

**федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н.
Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Саая Шораан Биче-оолович

**Изготовление и изучение в эксперименте клеточно-заселенного
сосудистого протеза**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители:

д.м.н., профессор Карпенко А.А.

д.б.н., профессор Закиян С.М.

Новосибирск 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
---------------------------------	---

ВВЕДЕНИЕ.....	5
---------------	---

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ишемические заболевания периферических артерий	14
1.1.1 Эпидемиология заболеваний периферических артерий	14
1.1.2 Методы хирургического лечения	15
1.2 Создание протезов сосудов путем тканевой инженерии.....	18
1.2.1 Тканевая инженерия сосудов с использованием биологических каркасов	19
1.2.2 Тканевая инженерия сосудов с применением синтетических биоразлагаемых полимерных каркасов.....	23
1.3 Роль клеток для создания тканеинженерных сосудов.....	26
1.3.1 Получение и характеристика предшественника гематопозитических и кардиоваскулярных клеточных популяций	28
1.3.2 Получение и характеристика эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из гематопозитических и кардиоваскулярных предшественников.....	32
1.3.3 Применение эндотелиальных и гладкомышечных клеток в составе тканеинженерных сосудов.....	33

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение и характеристика популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда выходного отдела правого желудочка.....	38
2.2 Оценка функциональных свойств <i>in vitro</i> обогащенных культур кардиальных эксплантов.....	46

2.3 Оценка функциональных свойств эндотелиальных и гладкомышечных клеток на биологической модели <i>in vivo</i>	46
2.4 Заселение биологических и синтетических материалов эндотелиальными и гладкомышечными клетками кардиальных эксплантов человека и их характеристика	50
2.5 Оценка неэндотелизации и проходимости клеточно-наполненных тканеинженерных трансплантатов <i>in vivo</i>	51

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование полученных клеток <i>in vitro</i>	54
3.2 Оценка функциональных свойств обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток <i>in vivo</i>	65
3.3 Сравнительный анализ применения эндотелиальных и гладкомышечных клеток на синтетических и естественных материалах.....	72
3.4 Эксперимент <i>in vivo</i> : оценка био- и тромборезистентности тканеинженерных конструкций из ПКЛ с МПВС, апплицированных донорскими ЭК и ГМК в эксперименте на иммунодефицитных мышах.....	78

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВЫВОДЫ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БПВ – большая подкожная вена

БПШ - бедренно-подколенное шунтирование

ГМК – гладкомышечные клетки

ЗПА – заболевания периферических артерий

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КИК – критическая ишемия конечности

ЛПИ – лодыжечно-плечевой индекс

ЛСК – линейная скорость кровотока

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

МРТ – магнитно-резонансная томография

МПВС – малопроницаемый внутренний слой

ПКЛ – поликапролактон

ПЛГА – полилактид-ко-гликолид

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ПЭТ – полиэтилентерафталат

ПХ – перемежающаяся хромота

ТИС – тканеинженерные сосуды

СД – сахарный диабет

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ССХ – сердечно-сосудистая хирургия

УЗДГ - ультразвуковая доплерография

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ЧТА – чрезкожная транслюминальная ангиопластика

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются основными причинами инвалидизации и смертности населения во всем мире [1]. В основе поражения артериального русла лежит прогрессирующее сужение просвета артериальных сосудов, приводящее к выраженной артериальной недостаточности с развитием ишемии органов и тканей [2]. Консервативное лечение и генно-инженерная терапия ишемических заболеваний не всегда обеспечивают достаточное кровоснабжение, что может привести к дисфункции органов или тканей [3].

Современная сердечно-сосудистая хирургия направлена не только на получение хороших ближайших результатов (клинический эффект, уменьшение частоты тромбоза и инфекционных осложнений), но и на отдаленные показатели: уменьшение частоты рестеноза, увеличение сроков проходимости трансплантата. Для хирургического лечения стено-окклюзионных заболеваний артериальных сосудов нередко используются шунтирующие операции или операции протезирования кровеносного сосуда биологическими сосудами или синтетическими протезами [4-8].

Из биологических сосудов наиболее предпочтительными для использования являются аутологичные сосуды, такие как аутоартерии, аутовены [7]. Однако последние не всегда имеются в достаточном количестве у человека или могут быть не пригодны по медицинским показаниям. Основными недостатками известных аутооттрансплантатов являются их тромбоз или гиперплазия интимы анастомоза [9]. Протоколы децеллюляризации ксено- или аллографтов оказались неэффективны при обработке кровеносных сосудов малого калибра, так как они либо не полностью удаляют клетки из ткани, либо серьезно повреждают экстрацеллюлярный матрикс, из-за чего происходит их аневризматическая трансформация [6].

В отличие от аутологических сосудов, использование синтетических протезов, особенно при поражениях сосудов среднего и малого диаметра

(менее 6мм), показывают неудовлетворительные отдаленные результаты [7,8,10,11].

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

Предполагается, что заселение сосудистых материалов функциональными эндотелиальными и гладкомышечными клетками будет способствовать увеличению срока проходимости сосудистого просвета за счет способности данных клеток вырабатывать межклеточный матрикс. Последний снижает риск воспаления, тромбоза и иммунопатологических процессов.

Тканевая инженерия открывает огромные перспективы в сосудистой хирургии человека, благодаря возможности создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов [12,13]. К новым биоинженерным конструкциям предъявляется ряд требований, таких как биосовместимость, тромборезистентность, устойчивость к инфекциям, нулевая хирургическая порозность, оптимальные механические свойства: эластичность, гибкость, вазоактивность и долговечность. Источником сосудистых клеток могут быть моноклеарные клетки костного мозга, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, стволовые клетки, полученные из жировой ткани и эндотелиальные клетки пуповинной вены [14,15,16]. При дифференцировке эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток можно получить популяцию мультипотентных гематопоэтических и кардиоваскулярных клеток-предшественников, способных дифференцироваться в эндотелиальные и гладкомышечные клетки, составляющие основу сосуда. Ключевым аспектом в функционировании данных клеточных типов в составе сосуда является наработка клетками компонентов экстраклеточного матрикса (фибронектина, коллагена, эластина), что, в свою очередь, является необходимым условием для наиболее оптимальных биологических свойств сосудистого трансплантата [15,17,18,19]. В настоящее время надежные протоколы направленной дифференцировки

плюрипотентных клеток для потенциального применения в клинической практике ещё не разработаны.

Попытки заселения некоторых сосудистых материалов плюрипотентными стволовыми клетками *in vivo* оказались безуспешны, так как большая часть их смывалась током крови после имплантации в сосудистое русло животному [19]. Для фиксирования клеток, вероятно, необходима обработка внутренней поверхности графтов природными биополимерами (коллаген, эластин, фибронектин, гликозаминогликаны). Они образуют соединительнотканную основу сосуда из естественного внеклеточного матрикса и ростовых факторов, которые должны способствовать адгезии эндотелиальных и гладкомышечных клеток, их пролиферации и миграции.

В целом работы по оптимизации заселения трансплантатов сосудов сосудистыми клетками с использованием компонентов естественного матрикса сосудов являются очень перспективными и в дальнейшем позволят создавать персонализированные клеточно-наполненные протезы сосудов. Таким образом, представленная работа направлена на решение актуальных современных задач и является перспективным направлением инженерии сосудистых трансплантатов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

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

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

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Впервые разработан протокол получения эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда человека.

2. Разработана методика двухслойного заселения эндотелиальными и гладкомышечными клетками 3D матрицы, потенциально пригодной для протезирования сосудов.

3. Определен тип 3D матрицы, характеризующийся оптимальным заселением эндотелиальными и гладкомышечными клетками, сохраняющими функциональные свойства.

4. Проведена оценка неоэндотелизации и тромборезистентности полученных клеточно-заселенных 3D матриксов из ПКЛ с МПВС в биологической модели.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

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

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования демонстрируют возможности получения ЭК и ГМК из нового источника – миокарда человека. Синтетические 3D матриксы из ПКЛ с МПВС, содержащие функциональные ЭК и ГМК, позволяют рекомендовать их в клинических исследованиях в разработке персонализированных сосудистых трансплантатов.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

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

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Клетки, полученные ферментативным гидролизом коллагеназой из миокарда выходного отдела правого желудочка при помощи магнитного сортирования и культивирования в среде EGM, являются эндотелиальными, при культивировании в среде SmGM – гладкомышечными.
2. Полученные эндотелиальные клетки обладают функциональной активностью *in vitro* – образуют капилляроподобные структуры в матрикеле, метаболизируют ацетилированную форму липопротеидов низкой плотности, содержат в цитоплазме функциональные микровезикулы – тельца Вейбеля-Паладе.
3. Клетки, выделенные предложенным способом, обладают паракринным эффектом при изучении *in vivo* в моделях с ишемией конечности и составе матригельного абдоминального трансплантата.
4. Тканеинженерные конструкции из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем и с клеточным заселением при наблюдении *in vivo* способствуют формированию целостного эндотелиального монослоя с внутренней стороны и прорастают васкуляризированной фиброзной капсулой с наружной стороны.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

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

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

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

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

ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

3. **I. S. Zakharova, M. K. Zhiven, Sh. B. Saaya, A. I. Shevchenko, A. M. Smirnova, A. Strunov, A.A. Karpenko, E. A. Pokushalov, L. N. Ivanova, P. I. Makarevich, Y. V. Parfyonova, E. Aboian, S. M. Zakian.** Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic

potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts. *Journal of Translational Medicine* 2017 15:54 DOI: 10.1186/s12967-017-1156-1.

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

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

ДОСТОВЕРНОСТЬ ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Достаточное количество экспериментальных наблюдений, дизайн исследования, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к научному анализу с применением современных методов статистической обработки и программного компьютерного обеспечения свидетельствуют о высокой достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Выводы, представленные в настоящей работе, не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

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

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

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОБЛИТЕРИРУЮЩИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕРФЕРИЧЕСКИХ АРТЕРИЙ

1.1.1. Эпидемиология

Главным этиологическим фактором заболеваний артерий является атеросклероз. В меньшей степени поражать артериальную стенку могут и другие заболевания, такие как дегенеративные поражения артериального русла, фибромышечная дисплазия, системные васкулиты и заболевания соединительной ткани. Патогенез развития артериальной недостаточности нижних конечностей связан с прогрессирующим сужением просвета артерий, с развитием ишемии тканей конечности.

По данным некоторых авторов, в Америке заболеваниями периферических артерий (ЗПА) страдает от 8 до 10млн человек [20,21]. Однако точная распространенность остается окончательно неопределенной [22]. Это связано с тем, что клиническая перемежающаяся хромота (ПХ), являющаяся ранним симптомом облитерации сосудистого русла, выявляется не у всех больных с ЗПА. При проведении ряда популяционных исследований наличие окклюзии крупной артерии нижней конечности выявлено у трети асимптомных пациентов с ЗПА. При этом стоит отметить, что тяжелая ишемия конечности со значительным нарушением кровотока развивается у 8% асимптомных больных ежегодно [23,24].

Основными факторами риска развития и прогрессирования атеросклероза остаются курение, сахарный диабет, артериальная гипертензия и др. Установлена четкая связь между распространенностью ЗПА и увеличением возраста [25,26,27]. Например, в возрасте от 40 до 49 лет заболеваниями периферических артерий страдает 0.9% населения, от 50 до 59 лет – 2.5%, от 60 до 69 лет – 4.7%, более 69 лет – 14.5% [26].

С возрастным увеличением заболеваемости повышается одновременно и встречаемость ПХ. Так, у 40 летних больных она отмечается в 3% случаях, а у

69 летних – в 6% наблюдений. В первый год после диагностирования ПХ ухудшение отмечается у 7-9%, в последующие годы – у 2-3% больных, что, в основном, проявляется уменьшением дистанции безболевого ходьбы [28]. Крупные исследования показали, что лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) менее 0.5 требует сосудистой реконструкции и имеет высокий показатель ампутации у 2% больных [29,30]. Риск развития критической ишемии или потери конечности у больных с низким лодыжечным давлением (40-60 мм рт.ст.) составляет 8.5% ежегодно. Встречаемость критической ишемии нижних конечностей варьирует от 50 до 100 на каждые 100 тыс. населения в популяции Европейских стран и США. По данным Catalano распространенность КИК составила 45-65 случаев на 100 тыс. жителей [31].

Частота встречаемости острой ишемии нижних конечностей составляет 140 на миллион населения в год. При этом чаще всего встречаются случаи острой тромботической ишемии, которая развивается на фоне прогрессирующего стеноза артерии [32,33].

Несмотря на усовершенствование способов реваскуляризации, количество больших ампутаций остается высоким с крайне тяжелыми исходами. Периоперационная летальность достигает 10%. Риск смерти в течение 30 дней после больших ампутаций имеются у 4% - 30% больных и зависит от возраста оперируемого. К концу второго года после ампутации смертность достигает 30-50% [34,35], почти вдвое выше, чем у больных, которым удалось сохранить конечность [36]. Ампутации конечностей у пожилых пациентов отрицательно влияют на отдаленную выживаемость и качество жизни [37].

