



УДК 57.085.23

DOI 10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97

ВЛИЯНИЕ НАПРЯЖЕНИЯ СДВИГА НА СВОЙСТВА КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СРАВНЕНИИ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, М.Ю. Ханова, Л.В. Антонова

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

Основные положения

• Предварительное заселение эндотелиальными клетками внутренней поверхности тканеинженерных сосудов малого диаметра, как предполагается, может служить эффективным способом профилактики тромбозов. Остается дискуссионным вопрос о выборе оптимального источника эндотелиальных клеток для использования в тканевой инженерии. В работе рассмотрены особенности культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток, полученных из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, в сравнении со зрелыми эндотелиальными клетками из коронарной артерии.

Цель

Изучение влияния ламинарного потока на морфологические и функциональные особенности зрелых эндотелиальных клеток и колониеформирующих эндотелиальных клеток, полученных из периферической крови.

Материалы и методы

Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии приобретены у Cell Applications (США). Колониеформирующие эндотелиальные клетки получали из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. Клетки выделяли с использованием градиента фиколла, культивировали в культуральной среде EGM-2MV, содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки. Клетки, составившие экспериментальную группу, культивировали в планшетах μ -Luera в перфузионной системе, создававшей напряжение сдвига в 3 дин/см². Время культивирования – 2 суток. Клетки контрольной группы культивировали в статических условиях. По окончании культивирования проводили иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры CD31, KDR/CD309, CD144, фактор фон Виллебранда, коллаген IV типа, F-актин.

Результаты

И в статике, и в условиях ламинарного потока колониеформирующие эндотелиальные клетки и эндотелиальные клетки коронарных артерий сохраняли высокую плотность и жизнеспособность. Напряжение сдвига стимулировало изменение фенотипа колониеформирующих эндотелиальных клеток в направлении зрелых эндотелиальных клеток, в частности значимое увеличение экспрессии KDR/CD309 и CD31. Действие ламинарного потока снижало синтез фактора фон Виллебранда, стимулировало синтез коллагена IV типа. Напряжение сдвига способствовало развитию структурных перестроек клеток в ответ на трансдукцию, выразившуюся в изменении ориентации фибрилл F-актина в соответствии с направлением потока.

Заключение

Колониеформирующие эндотелиальные клетки демонстрировали характерный ответ на действие напряжения сдвига, заключающийся в изменении морфологии, фенотипа и секреторной активности клеток, сравнимый с таковым у эндотелиальных клеток коронарных артерий.

Ключевые слова

Тканевая инженерия • Напряжение сдвига • Колониеформирующие эндотелиальные клетки • Эндотелиальные клетки коронарных артерий

Поступила в редакцию: 28.08.2022; поступила после доработки: 01.09.2022; принята к печати: 13.10.2022

Для корреспонденции: Елена Анатольевна Великанова, velikanova_ea@mail.ru; адрес: Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Elena A. Velikanova, velikanova_ea@mail.ru; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

EFFECTS OF SHEAR STRESS ON THE PROPERTIES OF COLONY-FORMING ENDOTHELIAL CELLS IN COMPARISON WITH CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS

E.A. Velikanova, V.G. Matveeva, M.Yu. Khanova, L.V. Antonova

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

Highlights

• It is assumed that pre-colonization by endothelial cells of the inner surface of tissue-engineered vessels of small diameter can serve as an effective way to prevent thrombosis. The question of choosing the optimal source of endothelial cells for use in tissue engineering remains debatable. The paper considers the features of the culture of colony-forming endothelial cells obtained from the peripheral blood of patients with coronary heart disease, in comparison with mature endothelial cells from the coronary artery.

Aim

To study the effect of laminar flow on the morphological and functional characteristics of mature endothelial cells and peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells.

Methods

Coronary artery endothelial cells were purchased from the Cell Applications, Inc. Colony-forming endothelial cells were obtained from the peripheral blood of patients with coronary artery disease who underwent percutaneous coronary intervention. The cells were isolated using a Ficoll gradient and cultured in EGM-2MV culture medium containing 5% fetal bovine serum. The cells of the experimental group were cultured in μ -Luer plates in a perfusion system with a shear stress of 3 dyn/cm². The cultivation time was 2 days. The cells of the control group were cultured under static conditions. At the end of the cultivation we performed immunofluorescent staining for CD31, KDR/CD309, CD144, vWF, type IV collagen, F-actin.

