jvs.2009.08.074.
2. Aper T., Kolster M., Hilfiker A., Teebken O.E., Haverich A. Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012; 2 (3): 115. doi:10.4172/2155-9538.1000115.
3. Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Антонова Л.В., Сардин Е.С., Крутицкий С.С., Барбараш О.Л. Возможность получения и характеристика колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. *Цитология.* 2018; 60 (8): 598–608. doi: 10.31116/tsitol.2018.08.03).
4. Burrige K., Wittchen E.S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.* 2013; 200 (1): 9–19. doi: 10.1083/jcb.201210090.
5. Gong X., Liu H., Ding X., Liu M., Li X., Zheng L., Jia X., Zhou G., Zou Y., Li J., Huang X., Fan Y. Physiological pulsatile flow culture conditions to generate functional endothelium on a sulfated silk fibroin nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 2014; 35 (17): 4782–4791. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.050.
6. Shu Chien. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292 (3): H1209-24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.
7. Ando J., Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15 (5): 1389–403. doi: 10.1089/ars.2010.3361.
8. Leiss M., Beckmann K., Girós A., Costell M., Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Elsevier.* 2008; 20 (5): 502–507. doi: 10.1016/j.ceb.2008.06.001.

REFERENCES

1. Yazdani S.K., Tillman B.W., Berry J.L., Soker S., Geary R.L. The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg.* 2010; 51 (1): 174–83. doi: 10.1016/j.jvs.2009.08.074.
2. Aper T., Kolster M., Hilfiker A., Teebken O.E., Haverich A. Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012; 2 (3): 115. doi:10.4172/2155-9538.1000115.
3. Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Antonova L.V., Sardin E.S., Krutitsky S.S., Barbarash O.L. Isolation and characteristics of colony-forming endothelial cells from peripheral blood in patients with ischemic heart disease. *Cell and Tissue Biology.* 2018; 60 (8): 598–608. (In Russian). doi: 10.31116/tsitol.2018.08.03).
4. Burrige K., Wittchen E.S. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.* 2013; 200 (1): 9–19. doi: 10.1083/jcb.201210090.
5. Gong X., Liu H., Ding X., Liu M., Li X., Zheng L., Jia X., Zhou G., Zou Y., Li J., Huang X., Fan Y. Physiological pulsatile flow culture conditions to generate functional endothelium on a sulfated silk fibroin nanofibrous scaffold. *Biomaterials.* 2014; 35 (17): 4782–4791. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.050.
6. Shu Chien. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292 (3): H1209-24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.
7. Ando J., Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15 (5): 1389–403. doi: 10.1089/ars.2010.3361.
8. Leiss M., Beckmann K., Girós A., Costell M., Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Elsevier.* 2008; 20 (5): 502–507. doi: 10.1016/j.ceb.2008.06.001.

Для цитирования: Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Глушкова Т.В., Матвеева В.Г. Создание персонализированного клеточнозаселенного сосудистого протеза *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(2S): 89-93. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93

To cite: Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Glushkova T.V., Matveeva V.G. Development of personalized cell-populated vascular graft *in vitro*. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(2S): 89-93. DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93