1.1.2. Методы хирургического лечения

Хирургическое лечение сосудистых заболеваний начало развиваться с начала XX века. При этом главной задачей сосудистой хирургии было восстановление магистрального артериального кровотока в пораженной конечности. Многочисленные опыты и усовершенствование сосудистого шва

позволили хирургам выполнять операции замены сосудов. Изначально в качестве материала для подобных операций использовали аутоартерии, аутовены и артериальные гомо- и ксенотрансплантаты. При этом проходимость аутоартерии и аутовены сохранялось у 80% оперируемых в течение 5 лет наблюдения, а функциональная состоятельность гомо- и ксенотрансплантатов наблюдалось только у 42% больных с критической ишемией. Ряд авторов отмечают, что проходимость аллографтов при критической ишемии нижних конечностей остается неудовлетворительной, но они могут использоваться с целью предотвращения больших ампутаций [6]. Позже начали использовать искусственные протезы, которые изготавливали из различных материалов (политетрафторэтилен (ПТФЭ), полиэтилентерефталат (ПЭТ, дакрон)) с различными конфигурациями. В аорто-подвздошной позиции эти протезы незаменимы, т.к. проходимость может сохраняться до 20 лет. При использовании ниже колена, где диаметр сосудов менее 6мм. результаты проходимости всех известных синтетических протезов остаются неудовлетворительными [10].

В настоящее время оптимальным пластическим материалом по-прежнему является аутовена. Ее проходимость при бедренно-берцовом шунтировании достигает 80% в течение 4 лет наблюдения с сохранением нижней конечности у 88% больных [4]. Пятилетняя проходимость шунтов с использованием аутовены составляет 60%, а синтетических трансплантатов – менее 35% [8]. Наложение анастомозов аутовены с плантарными артериями способствует сохранению конечности до 63% через 5 лет, с проходимостью 41% [5]. При этом разницы в проходимости реверсированной вены или вены *in situ* не отмечено.

Сравнение аутовены и ПТФЭ у 151 больного в рандомизированном исследовании показало преимущество первой. Пятилетняя первичная проходимость у аутовены была 75,6%, у ПТФЭ составляла 51,9% [38]. О преимуществах венозных шунтов также пишет Klinkert. После 2-х и 5-ти лет

проходимость венозных шунтов была 81% и 69%, у ПТФЭ – 67% и 49% [39]. Протезы из других материалов можно использовать при отсутствии БПВ [7].

При сравнении протезов из дакрона и ПТФЭ двухлетняя проходимость в рандомизированном исследовании составила 70% у дакрона, 57% – у ПТФЭ. Пятилетняя проходимость составила 49.2% и 38.4% соответственно [40]. Преимущество дакронных протезов над ПТФЭ было отмечено и в течение 10 лет [41,11]. При этом риск тромбоза протезов был выше у пациентов моложе 65 лет и при использовании протезов с диаметром менее 7мм [42].

В рандомизированном исследовании гепарин-содержащий дакрон (ПЭТ) и вена пуповины человека показали одинаковую проходимость – 58% после 5 лет [43]. По результатам исследований других авторов, проходимость пуповинной вены превосходит ПТФЭ, но хуже чем у БПВ [44].

Несмотря на бурное развитие эндоваскулярной хирургии за последние десятилетия, шунтирующие операции при пролонгированных стено-окклюзионных поражениях артерий бедренного, подколенного и берцового сегментов выполняются часто [45]. Эндоваскулярное лечение при заболевании периферических артерий не всегда безопаснее открытых операций [46]. Технический успех ЧТА артерий нижних конечностей и сохранение голени после ЧТА ограничены в отличие от шунтирующих операций, хотя клинический эффект у этих операций одинаковый [47]. При рандомизированном исследовании с 263 пациентами первичная проходимость в течение года после ЧТА составила 43%, а при шунтирующих операциях – 82% [48]. Статистически значимых различий в выживаемости, проходимости и сохранении конечностей в течение 4-х лет не было. Мета-анализ 4-х рандомизированных исследований, включавших 2817 пациентов, выявил преимущество открытых операций в долгосрочной перспективе по сравнению с эндоваскулярным лечением [49]. У пациентов с трофическими изменениями тканей нижних конечностей клинический успех открытых операций достигал 44,3%, эндоваскулярных операций – 37,0% [50]. Пятилетняя проходимость для ангиопластики составляет 45%, для венозных шунтов – 73%, и для ПТФЭ –

тканеинженерным сосудам (ТИС) являются имитация механических свойств сосудистой ткани, облегчение выработки внеклеточного матрикса, обеспечение интеграции и роста клеток в стенке протеза, ингибирование тромбогенности, уменьшение воспаления и развития неоинтимы [58,59,60]. Важной характеристикой искусственных каркасов является их замещение или обрастание внеклеточным матриксом, который, в свою очередь, может регулировать степень и силу адгезии клеток, активность роста, дифференцировку и созревание клеток с желаемым фенотипом [61,62,63].

1.2.1. Тканевая инженерия сосудов с использованием биологических каркасов

Биологические каркасы в настоящее время являются привлекательными для разработки тканеинженерных конструкций. Применяются такие материалы как коллаген, фибрин, децеллюляризованный каркас, каркас на основе искусственных клеточных листов [60]. Эти каркасы также могут совмещаться с синтетическими полимерами для улучшения механических свойств.

Полностью биологический тканеинженерный сосуд, состоящий из интимы, медиа и адвентиции, с использованием зрелых гладкомышечных, эндотелиальных клеток и фибробластов в бычьем коллагене впервые сконструировали Вайнберг и Белл в 1986 году [64]. О создании аналогичного сосуда с использованием ГМК, фибробластов и эндотелиальных клеток чуть позже сообщили L'Heureux и его коллеги в 1993 году [65]. Тем не менее, данные трансплантаты были непригодны для длительной имплантации в связи недостаточной прочностью. Matsuda и др. показали возможность имплантации в артериальную позицию и оценку таких конструкций после армирования дакроном в 1995г. Пройодимость этих протезов после имплантации в сонные артерии животным сохранялось в течение 26 недель. Авторы отметили важность сочетания эндотелиального и гладкомышечного слоев на

конструкции, т.к. повышалась целостность и стабильность неоинтимы, создавался приемлемый антитромботический потенциал после имплантации, ускорялись регенерация и ремоделирование неомедии и неоадвентиции в долгосрочном периоде [66].

Вазореактивность и механическая прочность фибрина оказались достаточными для венозных графтов [67, 60]. Кроме того, фибриновый каркас с дополнительными биоразлагаемыми полимерами, заселенный аутологичными эндотелиальными клетками, был успешно имплантирован в сонные артерии овец на 24 месяца [68].

Большая вероятность хронического воспаления, тромбоза и слабые механические свойства аллогенных, ксеногенных и синтетических сосудов уменьшает возможность их клинического применения [69]. В связи со слабым межклеточным взаимодействием, недостаточной выработкой и распределением межклеточного матрикса и наличием иммунного ответа на биологические каркасы в последнее время стала развиваться техника создания бескаркасных сосудов. В одном из таких методов сосуды изготавливались посредством использования только аутологичных клеток в расчете на способность их производить собственный внеклеточный матрикс [70]. Фибробласты и эндотелиальные клетки, полученные с помощью биопсии, культивировались на пластиковой подложке, затем отрывались от прилегающих слоев с сохранением межклеточного матрикса (эластин, коллаген). Из этих устойчивых клеточных листков образовывались трубчатые графты [71].

Первый кровеносный сосуд без каркаса был создан в 1998 году L'Heureux. Доклиническая его оценка была проведена на крысах и мышах в 2006 году [65,69,72]. В дальнейшем были проведены клинические исследования полученных данным способом трансплантатов, в том числе и в качестве артериовенозных шунтов для гемодиализа. Такие шунты, полученные при

использовании аллогенных фибробластов, были проходимы в течение 11 месяцев и не вызывали иммунного ответа [73].

Некоторые исследователи разработали технологию получения устойчивых клеточных листков с толщиной в одну клетку с возможностью наложения этих листков друг на друга без разрушения клеточных соединений [74,71]. При использовании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для изготовления тканеинженерного сосуда по этой технологии существенно улучшается эффективность заселения по сравнению с традиционным статическим методом (86,5% против 4,9%) [75].

Другая группа ученых сообщила о возможности создания сосудов малого диаметра без использования каркаса путем печатания сосудистой ткани и стимулирования в биореакторах [76]. Биопринтинг как один из перспективных методов создания сосудистых трансплантатов малого диаметра позволяет проектировать и производить биологические трубчатые ткани с различными формами и иерархией диаметра [77]. В качестве биоразлагаемых материалов для сосудистых трансплантатов малого диаметра также стали использовать натуральные белки, в том числе хитозан [78,79].

Естественным сосудистым каркасом могут выступать и децеллюляризованные ткани. Процесс децеллюляризации обычно осуществляют путем обработки тканей комбинацией детергентов и ингибиторов ферментов. В децеллюляризованной ткани отсутствуют клеточные компоненты и ДНК, однако каркас сосуда, состоящий из коллагена и эластина, остается нетронутым [80]. Это дает многочисленные преимущества в отношении механических свойств и биосовместимости.

Одним из широко изученных является децеллюляризованный каркас тонкого кишечника (small intestine submucosa) [81]. Такие трансплантаты малого диаметра показали высокую проходимость для кровеносных сосудов и имели механические свойства, подобные нормальным артериям при

имплантации в сонные и бедренные позиции собакам [82,83,84]. Работы с использованием таких трансплантатов ведутся до настоящего времени. Например, в недавней работе Maxwell T. и др. доложили об успешном применении SIS-трансплантатов с содержанием гепарина и фактора роста эндотелия (VEGF), имплантированных в сонные артерии овцам до 3-х месяцев. Исследователи выявили, что имплантированные ТИС имели хорошую проходимость, обеспечивали проникновение клеток-хозяев в стенку протеза. Мигрировавшие в стенку трансплантата ГМК обладали сократимостью в ответ на вазоконстрикторы. Через 3 месяца нахождения в позиции сонной артерии овец эндотелий был ориентирован по ходу кровотока, медиальный слой состоял из выровненных по окружности гладкомышечных клеток. В конструкции было достаточное количество коллагена и эластина, что обеспечивало механические свойства, сопоставимые с нативной артерией [85].

Kaushal и др. заселили эндотелиальными клетками-предшественниками децеллюляризованные подвздошные артерии свиней, с последующей имплантацией в сонные артерии овцам. Эти заселенные тканеинженерные конструкции были проходимы до 130 дней и были ремоделированы в неососуды. В то же время в контрольной группе в децеллюляризованных артериях без заселения клеток тромботические окклюзии развивались в течение 15 дней после имплантации [86]. Эти результаты показывают, что децеллюляризованные сосудистые графты предрасположены к преждевременному выходу из строя, если сначала их не заселять клетками или дополнительно не проводить клеточную модификацию. Кроме того, элементы внеклеточного матрикса подвергаются физическим и химическим воздействиям в процессе децеллюляризации, которые могут отрицательно повлиять на биомеханические свойства, с развитием дегенеративной недостаточности структуры трансплантата [87].

Quint и др. разработали уникальный метод создания децеллюляризованных артериальных трансплантатов малого диаметра с использованием биоразлагаемого полимера. Ими предложено культивировать на деградируемом каркасе из полигликолевой кислоты в биореакторе аллогенные гладкомышечные клетки аорты. Полученные сосуды затем децеллюляризовали и повторно заселяли полученную матрицу графта аутологичными эндотелиальными клетками (EC) и эндотелиальными клетками-предшественниками (EPCs). Данный сосуд функционировал так же, как и артериальные трансплантаты, и постепенно заселялся клетками хозяина *in vivo* в течение 4-х недель [88].

Несмотря на некоторые преимущества тканеинженерных сосудов с использованием биологических материалов, главным недостатком остается недостаточно прочные механические свойства, которые улучшаются путем армирования или добавления синтетических полимеров. Основным недостатком децеллюляризованных материалов является невозможность изменения структуры внеклеточного матрикса, вариабельность донорских источников и риск передачи вируса от животных тканей.

1.2.2. Тканевая инженерия сосудов с применением синтетических биоразлагаемых каркасов

Роль каркаса заключается в обеспечении временной трехмерной структуры для клеточной адгезии, инфильтрации и пролиферации. Материалы должны обладать достаточной пористостью для обеспечения клеточной инфильтрации, стимулировать образование неотканей и обеспечивать интеграцию с тканью реципиента [89]. Тканеинженерные сосуды должны выдерживать артериальное давление, должны быть прочными, долговечными и биосовместимыми, чтобы не вызывать иммунный ответ [90].

Применяются разные виды биоразлагаемых полимеров для разработки биомиметических каркасов кровеносных сосудов [91]. Например, полиэстеры, такие как Poly(ϵ -caprolacton)(PCL), poly (lactic acid)(PLA), Poly(glycolic

acid)(PGA) и их различные комбинации. Они имеют ряд положительных свойств: биodeградируемость, биосовместимость, простота производства, контролируемость механических и морфологических свойств. Адекватная скорость деградации создает условия для роста клеток. Однако есть и некоторые недостатки: продукты распада кислот вызывают воспалительные реакции, быстрая деградация может привести к потере структурной целостности.

Также биodeградируемыми являются и некоторые эластомеры, такие как Polyurethane (PU), Poly(D,L-actide) (PDLLA), Poly(glycerol sebacate) (PGS). Данные эластомеры обладают хорошей эластичностью, но также могут вызывать локальные воспалительные реакции.

Формирование микрососудов в тканеинженерных конструкциях зависит от нескольких факторов: биохимической среды, типа внеклеточного матрикса, микро-архитектуры, материала каркаса и механических сигналов [92,93]. Полимеры, используемые для изготовления каркасов, разлагаются путем гидролитического расщепления. Темп деградации полимеров зависит от исходной молекулярной массы, площади открытой поверхности и кристалличности. Важным шагом в разработке тканеинженерных сосудов является выбор соответствующего материала для каркаса, с учетом биосовместимости, механических свойств и скорости биоразлагаемости.