Results

Colony-forming endothelial cells and coronary artery endothelial cells retained high density and viability both under static and laminar flow conditions. Shear stress stimulated a change in the phenotype of colony-forming endothelial cells towards a mature endothelial cells, in particular, a significant increased the expression of KDR/CD309 and CD31. The action of laminar flow reduced the synthesis of von Willebrand factor, stimulated the synthesis of type IV collagen. Shear stress promoted the development of structural rearrangements in cells in response to transduction, which manifested in a change in F-actin fibrils orientation on the flow direction.

Conclusion

Colony-forming endothelial cells showed a characteristic response to the action of shear stress, consisting in a change in morphology, phenotype, and secretory activity of cells, comparable to that of coronary artery endothelial cells.

Keywords

Tissue engineering • Shear stress • Colony-forming endothelial cells • Coronary artery endothelial cells

Received: 28.08.2022; received in revised form: 01.09.2022; accepted: 13.10.2022

Список сокращений

ECFC – колониеформирующие эндотелиальные клетки (endothelial colony-forming cells)

НСАЕС – эндотелиальные клетки коронарных артерий человека (human coronary artery endothelial cells)

Введение

Важную роль в лечении ишемической болезни сердца и ее осложнений занимает коронарное шунтирование. При этом аортокоронарное шунти-

рование остается наиболее частой кардиохирургической операцией во всем мире, что подчеркивает актуальность данного метода [1]. Вместе с тем существенным недостатком данной процедуры

является ограниченная доступность используемых аутологичных материалов вследствие сопутствующих заболеваний или ранее перенесенных вмешательств [2]. Это диктует необходимость создания искусственных кондуитов. В настоящее время наиболее перспективным подходом признана разработка тканеинженерных кровеносных сосудов. Использование различных материалов позволяет добиться высокой прочности и биосовместимости конструктов, кроме того, возможно создание каркаса из биodeградируемых полимеров, который в дальнейшем будет замещаться собственными тканями организма.

Исследования показали, что одной из наиболее существенных проблем, препятствующих применению тканеинженерных протезов сосудов малого диаметра, являются тромбозы [3–5]. Естественная профилактика тромбообразования заключается в формировании эндотелиального монослоя на поверхности протеза [6], но поскольку тромбообразование запускается в короткое время после контакта крови с полимерной поверхностью, это приводит к необходимости эндотелизации протеза до его имплантации в кровеносное русло.

Предварительное заселение и культивирование клеток на поверхности протеза в специальных условиях – один из основных подходов в тканевой инженерии. Исследования в данной области подразумевают выбор режимов культивирования и поиск оптимальных источников аутологичных клеток. Внимание исследователей привлекают колониеформирующие эндотелиальные клетки (endothelial colony-forming cells, ECFC), которые вследствие высокого ангиогенного и пролиферативного потенциала признаны подходящей клеточной популяцией для использования в тканевой инженерии [7]. ECFC могут быть получены из различных источников, однако морфологические и функциональные особенности ECFC из разных тканей до конца не выяснены. Очевидно, что с точки зрения применения в тканевой инженерии сосудов особенно важно понимание их реакции на воздействие напряжения сдвига.

Целью работы явилось изучение влияния ламинарного потока на морфологические и функциональные особенности ECFC, полученных из периферической крови, в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий.

Материалы и методы

Культивирование клеток

Для эксперимента использовали коммерческую культуру эндотелиальных клеток коронарных артерий человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) и культуру ECFC человека, полученных из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца.

Первичные эндотелиальные клетки коронарной

артерии приобретены у Cell Applications (300K-05a, США). Согласно информации производителя, клетки получены из артерий здоровых доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида). Клетки размораживали и культивировали в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США).

Периферическую кровь для выделения культуры ECFC получали у пациентов, проходивших лечение в НИИ КПССЗ. Дизайн исследования одобрен локальным этическим комитетом (ID 657459, утвержден 28 октября 2016 г.). Все участники предоставили письменное информированное согласие до набора. Всего в исследование было включено 8 пациентов мужского пола с ишемической болезнью сердца, направленных на чрескожное коронарное вмешательство. Критериями включения в исследование явились возраст от 50 до 70 лет, предшествующие операции на сердце или чрескожное коронарное вмешательство. Критерии исключения: возраст старше 70 лет, острые ишемические процессы, сопутствующие опухолевые и гематологические заболевания, активное воспаление, аутоиммунные заболевания, постинфарктный кардиосклероз. Подробная характеристика включенных в исследование больных приведена в более ранней публикации [8].