В настоящее время проведено много исследований с применением биodeградируемых полимеров *in vitro*, в животных моделях и клинической практике. Оценены токсичность, воспалительные реакции, биodeградируемость и иммунный ответ [94]. Они обладают гидрофобными свойствами и, следовательно, сохраняются в течение длительного периода в организме.

Комбинируя эти материалы с дополнительными синтетическими полимерами для создания кополимеров, например, такими как Poly (lactide - co-ε-капролактона) (PLCL) позволяет тонко настраивать механические

свойства и время деградации посредством контроля состава и соотношения молекулярной массы. При имплантации в нижнюю полую вену собаке кополимера, состоящего из 3-х слоев: 1) polyglycolide (PGA), 2) L-lactide and ϵ -caprolactone copolymer (P(LA/CL)) 3) glycolide ϵ -caprolactone copolymer (P(GA/CL)), через 24 месяца авторы отмечают его замещение тканью, по свойствам похожей на стенку нативной нижней полую вены [147]. Аналогичные результаты замещения биоразлагаемого протеза (PGA-P(CL/LA)) в нижней полую вену мыши в течение 24 недель зафиксировали другие исследователи. Стоит отметить, что данные протезы дополнительно были заселены мононуклеарными клетками костного мозга до имплантации [95].

Некоторые тканеинженерные протезы были оценены в артериях малого диаметра, т.е. в условиях высокого давления *in vivo* [96]. Протез из ПКЛ диаметром 4 мм, имплантированный в сонную артерию свиней, быстрее покрывался эндотелием и прорастал клетками, в отличие от ПТФЭ [97]. Медленная деградация полимеров трансплантата позволяет выдерживать высокие давления в течение длительного времени, сохраняя его механические свойства, однако это может приводить к задержке ремоделирования ткани.

Одной из распространенных технологий получения каркасов сосудов для тканевой инженерии является электроспиннинг. Нановолокна, полученные при помощи данной технологии, укладываются в трехмерную структуру, которая достаточно быстро инфильтруется клетками и покрывается эндотелием [98]. Электроспиннинг протезов малого диаметра с помощью биоразлагаемых полимеров, в том числе ПКЛ [99] и ПЛГА [100] показали хорошие хирургические и механические свойства с большой частотой проходимости после имплантации в артериальной модели. Кроме того, электроспиннинговые нановолокна обладают потенциалом инкапсуляции и контролируемого высвобождения лекарств, которые могут позволять производить бесклеточные тканеинженерные конструкции [100,101].

Многочисленные исследования позволили сформулировать следующие требования для тканеинженерных сосудов. Тканеинженерные сосуды должны отвечать следующим требованиям:

1. обладать низкой частотой инфекционных осложнений
2. не вызывать иммунный ответ
3. обеспечивать долгосрочную проходимость, сопоставимую с аутовенозным кондуитом
4. выдерживать быструю деградацию
5. обеспечивать достаточную прочность шва при имплантации
6. иметь антитромбогенную внутреннюю поверхность
7. обеспечивать пористость для миграции и заселения клетками, но препятствовать потере жидкой части крови
8. обеспечивать долговечность и механическую прочность
9. обладать достаточной экономической эффективностью и доступностью для использования.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали то, что биоразлагаемые полимеры удовлетворяют вышеуказанным требованиям и могут быть использованы в качестве каркаса артериальных тканеинженерных сосудистых протезов.

1.3. РОЛЬ СОСУДИСТЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДОВ

Помимо разработки синтетического сосудистого каркаса второй главной задачей, по нашему мнению, является их клеточное наполнение. Предварительное клеточное наполнение тканеинженерной конструкции ускоряет время тканевой регенерации сосудистого трансплантата в заданном направлении.

В сосудистой тканевой инженерии использовались разные типы полипотентных клеток. По литературным данным, наряду с положительными свойствами эти клетки имеют также ряд недостатков. Например,

мезенхимальные стволовые клетки имеют положительные свойства, такие как мощность самообновления, долгосрочная жизнеспособность и мультипотентность. Недостатками являются малое количество, долгий рост и осложнения, связанные с забором. Стволовые клетки, полученные из жировой ткани, имеют лучший мультидифференциальный потенциал, простоту при заборе, огромное количество и практичность, быстрый рост *in vitro*. Их мультипотентность не зависит от возраста донора, они секретируют ангиогенные факторы. Однако эти клетки восприимчивы к апоптозу, во время изоляции и для их пролиферации требуются факторы роста. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) ограничивают этические проблемы. В связи с этим перспективно использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые обладают свойствами эмбриональных стволовых клеток, но они, как и ЭСК, могут вызывать тератому. Мононуклеарные клетки костного мозга просты в получении, их аспирация является менее инвазивной и связана с низкой частотой осложнений со стороны донора. Однако эти клетки могут вызывать кальциноз и тромбоз трансплантата.

1.3.1. Получение и характеристика предшественника гематopoэтических и кардиоваскулярных клеточных популяций

В эмбриональном развитии эндотелиальные и гематopoэтические клетки формируются из общего мультипотентного предшественника – гемангиобласта, имеющего мезодермальное происхождение. Такие выводы были сделаны в первой половине 20-го века на основании исследований развития куриного эмбриона и позже подтверждены в работах по изучению эмбрионального развития мыши и человека. Начиная с 90-х годов 20 века значительный интерес в отношении потенциального терапевтического использования привлекли работы, посвященные так называемым эндотелиальным предшественникам. В 1997 году Asahara с соавторами впервые показал, что две популяции мононуклеарных клеток, выделенных из

периферической крови человека с помощью магнитного сортирования антителами к маркерам CD34 и VEGFR2 (рецептор к фактору роста эндотелия), способны дифференцироваться *in vitro* в эндотелиальные клетки [102].

Кроме того, в данной работе была показана способность данных клеток участвовать в неоваскуляризации *in vivo*. Для этого на экспериментальных животных была моделирована ишемия задней конечности. Животным вводились клетки, меченные флуоресцентным красителем. Спустя 4 недели на гистологических срезах в области неоваскуляризации ишемизированных зон детектировали меченные человеческие клетки, экспрессирующие эндотелиальный маркер CD31 и метаболизирующие изолектин В4 – лектин из *Bandeiraea simplicifolia*, селективно окрашивающий эндотелиальные клетки. В 2000 году CD34+ эндотелиальный предшественник был выделен из мононуклеарной фракции пуповинной крови человека. При культивировании *in vitro* была показана способность данных предшественников к формированию эндотелиальных клеток и участие их в реваскуляризации ишемизированной конечности модельных животных. Совокупность этих данных позволила авторам заключить, что циркулирующая в периферической крови CD34+VEGFR2+ популяция мононуклеарных клеток может считаться эндотелиальным предшественником (EPC) (Asahara et al., 1997). Однако дальнейшие исследования поставили под сомнение это предположение. В дальнейшем было отмечено, что VEGFR2 экспрессируется не только в гематопозитических стволовых клетках, но и в зрелых эндотелиальных клетках [103]. Таким образом, популяция CD34+VEGFR2+ клеток может представлять не все существующие эндотелиальные предшественники.

В ряде работ дополнительным маркером эндотелиального предшественника считают CD133, который никогда не экспрессируется в зрелых эндотелиоцитах (Gehling et al., 2000), однако, по другим данным, это не следует считать корректным, т.к. данный маркер обнаруживается в более незрелой популяции, чем CD34. Кроме того, в силу низкой способности к

инкорпорации в реваскуляризирующуюся ишемизированную область обсуждается паракринный эффект EPC, выделенных из крови и костного мозга. В пользу этого предположения свидетельствует способность данных клеток секретировать стимулирующие ангиогенез ростовые факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор стромальных клеток-1 SDF-1, инсулин-подобный фактор роста (IGF-1), фактор роста гепатоцитов (HGF). Таким образом, характеристика эндотелиальных предшественников в периферической крови на сегодняшний день не определена. Однако для потенциальных терапевтических целей данный источник имеет количественные ограничения и ограниченный потенциал пролиферации. Поэтому альтернативным источником васкулярных клеток являются ЭСК и ИПСК, дифференцированные в соответствующем направлении.

В работах группы японских авторов показано, что при дифференцировке ЭСК и ИПСК мыши и человека выявляется мультипотентный предшественник, экспрессирующий на своей поверхности рецептор к VEGF (VEGFR2) (также называемый Flk1 у мыши) – маркер самых раннедифференцированных эндотелиальных, гематopoэтических клеток и клеток латеральной части мезодермы. Показано, что при дифференцировке ЭСК и ИПСК мыши VEGF-R2+ предшественник способен давать васкулярные клетки (эндотелиальные разных типов и муральные – перициты и клетки гладкой мускулатуры сосудов), а также кардиомиоциты [104]. При дифференцировке ЭСК мыши данный предшественник дает также гематopoэтические клетки [105]. По существующим в настоящее время протоколам, VEGFR2+ клетки мыши получают посредством дифференцировки из ЭСК и ИПСК в монослое на поверхности, покрытой коллагеном 4 типа в среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, с последующей сортировкой с помощью проточной цитофлуориметрии. При этом VEGFR2+ клетки составляют 39% от общей дифференцирующейся популяции. Дальнейшее культивирование отсортированных клеток в тех же

условиях приводит тому, что 95% популяции позитивны по альфа-актину гладких мышц, т.е. клетки коммитируются в муральном направлении. Выращивание отсортированных VEGFR2+ клеток в среде, содержащей фактор роста эндотелия VEGF-165, коммитирует популяцию в эндотелиальном направлении. В результате экспрессируются маркеры CD34, CD31, VE-cadherin, endoglin, клетки метаболизируют ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL). Кардиомиоциты получают путем сокультивирования ЭСК и ИПСК мышцы с фидерными клетками линии OP9 (линия стромальных клеток костного мозга мышей). Для оценки дифференцировочного потенциала *in vivo* авторы вводили LacZ-экспрессирующие VEGF-R2+ клетки мышцы в сердце развивающегося эмбриона курицы и показали, что они обнаруживаются в виде сосудистых структур в областях головы, сердца, желточного мешка и межсомитных отделах (Yamashita et al., 2000). Кроме того, LacZ-экспрессирующие клетки окрашиваются позитивно на эндотелиальный маркер CD31 и муральный – aSMA.

Таким образом, VEGFR2 клетки, полученные при дифференцировке ЭСК и ИПСК мышцы, дифференцируются в кардиоваскулярные и гематопозитические клетки, являются мультипотентными предшественниками, в том числе позиционируются как васкулярные предшественники.

В работах некоторых авторов показано, что при дифференцировке ЭСК и ИПСК человека, как и мыши, выявляется мультипотентный васкулярный предшественник VEGF-R2+, способный дифференцироваться в эндотелиальном и муральном направлениях [106,107]. Однако человеческие ЭСК и ИПСК, в отличие от мышинных, в плюрипотентном состоянии уже экспрессируют VEGFR2, который утрачивается не сразу в процессе дифференцировки, в то время как маркер плюрипотентных клеток человека – поверхностный антиген TRA1-60 утрачивается быстрее. Уровень VEGFR2+ клеток в недифференцированных ПСК человека варьирует в зависимости от

линии. Обнаруженная VEGFR2-позитивная TRA1-60-негативная популяция при дифференцировке способна давать функциональные эндотелиальные и муральные клетки, имеющие характерные маркеры (рисунок 1).

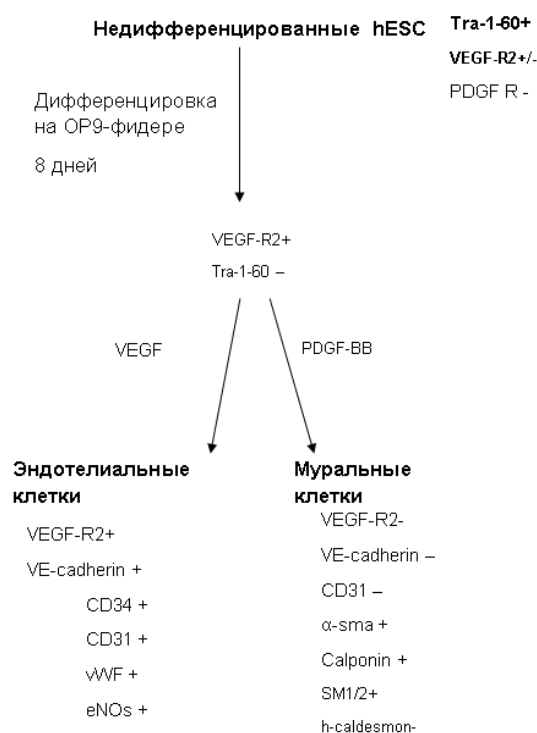


Рисунок 1- Схема васкулярной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток человека

При этом для дифференцировки человеческих ПСК, как и мышиных, используется система монослоя. Но, по имеющимся в настоящий момент протоколам, для получения VEGFR2+ васкулярного предшественника человеческие ПСК дифференцируют сначала при сокультивировании с мышиным OP9-фидером, после чего сортируют популяцию VEGF-R2+ TRA1-60- с помощью проточной цитофлуороиметрии, отсортированные клетки далее выращивают на поверхности, покрытой коллагеном 4 типа. В экспериментальном тесте *in vivo* для проверки функционирования дифференцированных из васкулярных предшественников эндотелиальных и гладкомышечных клеток человека данные два типа клеток были введены интраартериально в ишемизированную зону задней конечности иммунодефицитных мышей (Sone et al., 2007; Taura et al., 2009). При этом впервые показана способность эндотелиальных и муральных клеток в данном

тесте встраиваться в стенки сосудов организма-хозяина. Кроме того, совместное введение данных типов клеток демонстрирует повышенную степень восстановления ишемизированной области (Yamahara et al., 2009).