ECFC получали по модифицированному протоколу M. Kolbe с соавт. [9]. Клетки выделяли с использованием градиента фикола (Histopaque 1077, Sigma, США), отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клетки ресуспендировали в культуральной среде EGM-2MV (Lonza, Швейцария), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), и высевали на покрытые коллагеном культуральные флаконы. Через неделю клетки пересеивали на планшеты, покрытые фибронектином. Дальнейший пересев производили по достижении 70–80% конfluenceности.

Культивирование в ламинарном потоке

HCAEC и ECFC заселяли в планшеты μ -Luer (IBIDI, Германия) в концентрации 1 млн клеток/мл согласно инструкции производителя. Перед экспериментом клетки культивировали в планшетах в течение ночи для формирования монослоя. Затем планшеты промывали средой для удаления неадгезировавших клеток и подключали в перфузионную систему IBIDI. Параметры движения культуральной среды в перфузионной системе обеспечивали действие на клетки напряжения сдвига величиной 5 дин/см². Клетки культивировали в условиях непрерывного ламинарного потока в течение 2 суток.

В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в течение аналогичного срока в планшетах μ -Lug в статических условиях. Замену среды в контрольных планшетах производили дважды в день.

Иммунофлуоресцентный анализ

После завершения культивирования проводили иммунофлуоресцентное исследование. Клетки предварительно фиксировали 4% параформальдегидом. Для окрашивания внутриклеточно локализованных маркеров клетки пермеабилizировали обработкой 0,1% Тритоном X-100 (Sigma, США) в течение 15 мин. Далее образцы инкубировали с первичными антителами к CD31 (MA5-13188, Invitrogen, США), CD309/KDR (ab2349), коллагену IV типа (ab6586), CD144/VE-кадгерину (ab33168) в течение ночи при 4 °С, затем со вторичными антителами (антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с AlexaFluor488, A11034, Invitrogen; антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с AlexaFluor568, A-11031, Invitrogen) и конъюгированными с FITC антителами к фактору фон Виллебранда (ab6994) (все антитела производства Abscam, Великобритания, если не указано иное). В качестве контроля использовали образцы, обработанные 1% бычьим сывороточным альбумином, вместо первичных антител с сохранением общего протокола окрашивания. Также проводили окрашивание меченым с AlexaFluor-555 фаллоидином для выявления F-актина. Контрастирование ядер выполнено 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Sigma, США) в концентрации 10 мкг/мл.

Результаты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM-700 (Carl Zeiss, Германия). Количественный анализ полученных изображений проводили с помощью программы ImageJ. Для оценки плотности клеточной популяции считали количество ядер клеток в поле зрения, окрашенных красителем DAPI. Полученное значение пересчитывали на 1 мм² площади. Для иммунофлуоресцентно окрашенных образцов вычисляли среднюю интенсивность флуоресцентного сигнала или процент положительно окрашенной площади. При анализе F-актина вычисляли направление ориентации волокон.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США). Для оценки межгрупповых различий использовали two-way ANOVA, предварительно для определения возможности применения указанного анализа оценивали соответствие данных нормальному распределению (тест Колмогорова – Смирнова) и равенство дисперсий выборок (тест Брауна – Форсайта). Значения $p < 0,05$ признавали статистически значимыми.

Результаты

По результатам анализа количества клеток на единицу площади поверхности показано, что независимо от условий культивирования HCAEC и ECFC сохраняли конфлюэнтный слой (рис. 1). При этом наблюдали статистически значимые отличия плотности клеточной популяции между культурами HCAEC и ECFC, причем число HCAEC превышало количество ECFC в 1,8–2,5 раза ($p = 0,00001$). Значимых отличий внутри культуры между статическими и динамическими условиями культивирования не выявлено.

Далее изучены особенности реакции HCAEC и ECFC на воздействие напряжения сдвига в отношении фенотипа, секреторной активности и адгезии клеток к поверхности. Культуры HCAEC и ECFC экспрессировали эндотелиальные маркеры CD309/KDR и CD31 (рис. 2). Однако отмечены существенные различия в выраженности эндотелиального фенотипа и реакции клеток на действие потока. Так, культура HCAEC характеризовалась высоким значением экспрессии маркера CD309/KDR в статических условиях; под действием напряжения сдвига его экспрессия увеличивалась, что выразилось в усилении флуоресцентного сигнала в 1,2 раза. При этом в культуре ECFC экспрессия CD309/KDR в статических условиях была в 3 раза ниже, чем у HCAEC; напряжение сдвига также вызывало усиление сигнала в 1,4 раза. Все отличия статистически значимы ($p = 0,0001$).

При анализе экспрессии CD31 отмечали другие тенденции. Так, в отличие от CD309/KDR напряжение

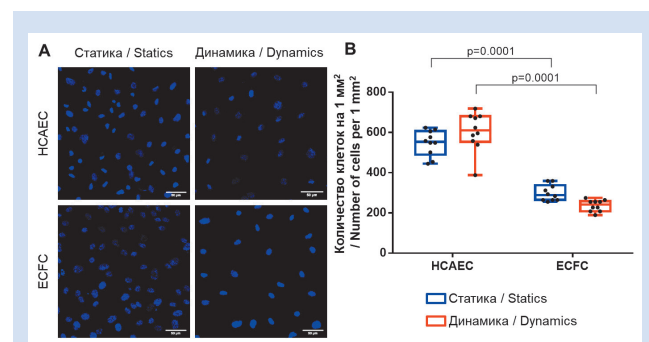


Рисунок 1. Оценка плотности культур HCAEC и ECFC в статических условиях (статика) и в условиях ламинарного потока под воздействием напряжения сдвига в 5 дин/см² (динамика): А – окраска ядерным красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), репрезентативные микрофотографии, увеличение $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм; В – количественный анализ плотности популяции. Каждая точка на графиках показывает результаты с одного поля зрения. **Примечание:** ECFC – колониеформирующие эндотелиальные клетки; HCAEC – эндотелиальные клетки коронарных артерий человека.

Figure 1. Density of HCAEC and ECFC cultures under static conditions (“Static”) and under laminar flow conditions, shear stress of 5 dyn/cm² (“Dynamics”). A – staining with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), representative micrographs, magnification $\times 200$, scale bar 50 μ m; B – quantitative analysis of population density, each dot represents a count from one image. **Note:** ECFC – endothelial colony-forming cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells.

сдвига снижало экспрессию данного маркера в культуре HCAEC (уменьшение интенсивности сигнала в 1,2 раза, $p = 0,0043$). В культуре ECFC экспрессия CD31 более выражена, интенсивность сигнала была выше в 1,5 раза ($p = 0,0001$). Как и в случае с CD309/KDR, в культуре ECFC наблюдали увеличение экспрессии CD31 под действием потока (увеличение сигнала в 1,1 раза, $p = 0,0001$).

При оценке окрашивания VE-кадгерина (CD144) продемонстрировано, что во всех случаях клетки формировали плотный слой с хорошо выраженными межклеточными контактами (рис. 3). Экспрессия маркера была более выражена в культуре ECFC (интенсивность сигнала выше в 1,5 раза, $p = 0,0001$). Культура HCAEC характеризовалась относительно невысоким уровнем секреции фактора фон Виллебранда, снижавшегося под воздействием потока ($p = 0,0001$). Напротив, в культуре ECFC уровень данного показателя был в 2,4 раза выше, но он также уменьшался в условиях действия напряжения сдвига ($p = 0,0001$).

Синтетическая активность клеток оценена по уровню продукции коллагена IV типа. Показано, что и HCAEC, и ECFC активно синтезировали коллаген, образывавший во всех культурах сплошное покрытие (рис. 4, A, B). Между HCAEC и ECFC не наблюдали количественных различий по уровню продукции коллагена, однако действие ламинарного потока значительно ($p = 0,0001$) увеличивало син-

тетическую активность в обеих культурах клеток. Не отмечено выраженного изменения морфологии («вытягивания») клеток под воздействием потока как у HCAEC, так и ECFC. Однако анализ F-актина продемонстрировал, что при культивировании клеток в условиях ламинарного потока их направление меняется – с уменьшением разброса и формированием преобладающей ориентации. Данная тенденция наблюдалась и у HCAEC, и у ECFC (рис. 4, C).

Обсуждение

Разработка технологии создания эндотелизированного сосудистого протеза ставит перед исследователями комплексные задачи, включающие как работы с каркасом протеза, так и его органической частью – выбор оптимального источника клеток для заселения протеза, определение режима культивирования, который будет обеспечивать наибольшую сохранность клеточного монослоя.