Таким образом, VEGFR2-позитивный мультипотентный предшественник васкулярных клеток обнаруживается при дифференцировке ЭСК и ИПСК человека и мыши. Он способен дифференцироваться в клетки кардиоваскулярного и гематопоезического рядов, а также в настоящее время он позиционируется как васкулярный предшественник, имеющий перспективы в сосудистой терапии.

1.3.2. Получение и характеристика эндотелиальных и гладкомышечных клеточных популяций из гематопоезических и кардиоваскулярных предшественников

Для построения тканеинженерных сосудистых конструкций широко используются зрелые эндотелиальные и гладкомышечные клеточные популяции [108]. Но, как выяснилось, специализированные клеточные типы обладают низкой пролиферативной способностью и нарушением свойств фенотипа. На сегодняшний день альтернативным клеточным источником являются эндотелиальные и муральные производные предшественника гематопоезических и кардиоваскулярных клеточных популяций (TRA-1-60 – и VEGF-R2+ клетки) [109]. TRA-1-60 – и VEGF-R2+ популяцию клеток можно эффективно дифференцировать в эндотелиальном и муральном направлениях с появлением характерных маркеров VE-cadherin+ и α – sma + соответственно [110]. Дифференцировку проводят на поверхностях, обработанных коллагеном четвертого типа. Также используют ростовые среды на основе сыворотки с добавлением факторов роста (VEGF для получения эндотелиальных клеток и PDGF-BB – для муральных клеток).

Для оценки регенеративного потенциала производных предшественников было предложено иммунодефицитным мышам вводить клеточные популяции внутриартериально в ишемизированные задние конечности. В результате наблюдали восстановление тканей и кровообращения в местах ишемии. Было отмечено, что производные гематопоетических и кардиоваскулярных предшественников эффективнее восстанавливают кровообращение, чем васкулярные предшественники из периферической и пуповинной крови человека. Показано, что эндотелиальные производные VEGFR2-положительных и TRA-1-60-отрицательных клеток-предшественников встраиваются прямо в стенку сосуда, чего не наблюдается при использовании клеток из периферической и пуповинной крови. Взаимодействие между эндотелиальными и гладкомышечными производными имеет важное значение. Показано, что наиболее эффективная регенерация сосудистой стенки происходит при сочетании эндотелиальных и гладкомышечных производных, где наблюдается образование артериол, позитивных по маркеру α SMA человека. Совокупность фактов свидетельствует о том, что эндотелиальные и гладкомышечные производные, полученные при дифференцировке ПСК человека, могут быть использованы в качестве нового терапевтического источника клеток для регенеративных заболеваний кровеносной системы. Но для реализации терапевтического применения необходимо разработать эффективные методы получения эндотелиальных и муральных клеточных популяций.

1.3.3. Применение эндотелиальных и гладкомышечных клеток в составе тканеинженерных сосудов

Кровеносные сосуды образуют замкнутую систему, которая осуществляет газообмен, транспорт питательных веществ и продуктов метаболизма [111]. Их стенка состоит из монослоя эндотелиальных клеток, которые располагаются на контактирующей с кровью поверхности сосуда [112]. Клетки гладкой мускулатуры окружают эндотелиальный слой и отвечают за

сужение и расширение просвета сосуда, его гомеостаз, поддержание механической прочности, а также участвуют в восстановлении после повреждения [113]. Фибробласты формируют наружный слой. Ранее было доказано, что клетки кровеносных сосудов выполняют различные функции в отношении сердечно-сосудистой физиологии.

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки играют важную роль в регенерации, реконструкции и поддержания целостности кровеносных сосудов после травмы. В недавнем обзоре Chen и др. [114,115] отмечают, что стволовые клетки кровеносных сосудов могут использоваться в качестве источников для регенерации тканей [60,114,116]. Создание тканеинженерных кровеносных сосудов требует включения гладкомышечных и эндотелиальных клеток в трубчатый каркас с микроархитектурой, как у нативного кровеносного сосуда [117] [138].

Источником данных клеток могут быть ЭСК, ИПСК и др. Некоторые стратегии тканевой инженерии направлены на решение биологических недостатков контактирующей с кровью поверхности синтетических каркасов, т.е. на заселение сосудистыми клетками и создание структуры биологически активных полимеров для возможной регенерации *in situ*. Эндотелиальные и гладкомышечные клетки являются основными компонентами интимы и меди кровеносных сосудов и имеют решающее значение для восстановления сосуда и ремоделирования трансплантата с успешным формированием неотканей.

Эндотелиальные клетки вырабатывают множество активных веществ, таких как оксид азота, фибронектин, сульфат гепарина, интерлейкина-1, тканевой активатор плазминогена и различные ростовые факторы, чтобы поддерживать тонус сосудов, его структуру и обеспечивать тромборезистентность [118].

Отсутствие эндотелиальных клеток на поверхности просвета искусственных трансплантатов способствует преждевременному тромбообразованию и пролиферации интимы. Предварительное заселение

синтетических трансплантатов эндотелиальными клетками (ЭК), возможно, уменьшит эти проблемы. В 1978 году Herring и др. были одними из первых, кто заселил сосудистый трансплантат эндотелиальными клетками. Эндотелиальные клетки собирали из венозной стенки путем соскоба поверхности просвета, а затем заселяли на биологически устойчивый протезный материал, который инкубировали до имплантации в брюшную аорту собакам. Наличие ЭК на поверхности просвета сосудистого трансплантата значительно повышало его тромборезистентность и предотвращало развитие гиперплазии неоинтимы за счет способности клеток выделять биологически активные вещества, ответственные за миграцию гладкомышечных клеток, пролиферацию и выработку межклеточного матрикса [119]. В одном клиническом исследовании имплантация заселенных эндотелиальными клетками 153 ПТФЭ протезов в бедренно-подколенном сегменте показала проходимость 62,8% через 7 лет [120].

О возможности применения ГИС в педиатрической практике доложили N. Hibino и др. в 2010 году. Аутологичные моноклеарные клетки, полученные из костного мозга, высевали на биоразлагаемый каркас, состоящий из полигликолевой кислоты и ϵ -капролактона/л-лактида и имплантировали как каво-пульмонарный шунт у пациентов с одним желудочком. Были прооперированы 25 пациентов со средним возрастом 5.5 лет. Средний период наблюдения 5.8 лет. Не было никаких доказательств аневризмы, разрыва имплантата, инфекции, трансплантата и кальцификации. У одного пациента был частичный пристеночный тромбоз, который был успешно пролечен с варфарином. У четырех пациентов был стеноз трансплантата, который успешно ликвидировали путем чрескожной баллонной ангиопластики [121]. Несмотря на то, что заселение протезов клетками является сложной и дорогостоящей задачей, результаты исследований подчеркивают желательность эндотелиального слоя в сосудистых протезах.

Сегодня признано, что гладкомышечные клетки являются неотъемлемой составляющей тромборезистентного кровеносного сосуда. Механические свойства сосудов определяют гладкомышечные клетки, являющиеся основным источником комплексного внеклеточного матрикса [122,123]. Кроме того, гладкомышечные клетки сосудов не только играют важную роль в физиологических функциях кровеносных сосудов, но и в их ремоделировании при патологических состояниях [60]. Yue и др. заселяли культивированные гладкомышечные клетки в биоразлагаемый каркас с последующей имплантацией полученного трансплантата в аорту крысам. Имплантированные конструкции продемонстрировали быстрое образование новых тканей по сравнению с контрольной группой [124]. Другие ученые культивировали заселенный гладкомышечными клетками каркас в пробирке с радиальной пульсацией среды в течение 8 недель [125]. Эти трансплантаты продемонстрировали физиологические и механические функции, сопоставимые с нативными человеческими сосудами, и рассматриваются в качестве кандидатов для клинического исследования [126].

Таким образом, функциональный гладкомышечный и эндотелиальный слой обеспечивает необходимое условие для успешного создания тканеинженерных кровеносных сосудов.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Для выполнения поставленной цели и задач разработали следующий план эксперимента (рисунок 2):

- 1) Получение клеточных популяций, обладающих функциональными свойствами эндотелиальных и гладкомышечных клеток
- 2) Обогащение и магнитный сортировка клеточных популяций
- 3) Оценка функциональных свойств полученных эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vitro* и *in vivo*
- 4) Оценка фиксации клеток на различных сосудистых протезах *in vitro*
- 5) Оценка функциональных свойств тканеинженерной полимерной клеточной конструкции в эксперименте

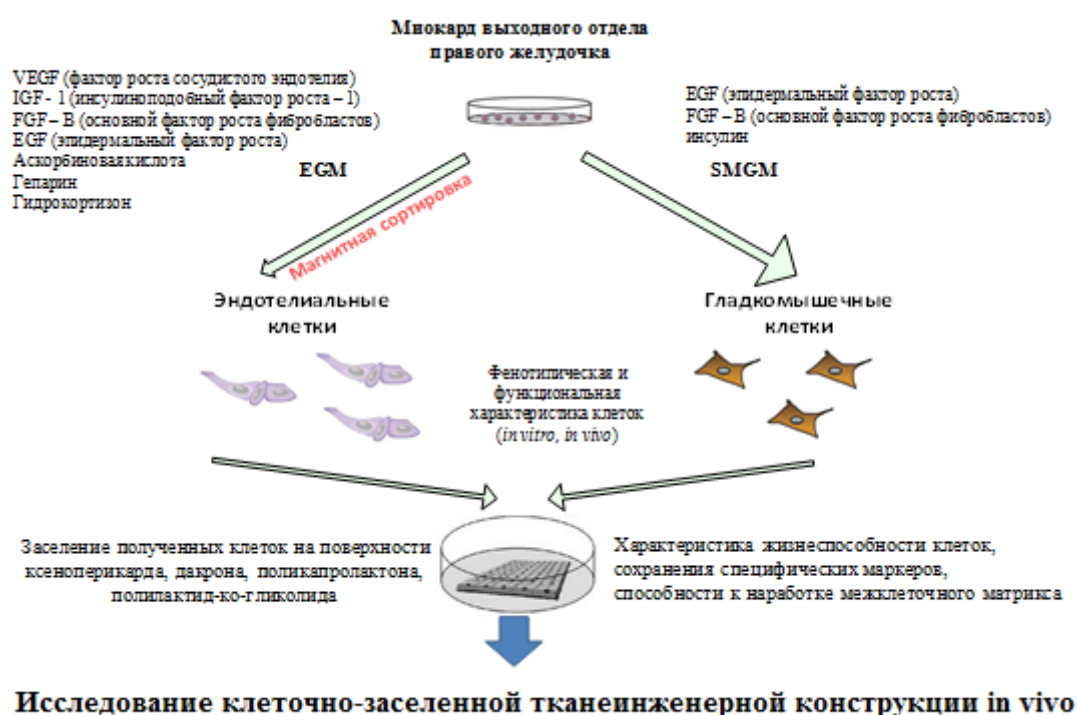


Рисунок 2. План эксперимента

Объект исследования

Объекты исследования: эндотелиальные и гладкомышечные клетки, полученные из кардиальных эксплантов человека, заплата из поликапролактона, заселенная эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Для исключения реакции отторжения трансплантата в экспериментах *in vivo* использовались самки гомозиготных иммунодефицитных мышей SCID и NUDE в возрасте 7-8 недель. Масса тела животных 23 ± 4 г. Мыши NUDE приобретались в питомнике лабораторных животных «Пушино», содержались в виварии конвенциональных животных ИЦиГ СО РАН, мыши SCID – в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН.

2.1 Получение и характеристика популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда выходного отдела правого желудочка

Ранее в работе наших коллег были детально охарактеризованы клетки послеоперационного миокардиального экспланта – материала ушка правого предсердия [127]. В связи с этим мы предположили, что получение сосудистых клеток возможно из других участков сердца. В данной работе был впервые разработан способ получения и обогащения популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток из послеоперационного материала – миокарда выходного отдела правого желудочка, удаляемого при инфундибулоэктомиях.

2.1.1 Выделение клеток из послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека

Культуры клеток кардиальных эксплантов человека получали из миокарда выходного отдела правого желудочка (приблизительно 5 мм^3) - послеоперационного материала, полученного ФГБУ «ННИИ ПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава РФ. Полученные фрагменты сердца измельчали

механически до кусочков размером 1 – 3 мм³ и проводили их ферментативный гидролиз в растворе 0,1% коллагеназы NB (Life Technologies) (3 раза по 10 мин при 37 °С). Полученные клетки совместно с оставшимися фрагментами ткани высаживали на пластик, обработанный желатином, в культуральной среде СЕМ (IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO), содержащий 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, Logan, UT), 100 ед./мл пенициллина (GIBCO), 100 ед./мл стрептомицина (GIBCO), 2 ммоль/л L-глутамин (Invitrogen), 0,1 ммоль/л 2-меркаптоэтанола (GIBCO)) или на пластик, обработанный человеческим коллагеном 4 типа (Sigma), в культуральных средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных (EGM-2) или гладкомышечных клеток (SmGM-2) фирмы Lonza. Обработка коллагеном 4 типа производилась, согласно протоколу производителя, в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей отмывкой PBS. Через 10-15 дней клетки пересаживали для дальнейшего пассирования и использовали для анализа.

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

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

Среда для гладкомышечных клеток: SmGM-2 Smooth Muscle Growth Medium-2(SmBM Basal Medium 500 ml, SmGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors: rhEGF (Epidermal growth factor, human recombinant), rhFGF – B (Human fibroblast growth factor – B), Insulin (recombinant human), GA – 1000 (Gentamicin sulfate amphotericin – B), Lonza)

В ходе работы клетки культивировали в инкубаторах при 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа.

2.1.2 Определение количества клеток в популяции с помощью проточной цитофлуориметрии

Проточная цитофлуориметрия (FACS) как новый метод исследования клеток возникла и стала развиваться во второй половине XX века. Основная идея, послужившая толчком для создания этого метода – ускорение и автоматизация рутинного микроскопического исследования в лабораторной диагностике. Цитофлуориметры позволяют исследовать морфо-функциональное состояние индивидуальных клеток в потоке на основе измерения оптических и электрических свойств. Исключительно высокая производительность этих приборов позволяет собирать и анализировать большие массивы данных, объединяющие информацию о десятках и сотнях тысяч клеток. В данном эксперименте подсчитывалось количество клеток, позитивных по окрашиванию антителами, конъюгированными с флуорохромом.

Количественная оценка методом FACS популяций клеток, культивируемых в среде EGM-2, производилась на втором пассаже перед процедурой магнитного сортирования и на третьем пассаже после сортирования CD31-позитивных клеток. Клетки, культивируемые в среде SmGM, были использованы для анализа методом FACS на втором и пятом пассажах. Перед процедурой FACS оценивалась жизнеспособность клеток окрашиванием трипановым синим (Trypan Blue, T10282, Invitrogen) с использованием прибора Countess Automated Cell Counter (C10227). Количество

жизнеспособных клеток составляло более 95%. Клетки снимали с поверхности культурального пластика неэнзиматическим буфером Enzyme-free cell dissociation buffer (13151014, Gibco). Нефиксированные клетки использовали для прямого окрашивания антителами anti-human CD31-APC (17-0319-42, eBioscience), anti-human VEGFR2-PE (560494, BD Biosciences), and anti-human CD90 (17-0909-42, eBioscience). Для каждой реакции с антителами использовали соответствующий изотипический контроль. Для непрямого окрашивания антителами anti- α -SMA antibodies (DAKO, M0851) клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 10 мин, пермеабелизовали 0.1% TWEEN в течение 20 мин, инкубировали в блокирующем буфере (1% BSA) 30 мин и с антителами в течение ночи при +4°C. После этого клетки промывали PBS и инкубировали с вторичными антителами Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) (Life Technologies, A11029) в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки, окрашенные вторичными антителами без первичных, использовались в качестве негативного контроля. Анализ клеточных популяций производился на приборе FACS Canto II с помощью программного обеспечения FACS Diva. Анализ проводился для 10000 событий в трех повторностях, среднее значение и стандартное отклонение подсчитывалось в программе Microsoft Excel. Концентрация антител подбиралась согласно протоколам фирм-производителей.

2.1.3 Клеточная сортировка с помощью магнитных частиц MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами

Магнитный сортинг – это метод отделения целевой по определенному маркеру популяции клеток с помощью магнитного поля. Клетки, имеющие целевой антиген, взаимодействуют с антителами, конъюгированными с магнитными микрочастицами. Сортировка осуществляется с помощью специального магнитного сепаратора. Антитела к поверхностному антигену CD31, конъюгированные с магнитными микрочастицами MicroBeads (130-091-

935, Miltenyi Biotec, Germany) преципитируют с антигенами на поверхности клеток. Затем суспензия клеток пропускается через специальную колонку, помещенную в магнитное поле сепаратора. CD31-позитивные клетки, связавшиеся с антителами, задерживаются, в отличие от CD31-негативных клеток. Задержавшиеся в колонке клетки затем собираются в отдельную пробирку после выведения из магнитного поля для дальнейшего культивирования. Клеточная сортировка проводилась согласно протоколу фирмы-производителя антител *Miltenyi Biotec*.

2.1.4 Иммунофлуоресцентное окрашивание полученных клеточных популяций

Первые публикации об использовании антител, меченных флуорохромами, начинаются с 1941 года [128]. Основой иммунофлуоресцентного окрашивания является специфическое связывание антител с антигенами. В данной работе использовался метод непрямого окрашивания с использованием антител. Суть метода заключалась в том, что первичные антитела преципитируют с антигенами на поверхности или в цитоплазме клетки, либо с антигенами межклеточного матрикса. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом, связываются с первичными антителами. Окраска детектируется посредством флуоресцентного микроскопа. Список антител, используемых в нашей работе, представлен в таблице 1.

Список первичных и вторичных антител

Первичные антитела	Детектируемый объект	Фирма	Каталожный номер
Выявление клеток			
anti- α -sma	Актин гладких мышц (гладкомышечные клетки)	DAKO	M0851
anti - human CD31	Человеческие эндотелиальные клетки	DAKO	
anti - mouse CD 31	Мышиные эндотелиальные клетки	Biolegend	102502
anti- human CD90	Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки	eBioscience	14090982
anti - CD 29	Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки	eBioscience	14-0282-92
Выявление межклеточного матрикса			
anti-collagen I	Коллаген 1го типа	abcam	ab34710
anti - collagen IV	Коллаген 4го типа	Life Span	
anti-fibronectin	Фибронектин	abcam	ab6328
Von Willebrand factor antiRb	Фактор Вон Виллебранда	abcam	ab6994
anti - elastin	Эластин	abcam	21610
Вторичные антитела		Фирма	Каталожный номер
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1		Life Technologies	A21124
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1		Life Technologies	A21121
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG2a		Life Technologies	A21134
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L)		Life Technologies	A11031
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)		Life Technologies	A11029

1. Клетки фиксировали 4% PFA (параформальдегид) 10 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой PBS 2 раза по 15 мин.
2. Инкубировали в 0,05% Triton X-100 30 мин при комнатной температуре.
3. Промывали PBS 2 раза по 15 мин.
4. Инкубировали при комнатной температуре в 1% BSA 30 мин.
5. Добавляли 200 мкл первичных антител в растворе 1% BSA и инкубировали при +4°C в течение ночи.
6. Промывали PBS 2 раза по 15 мин.
7. Добавляли 400 мкл вторичных антител в растворе BSA.
8. Инкубировали 1 час при комнатной температуре во влажной камере в темноте
9. Промывали PBS 2 раза по 15 мин.
10. Добавляли 0,001% DAPI (в растворе PBS), если клетки выращивали на культуральном пластике. Клетки, культивируемые на синтетическом или естественном материале, перемещали на предметное стекло в растворе 0,001% DAPI, сверху подложку придавливали покровным стеклом и плотно закрывали края препарата парафином.
11. Анализ клеток, выращиваемых на культуральном пластике, производился на инвертированном флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E, используя программу NIS Advanced Research, клетки, культивируемые на синтетических и естественных подложках, анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) на базе AxioObserver Z1 (Zeiss) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

2.1.5 Предварительная подготовка препаратов эндотелиальных клеток к электронной микроскопии

Электрoнный микроскоп (ЭМ) — прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию, в отличие от оптического микроскопа, вместо светового потока, пучка электронов с энергиями 200 эВ — 400 кэВ и более.

Подготовка к электронной микроскопии включала следующие этапы:

1. Обработка эндотелиальных клеток, культивируемых на специальных пластиковых пленках (Agar Scientific, Essex, UK), 2,5% глутаровым альдегидом (15 мин при комнатной температуре)
2. Инкубирование в 2,5% глутаровом альдегиде в 0,1М какодилате натрия 1 час при комнатной температуре
3. Промывка 0,1М какодилате натрия (3 раза по 5 мин)
4. Фиксирование в 1% -ном водном растворе осмия 1 час
5. Промывка водой miliQ 3 раза
6. Инкубирование в 1%-ом ацетате уранила сутки при комнатной температуре
7. Промывка miliQ один раз, затем дегидратирование в этаноле (30%, 50%, 70%, 96% в течение 10 мин, и 100% в течение 20 мин) и ацетоне (2 раза по 20 мин)
8. Заливка образцов агаром (Agar Scientific, Essex, UK)
9. Полимеризация трое суток при температуре 60° С
10. Получение тонких срезов с помощью микротомы Reichert-Jung ultracut

Исследование ультраструктуры эндотелиальных клеток проводили в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-100SX.

2.2 *In vitro* оценка функциональных свойств обогащенных культур кардиальных эксплантов

По литературным данным, для оценки функциональных свойств *in vitro* эндотелиальных и гладкомышечных клеток проводятся следующие тесты:

- 1) образование эндотелиальными клетками сосудоподобных структур в матригеле. Матригель – экстракт базальной мембраны, широко используется для моделирования ангиогенеза *in vitro* и *in vivo* [129,130].
- 2) тест на способность эндотелиальных клеток поглощать липопротеиды низкой плотности [131].
- 3) оценка способности эндотелиальных и гладкомышечных клеток синтезировать компоненты межклеточного матрикса методом иммунофлуоресцентной окраски.

2.3 Оценка функциональных свойств эндотелиальных и гладкомышечных клеток на биологической модели *in vivo*

Для оценки функционального эффекта полученных эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vivo*, по литературным данным, используются две модели [129,130]. **Первая модель** – введение сосудистых клеток в ишемизированную нижнюю конечность мыши, **вторая модель** – введение смеси клеток с матригелем в переднюю брюшную стенку. Для исключения реакции отторжения клеточно-заселенного трансплантата для проведения этих тестов мы использовали иммунодефицитных мышей Nude и SCID.

2.3.1 Протокол операции по созданию модели ишемии задней конечности у иммунодефицитных мышей Nude

После обработки операционного поля, под ингаляционным наркозом с 1-3% изофлюрана в 100% кислороде при скорости потока 1L/min или после однократного подкожного введения тилетамил (Золетил50, 5мг/кг) и ксилазин (КсилаВет, 3мг/кг), под увеличением 10×-40× по медиальной поверхности левого бедра выполняли продольный разрез кожи с длиной до 1см. Выделяли

и брали на держалки общую бедренную артерию и бедренную вену. Проксимальное и дистальное места выделения последовательно перевязывали бедренные сосуды нитями «Prolene» 8/0. Сегмент сосудов между лигатурами резецировали. Суспензия клеток вводилась в ишемизированную нижнюю конечность внутримышечно. Животным контрольной группы вводили 100 мкл PBS, первой экспериментальной группы – 5×10^5 только эндотелиальных клеток в 100 мкл PBS, второй экспериментальной группы – 10^6 смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток в 100 мкл PBS. Рану зашивали нитями 6/0, обрабатывали антисептиком.

2.3.2 Протокол введения смеси матригеля с эндотелиальными и гладкомышечными клетками в переднюю брюшную стенку

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки в концентрации 5×10^5 в 100 мкл матригеля вводили подкожно в переднюю брюшную стенку иммунодефицитным мышам линии SCID. Через 14 дней забирали область передней брюшной стенки с введенным матригельным трансплантатом. Выполняли криосрезы, иммунофлуоресцентное окрашивание, окраску изолектином и оценку васкуляризирующих свойств клеток по нижеизложенной методике.

2.3.3 Прижизненная визуализация введенных клеток в экспериментах *in vivo*

Для визуализации расположения клеток в области инъекции использовали эндотелиальные клетки, меченные прижизненным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRed FM (MitoTracker DeepRedFM, # M22426, Invitrogen). Сигнал детектировали с помощью прибора Kodak In-vivo Multispectral Imaging System. Данный метод мечения ЭК позволяет в тканях животных детектировать наличие введенных клеток и их миграцию в период наблюдения.

1. Окрашивание 5×10^5 эндотелиальных клеток прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM по протоколу фирмы-производителя.
2. Разбавление клеток в 100 мкл PBS
3. Введение внутримышечно в область ишемии задней конечности или подкожно в переднюю брюшную стенку
4. Использование для детекции прибора Kodak In-vivo Multispectral Imaging System.

2.3.4 Методика получения криосрезов биологических тканей для иммунофлуоресцентного анализа функционального эффекта клеток

Криосрезы биологических тканей выполняли для оценки общей длины, количества и плотности сосудов в поле зрения после окраски с изолектином (см 2.2.4). Данные параметры изменяются за счет паракринного эффекта введенных сосудистых клеток. Забор материалов для криосрезов выполняли по следующему протоколу:

1. Цервикальная дислокация, ампутация ишемизированной нижней конечности на уровне тазобедренного сустава или выделение и резекция передней брюшной стенки.
2. Полученные биологические материалы заключали в реактив для приготовления криосрезов O.C.T. – compound (Tissue Tek), и охлаждали до -22 °C.
3. С помощью прибора Криостат НМ 550 изготавливали криосрезы толщиной 10 мкм.
4. Фиксировали препараты в течение 10 мин в 4% растворе формальдегида с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин).
5. Пермеабелизовали препараты в 1% Triton X-100 в течение часа при комнатной температуре с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин).

6. Инкубировали в блокирующем буфере – 1% BSA (bovine serum albumin) в течение 30 минут.
7. Инкубировали с первичными антителами в течение ночи при +4°C.
8. Отмывали в PBS 2 раза по 15 минут при комнатной температуре.
9. Инкубировали с вторичными антителами в течение 1 часа в темной влажной камере при комнатной температуре.
10. Отмывали в PBS 2 раза по 15 минут при комнатной температуре.
11. Добавляли DAPI
12. Анализировали препараты с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E методом Z-стэков с помощью программного модуля 6D программы NIS Advanced Research.