Необходимость использования проточного био-реактора на этом этапе практически не вызывает сомнений, поскольку обусловлена физиологическими особенностями эндотелиальных клеток. Известно, что имитация тока крови является необходимым фактором для поддержания нормальной жизнедеятельности эндотелия [10]. Помимо этого, поскольку в тканевой инженерии целесообразно использование незрелых прогениторных клеток с учетом их высокого пролиферативного потенциала,

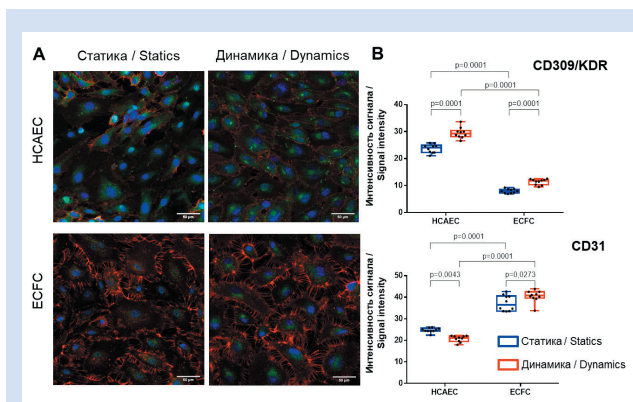


Рисунок 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание культур HCAEC и ECFC в статических условиях (статика) и в условиях ламинарного потока под воздействием напряжения сдвига в 5 дин/см² (динамика) на эндотелиальные маркеры CD309/KDR (зеленый цвет) и CD31 (красный цвет), ядра клеток окрашены DAPI: A – репрезентативные микрофотографии, увеличение $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм; B – количественный анализ. Каждая точка на графиках показывает результаты с одного поля зрения

Примечание: ECFC – колониеформирующие эндотелиальные клетки; HCAEC – эндотелиальные клетки коронарных артерий человека.

Figure 2. Immunofluorescent staining of CD309/KDR (green), CD31 (red) of HCAEC and ECFC cultures under static conditions (“Static”) and under laminar flow conditions, shear stress of 5 dyn/cm² (“Dynamics”). Cell nuclei are stained with DAPI. A – representative photomicrographs, magnification $\times 200$, scale bar 50 μm ; B – quantitative analysis. Each dot represents a count from one image

Note: ECFC – endothelial colony-forming cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells.

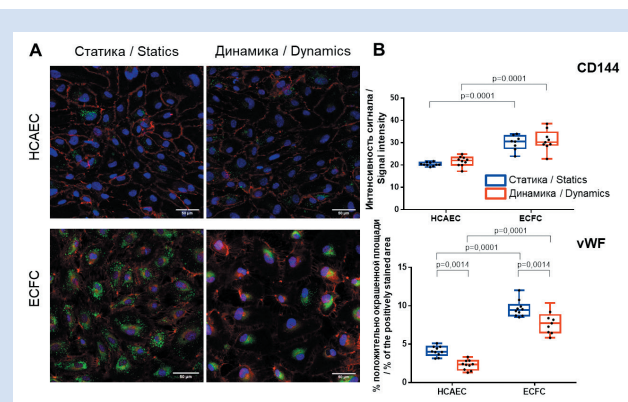


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание культур HCAEC и ECFC в статических условиях (статика) и в условиях ламинарного потока под воздействием напряжения сдвига в 5 дин/см² (динамика) на эндотелиальные маркеры vWF (зеленый цвет) и CD144 (красный цвет), ядра клеток окрашены DAPI: A – репрезентативные микрофотографии, увеличение $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм; B – количественный анализ. Каждая точка на графиках показывает результаты с одного поля зрения

Примечание: ECFC – колониеформирующие эндотелиальные клетки; HCAEC – эндотелиальные клетки коронарных артерий человека; vWF – фактор фон Виллебранда.

Figure 3. Immunofluorescent staining of vWF (green), CD144 (red) of HCAEC and ECFC cultures under static conditions (“Static”) and under laminar flow conditions, shear stress of 5 dyn/cm² (“Dynamics”). Cell nuclei are stained with DAPI. A – representative photomicrographs, magnification $\times 200$, scale bar 50 μm ; B – quantitative analysis. Each dot represents a count from one image

Note: ECFC – endothelial colony-forming cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells; vWF – von Willebrand factor.

воздействие напряжения сдвига важно для стимуляции созревания этих клеток [11].

Вместе с тем не существует единого представления об оптимальных параметрах ламинарного потока при формировании клеточнозаселенных тканеинженерных протезов. Известно, что физиологические значения напряжения сдвига, которым подвергаются эндотелиальные клетки, лежат в диапазоне 5–20 дин/см² [12], в том числе для эндотелиальных клеток коронарных артерий – 7–10 дин/см² [13]. Однако многие исследователи в эксперименте используют гораздо меньшие параметры [14, 15], чтобы избежать разрушения потоком несформированного эндотелиального слоя на поверхности протеза. Из этих соображений нами в эксперименте выбраны параметры потока, обеспечивающие действие на клетки напряжения сдвига величиной 5 дин/см², поскольку такие параметры позволяют успешно предкультивировать эндотелиальный слой на поверхности каркаса, не допуская его смывания.

При анализе плотности клеточной популяции определено значимо большее количество клеток на 1 мм² в культуре HCAEC по сравнению с ECFC. Тем не менее обе культуры формировали плотный монослой; выявленные различия объясняются разницей морфологии клеток, поскольку колониеформирующие клетки значительно крупнее HCAEC. Отсутствие в обеих культурах различий между статическим культивированием и культивированием в потоке демонстрирует устойчивость сформированного эндотелиального монослоя.

При анализе маркеров эндотелиального фенотипа отмечены выраженные различия между культурами. Так, особенностью колониеформирующих клеток стала значительно повышенная, по сравнению с HCAEC, экспрессия CD31 и CD144, пониженная – CD309/KDR. При этом воздействие напряжения сдвига на колониеформирующие клетки вызывало ожидаемую для эндотелиальных клеток реакцию в виде увеличения экспрессии CD31 и CD309/KDR. Это согласуется с результатами исследований, показывающими, что даже относительно невысокие значения напряжения сдвига стимулируют экспрессию специфических эндотелиальных маркеров и являются мощным стимулом эндотелиальной дифференцировки клеток [16, 17].

Стоит отметить, что действие потока на HCAEC выражалось в усилении экспрессии CD309/KDR, но уменьшении CD31. По-видимому, это связано с низким, для клеток коронарных артерий, значением напряжения сдвига. В ряде исследований показано, что напряжение сдвига ниже физиологических

значений ассоциировано с нарушением функционирования эндотелия [18].

Несмотря на то что, по литературным данным, напряжение сдвига стимулирует синтез эндотелиальными клетками фактора фон Виллебранда [19], в нашем эксперименте наблюдали его значимое уменьшение при культивировании HCAEC и ECFC в условиях ламинарного потока. Известно, что фактор фон Виллебранда является важным компонентом системы гемостаза, а роль напряжения сдвига заключается не только в стимулировании его выработки, но и изменении его конформации и доступности для ADAMTS-13-опосредованного расщепления на более мелкие формы [20]. С другой стороны, дефицит фактора фон Виллебранда ассоциирован с усилением ангиогенеза, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [21]. В совокупности это свидетельствует о необходимости применения более высоких значений напряжения