2.3.5 Иммунофлуоресцентное окрашивание биологических препаратов иммунодефицитных мышей изолектином Б4 (Isolectin GS-IB4)

Подготовленные криосрезы также окрашивали изолектином Б4 (Isolectin GS-IB4 From Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 594 Conjugate, I21413). Isolectin GS-IB4 – вещество, которое поглощается только эндотелиальными клетками. По детекции изолектина оценивали новообразованные сосуды. По количеству окрашенных изолектином эндотелиальных клеток с помощью программы Angio Tool оценивали количество, плотность и общую длину сосудов в поле зрения. Для этого выполняли следующие процедуры:

1. Инкубирование в 0,1мМ CaCl₂ в течение 30 мин.
2. Разведение изолектина, конъюгированного с флуорохромом Alexa594, 1:75 в 0,1мМ CaCl₂ и инкубирование препаратов в течение ночи при +4°C во влажной камере в темноте.
3. Отмывка в PBS 2 раза по 15 минут при комнатной температуре.
4. Проведение анализа с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E, используя программу NIS Advanced Research.
5. Статистическая обработка данных. Расчет стандартного отклонения среднего значения антигенов для эндотелиальной и гладкомышечной

популяции в программе Microsoft Excel для $n = 3$. Анализ препаратов ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей производился с помощью программного обеспечения Angio Tool. Подсчет сосудов проводили в 10 полях зрения на препарат при 10-кратном увеличении, выделяя Isolectin-положительные капилляры и сосуды. Полученные результаты анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа в программе Microsoft Excel.

2.4 Заселение биологических и синтетических материалов эндотелиальными и гладкомышечными клетками кардиальных эксплантов человека и их характеристика

Для оценки фиксации (адгезии) и пролиферации клеточных популяций нами были тестированы синтетические сосудистые материалы: ксеноперикард (КемПерипласт-Нео, NeoCor), децеллюляризованная гомоартерия, ПТФЭ (Gore-Tex), ПЭТ (Intergard), матриксы полученные методом электроспиннинга: ПЛГА и ПКЛ с МПВС. Заселение эндотелиальными и гладкомышечными клетками выполняли по нижеописанной методике.

2.4.1 Заселение и культивирование клеток на синтетических и биологических подложках

Площадь заселяемой поверхности подложек составляла 2 см^2 . Количество заселяемых клеток – $3 \times 10^5 / \text{см}^2$. Клетки культивировались на подложках от 2 до 6 дней в среде EGM (если заселяли поверхность эндотелиальными клетками), SmGM (если заселяли гладкомышечными клетками), комбинированной EGM и SmGM (если культивировали два типа клеток одновременно). При одновременном заселении клетками на первой стороне заселяли гладкомышечные клетки в среде SmGM. Спустя 24 часа вторая сторона подложки заселялась эндотелиальными клетками.

2.4.2 Оценка фиксации, морфологических и функциональных свойств полученных ЭК и ГМК в составе матриксов *in vitro*

Для характеристики морфологических и функциональных свойств клеток в составе тканеинженерных конструкций мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание антителами, специфичными к эндотелиальным и гладкомышечным маркерам и межклеточному матриксу. Список антител представлен в таблице 1. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на сосудистых материалах проводилась по вышеизложенной методике (см. 2.1.4)

2.5 Оценка неоэндотелизации и проходимости клеточно-наполненных тканеинженерных трансплантатов *in vivo*

2.5.1 Протокол операции имплантации клеточно-заселенной заплаты в брюшную аорту иммунодефицитным мышам SCID.

После получения и тестирования *in vitro* тканеинженерной конструкции, состоящей из поликапролактона, заселенной эндотелиальными и гладкомышечными клетками кардиальных эксплантов человека, следующим этапом была проведена оценка биологической совместимости, тромборезистентности и регенерации в эксперименте *in vivo*.

3D матриксы, заселенные клетками и контрольные 3D матриксы без клеток были имплантированы в брюшную аорту 35 мышей линии SCID. Мыши разделены на 2 группы: в экспериментальную группу вошли 23 мыши, которым имплантированы заплаты с предварительным клеточным заселением, контрольную группу составили 12 мышей с имплантированными заплатами без клеток. Исследование на животных проводили, соблюдая «Правила работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложения к приказу Министерства здравоохранения СССР № 565 от 04.10.1977).

После обработки операционного поля под ингаляционным наркозом 1-3% изофлюрана в 100% кислороде при скорости потока 1L/min под 10×-40× увеличением срединным лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту ниже почечных артерий до бифуркации аорты. Аорту ниже почечных артерий

и выше бифуркации брали на держалки (нити prolene 8/0). Далее проводили клампинг аорты держалками и выполняли продольную аортотомию брюшной аорты длиной до 0,5мм. После чего в аортотомический дефект вшивалась заплата с размерами 0,5x0,5мм 4 узловыми швами нитью «Premilene» 10/0. Запуск кровотока. Гемостаз. Послойное зашивание передней брюшной стенки и кожи нитями 6\0. Обработка антисептиком. Асептическая повязка. После операции мышцы не получали антикоагулянты или антиагреганты.

2.5.2 Оценка проходимости брюшной аорты

Проподимость области аорты с имплантированной заплатой оценивали при помощи МРТ в ангиорежиме через 2, 4, 12 и 24 недели и по УЗИ в те же сроки наблюдения.

1. Исследование проведено с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тесла. Для этого использовали T1-взвешенные изображения, полученные методом FLASH (Fast Low Angle SHot) с параметрами импульсную последовательности (TE = 2,5 мс, TR = 200 мс), параметрами изображения (размер 3 × 3 см; матрица 128 × 128 точек; толщина среза 0.31 мм, расстояние между срезами 0,33 мм [165,166].

2. Оценку проходимости в брюшной аорте выполняли с помощью диагностической ультразвуковой системы Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Ultrasound, Израиль; регистрационное удостоверение ФСЗ 2010/06618 от 13.04.2010), с линейным сосудистым датчиком через 2, 4, 12 и 24 недели после операции.

2.5.3 Морфологическое исследование заплат, имплантированных в брюшную аорту модельным животным

Биологические материалы забирали через 2, 4, 12 и 24 недели после имплантации. После однократного подкожного введения тилетамил (Золетил50, 5мг/кг) и ксилазин (КсилаВет, 3мг/кг), под 10×-40× увеличением

лапаротомным доступом выделяли брюшную аорту. После пережатия аорты выполняли ее поперечное иссечение проксимальнее и дистальнее заплаты. Мышей забивали смещением шейных позвонков. После продольного рассечения задней стенки аорты забранный материал заключали в реактив O.C.T. – compound (Tissue Tek) для приготовления криосрезов и охлаждали до -22°C . С помощью прибора Криостат НМ 550 изготавливали криосрезы толщиной 8-10 мкм. Препараты криосрезов фиксировали в течение 30 мин в 4% растворе формальдегида с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин). Для иммуногистохимической окраски пермеабелизовали препараты обработкой 1% Triton X-100 в течение часа на шейкере при комнатной температуре с последующими отмывками PBS (2 раза по 30 мин). Центры неспецифической сорбции ингибировали, инкубируя препараты в физрастворе с 1% BSA (bovine serum albumin) в течение 30 мин. Затем препараты инкубировали с первичными антителами в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$ и отмывали от избытка антител физраствором (2 раза по 15 минут) при комнатной температуре. Затем препараты инкубировали с вторичными антителами, меченными флуорохромом в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте, отмывали от избытка антител физраствором как описано выше. Ядра клеток окрашивали 0,001% DAPI. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 780 (Zeiss) в ЦКП Микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Список использованных антител и их каталожные номера представлены в таблице №1.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование полученных клеток

3.1.1 Характеристика несортированных клеток кардиального экспланта, выращенных на среде без добавления ростовых факторов

Культуры клеток были получены из послеоперационного материала миокарда выходного отдела правого желудочка человека. При культивировании выделенных клеток в среде без добавления специфических факторов роста на поверхности, обработанной желатином, к шестому пассажу в популяции утрачиваются эндотелиальные маркеры CD31 и CD144 (VE-cadherin), при этом до 94% повышается доля популяции, позитивной по маркеру гладкомышечных клеток α -SMA. Также на 6 пассаже количество CD 90-позитивных неспецифических клеток составляет 70,4% (Рисунок 3).

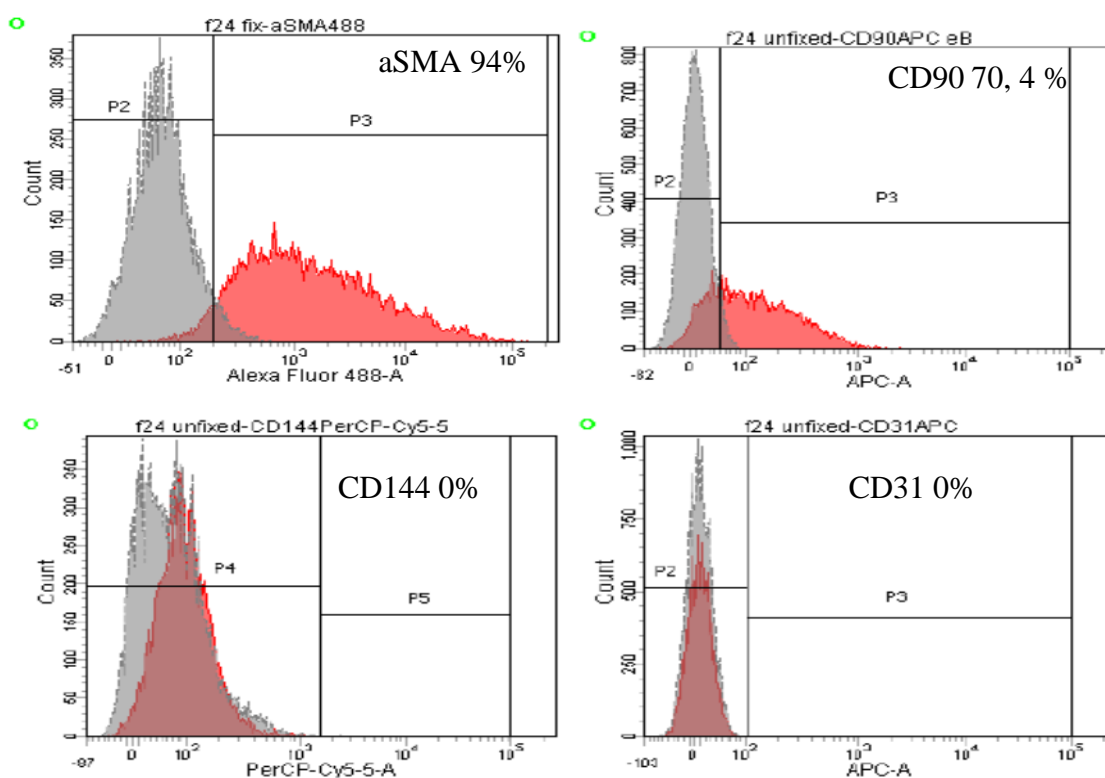


Рисунок 3. Характеристика поверхностных и внутриклеточных антигенов в культурах клеток кардиальных эксплантов, выращенных на желатине в культуральной среде без использования ростовых факторов. aSMA – маркер гладкомышечных клеток, CD31, CD 144 – маркер эндотелиальных клеток, CD 90 – маркер фибробластов и мезенхимальных клеток

Таким образом, культивирование на желатине в среде без добавления факторов роста не поддерживает функциональный фенотип эндотелиальных клеток, в популяции превалируют быстро пролиферирующие клетки фибробластного фенотипа CD90+ α SMA+.

3.1.2 Характеристика несортированных клеток кардиального экспланта, выращенных в среде с добавлением факторов роста

Клетки кардиальных эксплантов, культивируемые на коллагене 4 типа в средах, обогащенных факторами роста для эндотелиальных или гладкомышечных клеток, поддерживали более активную пролиферацию. В популяции кардиальных клеток, выращиваемых три пассажа в среде для роста гладкомышечных клеток SmGM-2, доля гладкомышечных клеток, позитивных по маркеру α -актина гладких мышц α SMA, по данным проточной цитофлуориметрии, составляет 88,7%. В популяции кардиальных клеток, выращиваемых два пассажа в среде для роста эндотелия EGM-2, доля CD31-позитивных эндотелиоцитов составляет 16%. (Рисунок 4)

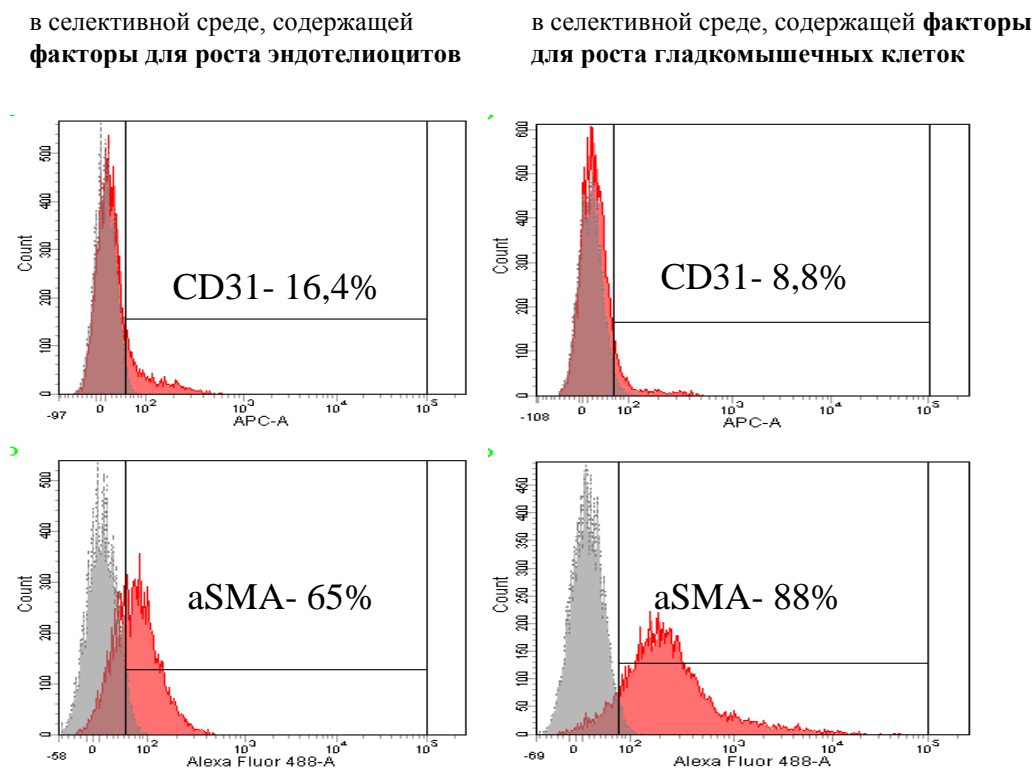


Рисунок 4. Характеристика поверхностных антигенов в небогатенных культурах клеток кардиальных эксплантов в селективных средах методом проточной цитофлуориметрии

Кроме того, по данным иммунофлуоресцентного окрашивания (Рисунок 5А, 5Б), в популяции присутствуют CD34-позитивные кардиоваскулярные клетки-предшественники, CD105-позитивные мезенхимальные клетки. CD 31 и CD34-позитивные клетки формируют сосудоподобные структуры и обширные области. Маркеры CD 34 и CD 31 солокализуются с фактором фон Виллебранда (vWF), где также наблюдаются обширные и интенсивные области окрашивания. Однако в популяции кроме эндотелиальных клеток присутствуют группы клеток гладкой мускулатуры с характерной экспрессией α SMA, которые не солокализуются с клетками, позитивными по окрашиванию антителами к эндотелиальным и мезенхимальным маркерам. Таким образом, подложка из коллагена 4 типа в совокупности с факторами роста культуральных сред позволяют получить значительно более высокий процент целевых клеточных популяций эндотелиальных клеток. Однако наличие в эндотелиальной популяции примеси клеток гладкой мускулатуры сделало необходимым обогащение культуры.