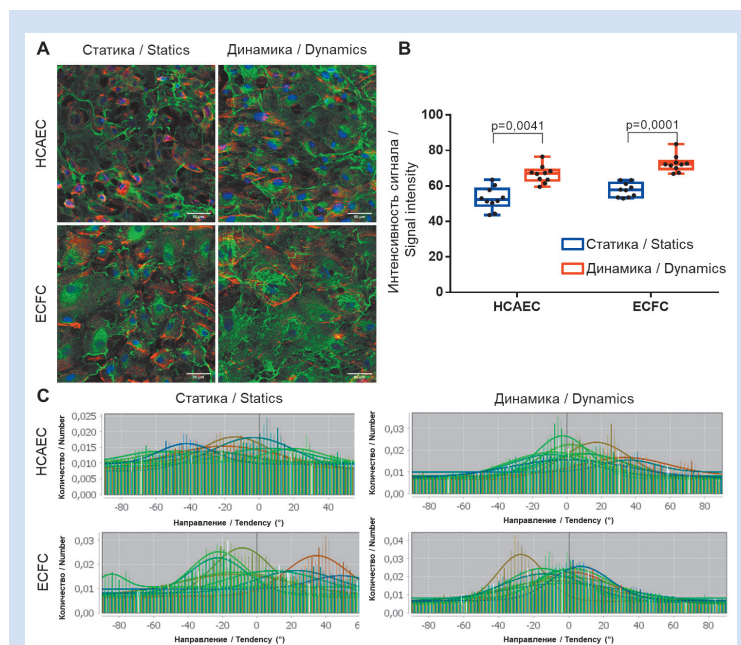


Рисунок 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание культур HCAEC и ECFC в статических условиях (статика) и в условиях ламинарного потока под воздействием напряжения сдвига в 5 дин/см² (динамика) на коллаген IV типа (зеленый цвет) и F-актин (красный цвет), ядра клеток окрашены DAPI: *A* – репрезентативные микрофотографии, увеличение $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм; *B* – количественный анализ синтеза коллагена. Каждая точка на графиках показывает результаты с одного поля зрения, аналогичного представленному на рисунке *A*; *C* – диаграммы, демонстрирующие преобладающую ориентацию волокон F-актина в поле зрения. Столбцы соответствуют частотам распределения ориентации волокон по направлениям, линии графика показывают преобладающее направление для каждого образца

Примечание: ECFC – колониеформирующие эндотелиальные клетки; HCAEC – эндотелиальные клетки коронарных артерий человека.

Figure 4. Immunofluorescent staining of type IV collagen (green) and F-actin (red) of HCAEC and ECFC cultures under static conditions (“Static”) and under laminar flow conditions, shear stress of 5 dyn/cm² (“Dynamics”). Cell nucleus are stained with DAPI. *A* – representative photomicrographs, magnification $\times 200$, scale bar 50 μ m; *B* – quantitative analysis of collagen synthesis. Each dot represents a count from one image. *C* – Orientation of F-actin fibers in the field of view. The columns correspond to the frequencies of the fiber orientation distribution by direction, the graph lines show the prevailing direction for each sample

Note: ECFC – endothelial colony-forming cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells.

сдвига на поздних этапах формирования тканеинженерного протеза сосуда для нормализации синтетической активности и адаптации к физиологическим параметрам.

Кроме того, исследована синтетическая активность клеток в отношении коллагена IV типа. Показано, что НСАЕС и ЕСФС не отличались по уровню выработки коллагена, а также демонстрировали одинаковую реакцию на действие напряжения сдвига, стимулировавшего его синтез. Поскольку коллаген IV типа выступает одним из основных компонентов базальной мембраны [22], образование в эксперименте его плотного покрытия может рассматриваться как благоприятный признак с точки зрения эндотелизации тканеинженерных протезов сосудов.

Специфической реакцией эндотелиальных клеток на действие напряжения сдвига является изменение формы и ориентации клеток. В нашем эксперименте морфологические отличия и характерное вытягивание вдоль потока жидкости были слабо выражены, что объясняется высокой плотностью клеточного слоя и низким значением стимула. Тем не менее зарегистрированы значительные цитоскелетные перестройки, в частности отражаемые ориентацией F-актина. Анализ ориентации волокон F-актина показал, что при культивировании в статических условиях клетки ориентированы хаотично. При культивировании в потоке наблюдалась преимущественная ориентация волокон F-актина по направлению потока, при этом эта тенденция была характерна для всех полей зрения. Подобная перестройка наблюдалась в культурах НСАЕС и ЕСФС.

Информация об авторах

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

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

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

Антонова Лариса Валерьевна, доктор медицинских наук заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Заключение

Можно заключить, что в условиях ламинарного потока ЕСФС демонстрируют характерный ответ на действие напряжения сдвига, заключающийся в изменении морфологии, фенотипа и секреторной активности клеток. Несмотря на некоторые особенности этой популяции, в целом изменения аналогичны тем, которые показали в эксперименте эндотелиальные клетки коронарных артерий. Таким образом, ЕСФС из периферической крови представляются перспективным материалом для использования в тканевой инженерии кровеносных сосудов.