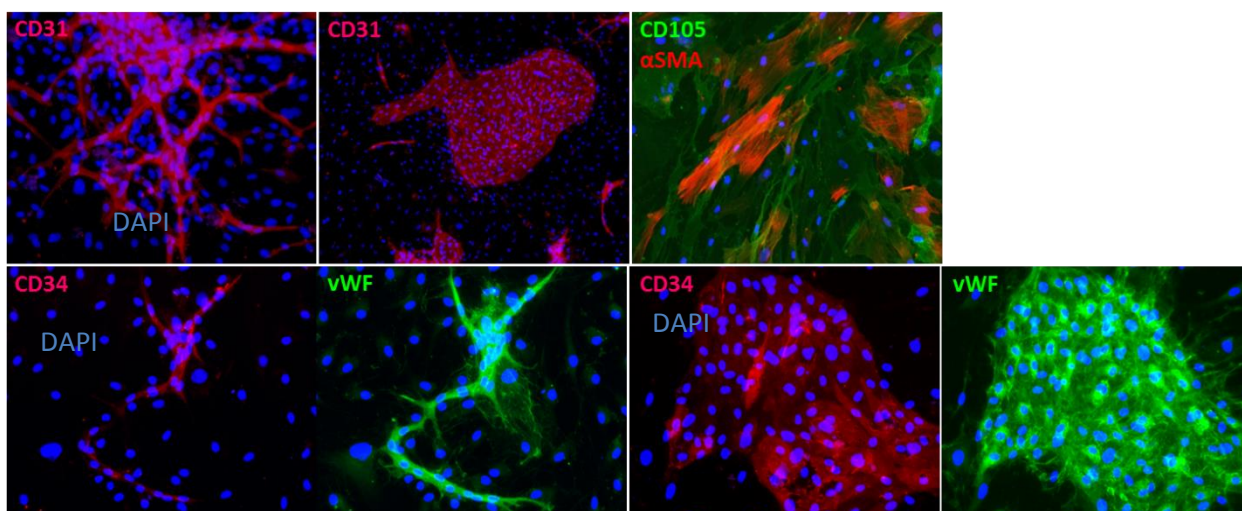


Рисунок 5А. Характеристика специфических маркеров эндотелиальных и гладкомышечных клеток в несортированных клеточных популяциях кардиальных эксплантов человека методом иммунофлуоресцентного окрашивания

Примечание: Несортированные клетки кардиального эксплантата, выращенные на среде EGM и коллагене IV, 1 пассаж. CD 31 – маркер эндотелиальных клеток, CD 34 – маркер предшественников ЭК, vWF – фактор Вон-Виллебранда (маркер ЭК), α SMA – маркер гладкомышечных клеток, CD 105 – эндоглин, DAPI – ядра клеток.

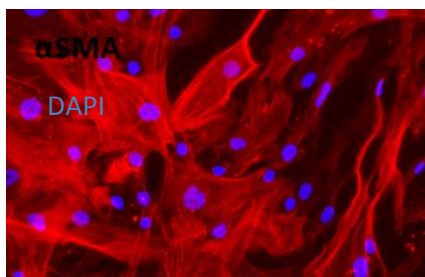


Рисунок 5Б. Характеристика специфических маркеров гладкомышечных клеток в несортированных клеточных популяциях кардиальных эксплантов человека методом иммунофлуоресцентного окрашивания.

Примечание: несортированные клетки кардиального экспланта, выращенные в среде SmGM и коллагене IV, 1пассаж. α SMA – маркер гладкомышечных клеток, DAPI – ядра клеток.

3.1.3 Характеристика обогащенных культур клеток кардиального экспланта человека

В качестве способа обогащения нами был выбран метод магнитного сортирования с помощью частиц MicroBeads (Miltenyi Biotec), конъюгированных с антителами к маркеру зрелых эндотелиоцитов CD31. Для этого клетки, выделенные ранее посредством ферментативного гидролиза коллагеназой NB, сначала выращивались на поверхности культурального пластика, покрытого коллагеном 4 типа, в среде EGM-2 с коктейлем ростовых факторов. Спустя 10 дней культивирования клетки подвергали процедуре магнитного сортирования (см. «Материалы и методы»). Клетки, прошедшие процедуру сортирования с помощью магнитных частиц, конъюгированных с антителами к CD31, характеризовали с помощью иммунофлуоресцентной окраски, проточной цитофлуориметрии, а также функциональных тестов *in vitro* и *in vivo*.

3.1.3.1 Оценка процентного содержания маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии

После магнитного сортирования происходит обогащение клеточной культуры целевой популяцией зрелых эндотелиальных клеток, данный фенотип поддерживается на протяжении как минимум 10 пассажей (Рисунок 6, А, таблица 2). В эндотелиальной популяции маркер зрелых эндотелиоцитов CD31 поддерживается на уровне $72,6 \pm 3,3\%$, VEGFR2 выявляется в $60,4 \pm 2,5\%$

клеток, экспрессия предшественника CD34 практически полностью утрачивается, и по данным трех измерений составляет $0,66 \pm 1,2\%$. Следует также отметить, что после сортировки эндотелиальной популяции, по данным проточной цитофлуориметрии, в ней утрачиваются неспецифические клетки, позитивные по актину гладких мышц α SMA, доля клеток с маркером CD 90 составляет около $2,1 \pm 2,8\%$ (Рисунок 6А, таблица 2).

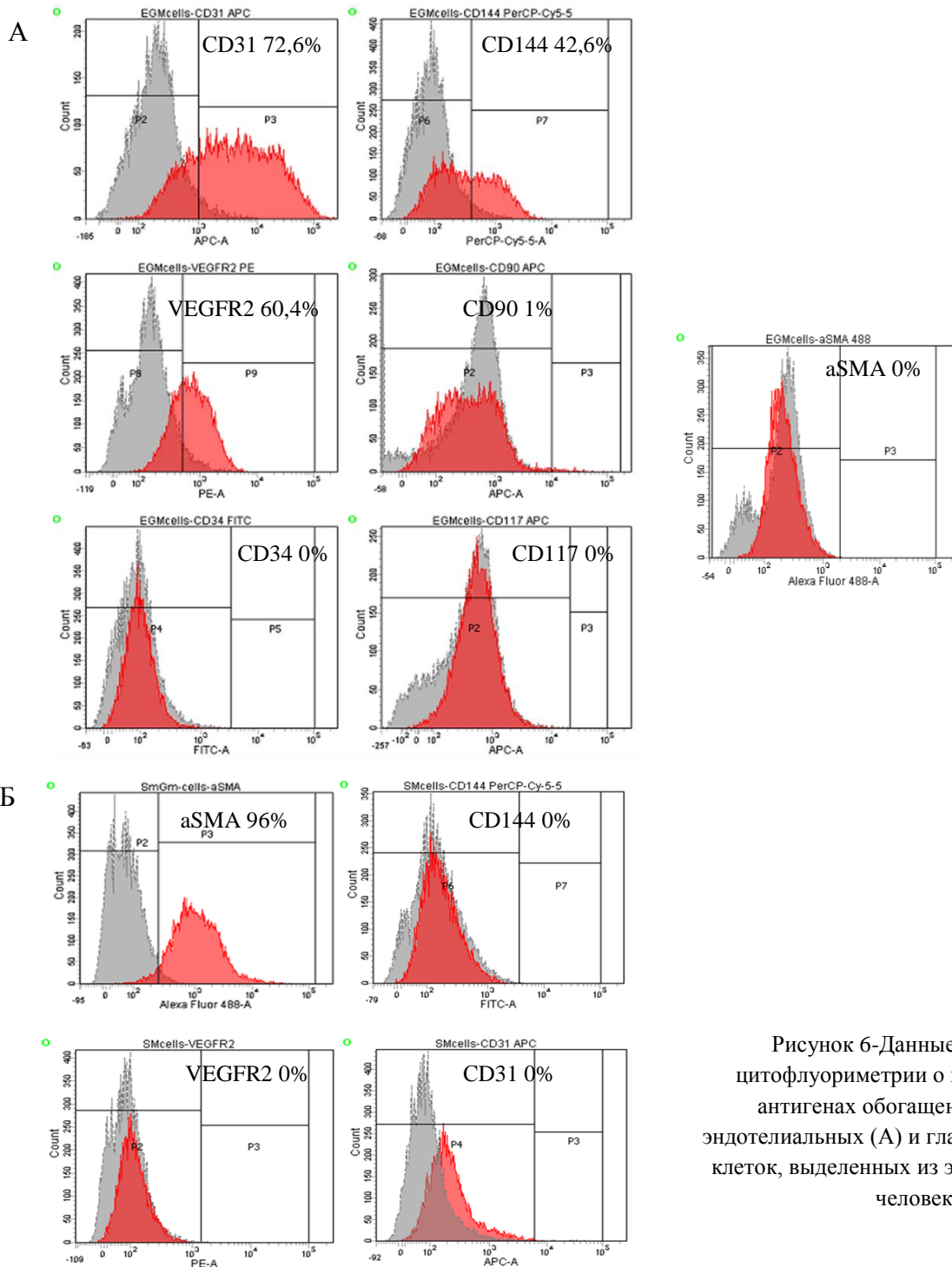


Рисунок 6-Данные проточной цитофлуориметрии о поверхностных антигенах обогащенных культур эндотелиальных (А) и гладкомышечных (Б) клеток, выделенных из эксплантов сердца человека

Результаты проточной цитофлуориметрии о поверхностных антигенах в обогатенных культурах эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, выделенных из кардиальных эксплантов человека

Поверхностный антиген	Средняя доля антигена в эндотелиоцитах (%)	Стандартное отклонение	Средняя доля антигена в ГМК (%)	Стандартное отклонение
CD31	72,6	3,3	0	0
VEGFR2	60,4	2,5	0	0
CD144 (VE-cadherin)	43, 2	1,6	0	0
CD146	61,2	6,2	0	0
CD34	0,66	1,2	0	0
NG2	0	0	0	0
PDGFR-A	0	0	0	0
CD90	2,1	2,8	18,9	2,7
CD44	99,1	-	99,5	-
CD166	99,5	-	99,8	-
CD14	0	-	10,5	-
CD10	79,9	-	37,4	-
CD105	99,4	-	99,4	-
CD45	0	-	0	-
aSMA	0	0	96,1	2,2

Культура гладкомышечных клеток не подвергалась процедуре магнитного сортирования, поддерживалась без дальнейшей сортировки на протяжении более 10 пассажей на той же селективной среде, на которой она была получена, затем ее характеризовали с помощью проточной цитофлуориметрии. Показано, что доля клеток, экспрессирующих актин

гладких мышц, поддерживается на уровне $96,1 \pm 2,2\%$ (Рисунок 6 Б, Таблица 2). Доля клеток, экспрессирующих фибробластный маркер CD90, составляет $18,9 \pm 2,7\%$.

3.1.3.2 Оценка характерных маркеров с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания

Результаты иммунофлуоресцентной окраски визуально подтверждают обогащение эндотелиальной популяции клетками с характерными маркерами зрелых эндотелиоцитов CD31 и vWF (Рисунок 7А). Кроме того, сортированная клеточная популяция окрашивается антителами к CD 29, который является β -1-интегрином – рецептором к молекулам коллагена.