Конфликт интересов

Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Ханова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.В. Антонова 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 пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Author Information Form

Velikanova Elena A., PhD, researcher at the Laboratory of Cellular Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Matveeva Vera G., PhD, senior researcher at the Laboratory of Cellular Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Khanova Mariam Yu., junior researcher at the Laboratory of Cellular Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8826-9244

Antonova Larisa V., PhD, Head of the Laboratory of Cellular Technologies, the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Вклад авторов в статью

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

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

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

АЛВ – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

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

MVG – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

ALV – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Melly L., Torregrossa G., Lee T., Jansens J., Puskas J. Fifty years of coronary artery bypass grafting. *J Thorac Dis.* 2018; 10(3): 1960–1967. doi:10.21037/jtd.2018.02.43
- Ong C.S., Zhou X., Huang C.Y., Fukunishi T., Zhang H., Hibino N. Tissue engineered vascular grafts: current state of the field. *Expert Rev Med Devices.* 2017; 14(5): 383–392. doi:10.1080/17434440.2017.1324293.
- Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016; 22(1): 68–100. doi:10.1089/ten.teb.2015.0100
- Sanchez P.F., Brey E.M., Briceno J.C. Endothelialization Mechanisms in Vascular Grafts. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018; 12: 2164–2178. doi:10.1002/term.2747
- Hasan A., Memic A., Annabi N., Hossain M., Paul A., Dokmeci M.R., Dehghani F., Khademhosseini A. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomater.* 2014; 10(1): 11–25. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.022.
- Dimitrievska S., Niklason L.E. Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018; 8(2): a025742. doi: 10.1101/cshperspect.a025742.
- Peters E.B. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018; 24(1): 1–24. doi:10.1089/ten.teb.2017.0127
- Matveeva V, Khanova M, Sardin E, Antonova L, Barbarash O. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(11): 3453. doi: 10.3390/ijms19113453
- Kolbe M., Dohle E., Katerla D., Kirkpatrick C.J., Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16(5): 877–886
- Fang Y., Wu D., Birukov K.G. Mechanosensing and Mechanoregulation of Endothelial Cell Functions. *Compr Physiol.* 2019; 9(2): 873–904. doi:10.1002/cphy.c180020
- Yamamoto K., Takahashi T., Asahara T., Ohura N., Sokabe T., Kamiya A., Ando J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J. Appl. Physiol.* 2003; 95(5): 2081–2088. doi:10.1152/jappphysiol.00232.2003
- Fisher A.B., Chien S., Barakat A.I., Nerem R.M. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2001; 281(3): L529–L533. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.3.L529.
- Roux E., Bougaran P., Dufourcq P., Couffinhal T. Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol.* 2020; 11: 861. doi:10.3389/fphys.2020.00861
- Liu H., Gong X., Jing X., Ding X., Yao Y., Huang Y., Fan Y. Shear stress with appropriate time-step and amplification enhances endothelial cell retention on vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11(11): 2965–2978. doi:10.1002/term.2196
- Melchiorri A.J., Bracaglia L.G., Kimerer L.K., Hibino N., Fisher J.P. In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016; 22(7): 663–70. doi: 10.1089/ten.tec.2015.0562
- Obi S., Masuda H., Shizuno T., Sato A., Yamamoto K., Ando J., Abe Y., Asahara T. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012; 303(6): C595–606. doi:10.1152/ajpcell.00133.2012
- Egorova A.D., DeRuiter M.C., De Boer H.C., Van De Pas S., Gittenberger-De Groot A.C., Van Zonneveld A.J., Poelmann R.E., Hierck B.P. Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 2012; 48(1): 21.
- Brown R.A., Shantsila E., Varma C., Lip G.Y. Current Understanding of Atherogenesis. *Am J Med.* 2017; 130(3): 268–282
- Choi S.J., Lillicrap D. A sticky proposition: The endothelial glycocalyx and von Willebrand factor. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(4): 781–785. doi:10.1111/jth.14743.
- Shim K., Anderson P.J., Tuley E.A., Wiswall E., Evan Sadler J. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. *Blood.* 2008; 111(2): 651–657. doi:10.1182/blood-2007-05-093021
- Starke R.D., Ferraro F., Paschalaki K.E., Dryden N.H., McKinnon T.A., Sutton R.E., Payne E.M., Haskard D.O., Hughes A.D., Cutler D.F., Laffan M.A., Randi A.M. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood.* 2011; 117(3): 1071–1080. doi: 10.1182 / blood-2010-01-264507
- Stratman A.N., Davis G.E. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: Influence on vascular tube remodeling, maturation and stabilization. *Microsc Microanal.* 2012; 18(1): 68–80. doi:10.1017/S1431927611012402

Для цитирования: Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Антонова Л.В. Влияние напряжения сдвига на свойства колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(4): 90–97. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97

To cite: Velikanova E.A., Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Antonova L.V. Effects of shear stress on the properties of colony-forming endothelial cells in comparison with coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(4): 90–97. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97