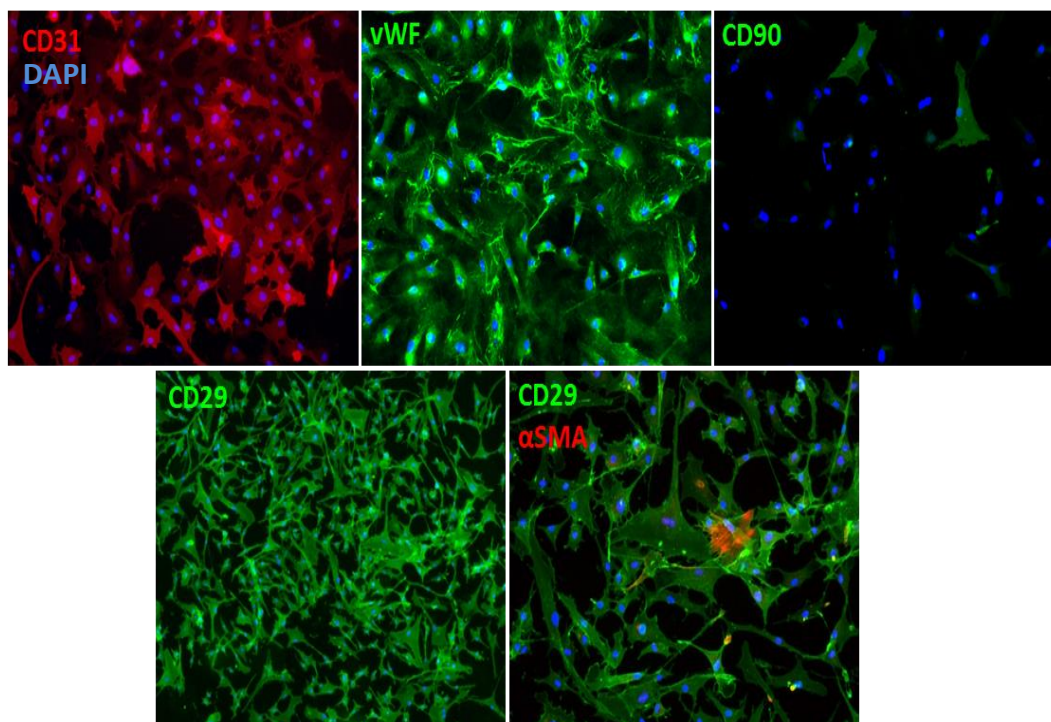


Рисунок 7А – Характеристика специфических маркеров эндотелиальных и гладкомышечных клеток в клеточных популяциях кардиальных эксплантов человека методом иммунофлуоресцентного окрашивания.

Примечание: Клетки кардиального экспланта, сортированные с помощью магнитных частиц, конъюгированных с антителами к CD31. CD 31 – маркер эндотелиальных клеток, CD 29 – белок-рецептор к компонентам межклеточного матрикса интегрин β -1, vWF – фактор Вон-Виллебранда (маркер ЭК), α SMA – маркер гладкомышечных клеток, CD 90 – маркер фибробластных и мезенхимальных стволовых клеток, DAPI – ядра клеток

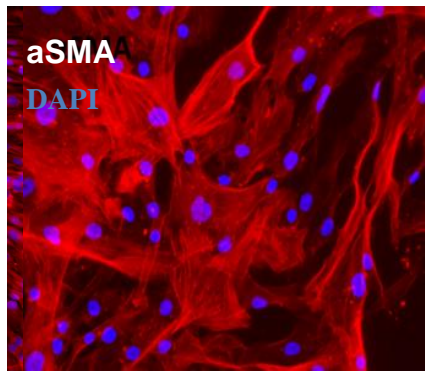


Рисунок 7Б. Характеристика специфических маркеров гладкомышечных клеток в клеточных популяциях кардиальных эксплантов человека методом иммунофлуоресцентного окрашивания.

Примечание: Клетки кардиального экспланта, культивируемые в течение 5 пассажей в среде для роста гладкомышечных клеток. α SMA – актин гладкомышечных клеток, DAPI – ядра клеток.

Иммунофлуоресцентное окрашивание популяции гладкомышечных клеток после 10-ти пассажей на селективной среде демонстрирует наличие практически во всех клетках маркера α -актина гладких мышц и межклеточного вещества - эластина (рис. 7Б). Сравнение процентного соотношения клеток до и после обогащения представлена на рисунке 8.

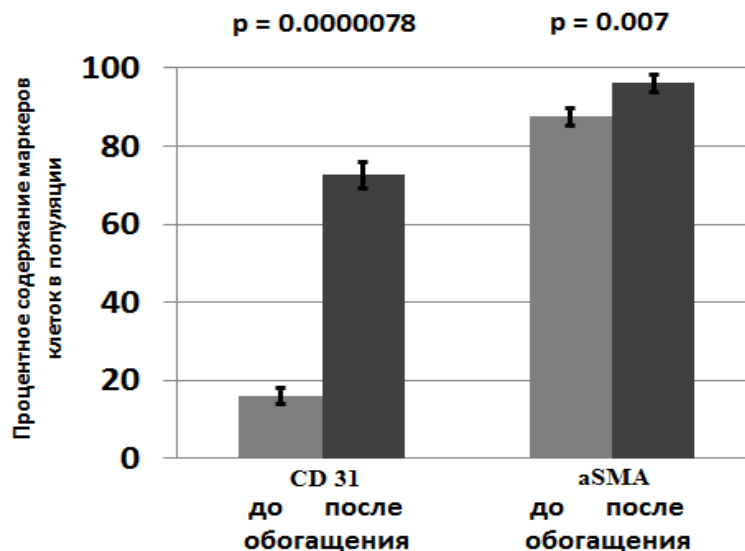


Рисунок 8. Характеристика поверхностных и внутриклеточных антигенов методом проточной цитофлуорометрии в культурах клеток кардиальных эксплантов до и после магнитного сортирования. Сравнение клеток, культивированных в среде для эндотелиальных клеток до и после магнитного сортирования (левая картина). Сравнение клеток, культивированных в среде для гладкомышечных клеток (SmGM) на втором и пятом пассажах (правая картина). CD 31, VEGFR2 – маркеры эндотелиальных клеток, α SMA – маркер гладкомышечных клеток, CD 90 – маркер фибробластных и мезенхимальных стволовых клеток.

3.1.4 Анализ ультраструктуры обогащенных эндотелиальных клеток

Важным аспектом функциональной характеристики эндотелиальной популяции является исследование ультраструктуры клеток на предмет наличия специфических микровезикул. Тельца Вебеля–Паладе – особые микровезикулы, характерные только для функциональных эндотелиальных клеток. Они содержат молекулы белка фактора фон Виллебранда, Р-селектин и другие компоненты, которые секретируются эндотелиальными клетками в ответ на внешнее раздражение, например, в случае активации эндотелия при повреждении сосудов.

Методом просвечивающей электронной микроскопии показано наличие в исследуемой популяции телец Вебеля–Паладе. Было отмечено не только наличие, но и стадии формирования этих телец в полученных клетках (Рисунок 9). Нами зафиксированы все стадии их образования, от момента начала сборки, до слияния зрелых телец с клеточной мембраной и выходом Фактора фон Виллебранда за пределы клеточного пространства. Таким образом, полученная клеточная популяция обладает свойствами, характерными для эндотелиальных клеток.

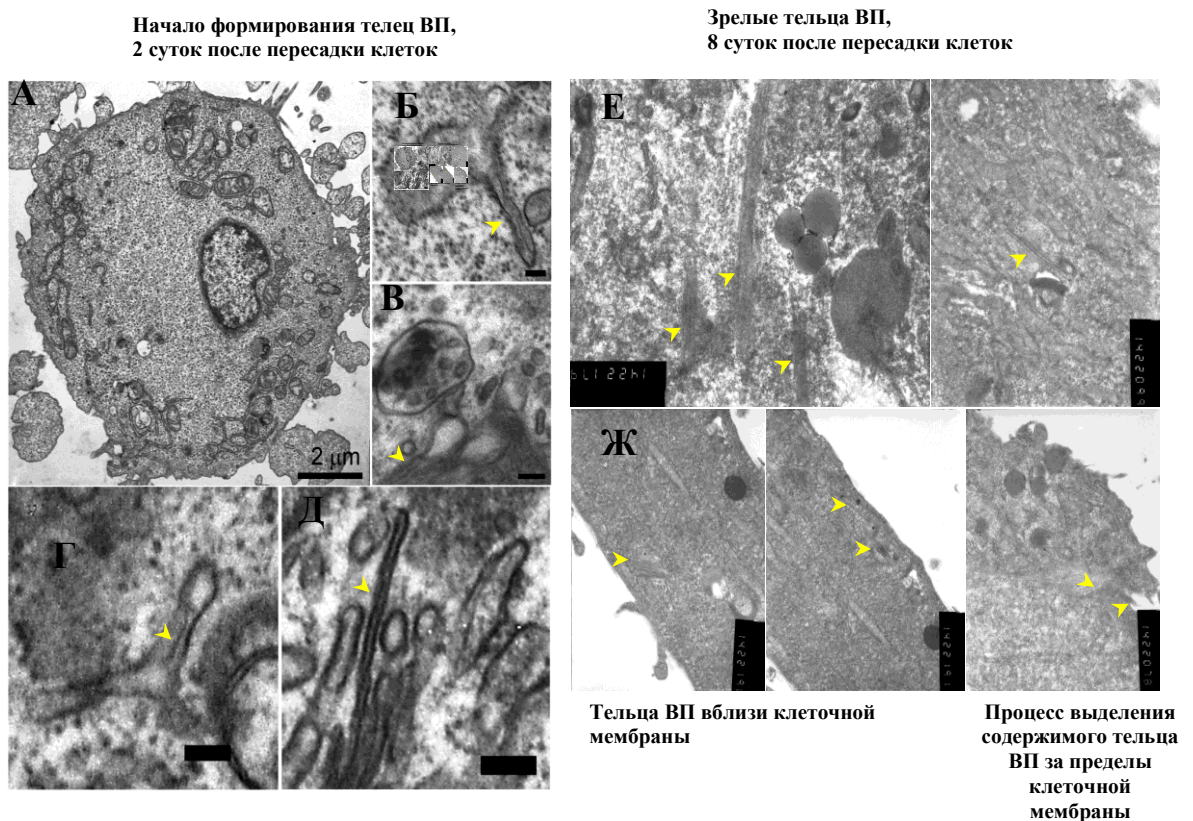


Рисунок 9 – Ультраструктура обогащенных эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека. А) общий вид ультраструктуры эндотелиальной клетки в культуре; Б) – Д) – ранние стадии формирования телец Вебеля-Паладе (ВП), незрелые ВП, содержащие молекулы белка фактора Фон-Вилебрандта; Е) – Ж) сформированные ВП с характерно уложенными структурами белка фактора Фон-Вилебрандта. Стрелками обозначены тельца Вебеля-Паладе

3.1.5 Оценка функциональных свойств *in vitro* обогащенных культур кардиальных эксплантов

Функциональные тесты *in vitro* показали, что эндотелиоциты, отсортированные из экспланта сердца методом магнитного сортирования, способны метаболизировать ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL), а также активно формировать капилляроподобные структуры в трехмерном пространстве в толще матригеля. Образованные клетками капилляроподобные структуры после фиксации окрашиваются антителами к маркеру CD31 (Рисунок 10, А – Г). Кроме того, данные клетки способны к наработке характерного эндотелиоцитам внеклеточного матрикса: фибронектина, коллагена I и IV (Рисунок 11). Культура гладкомышечных клеток, поддерживаемая на специфической селективной среде, активно нарабатывает характерный компонент межклеточного матрикса – эластин (Рисунок 12).

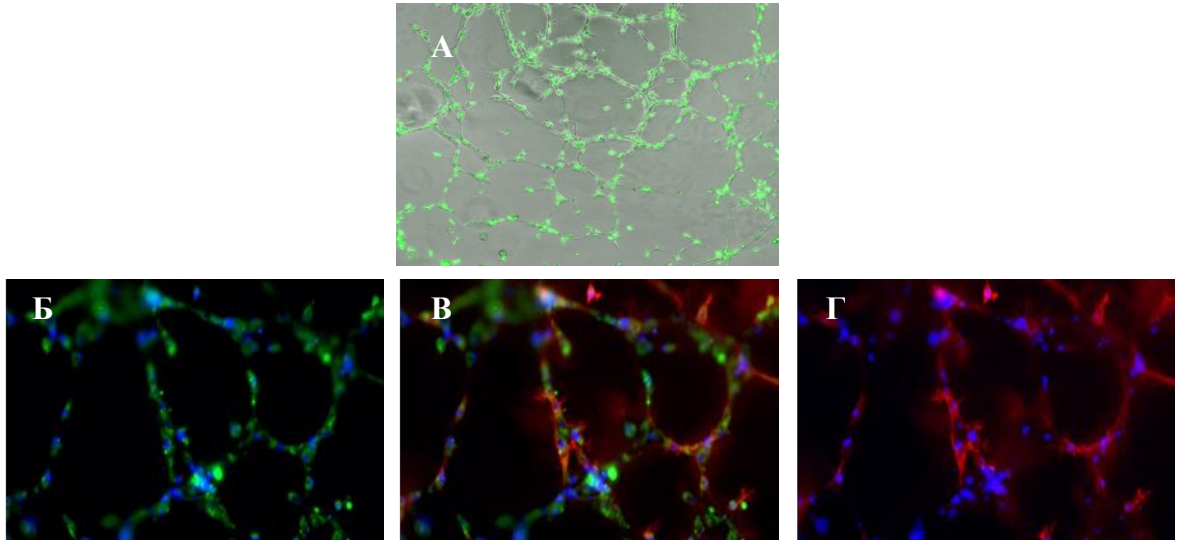


Рисунок 10 - Функциональная оценка эндотелиальных клеток in vitro

Примечание: А) сеть капилляроподобных структур в матригеле, образованных эндотелиальными клетками, сортированными по маркеру CD31 из кардиальных эксплантов человека; зеленым цветом показан метаболизированный acLDL; Б) метаболизирование acLDL данными эндотелиальными клетками, образующими капилляроподобные структуры в матригеле; В) окрашивание антителами к CD31; Г) совмещение

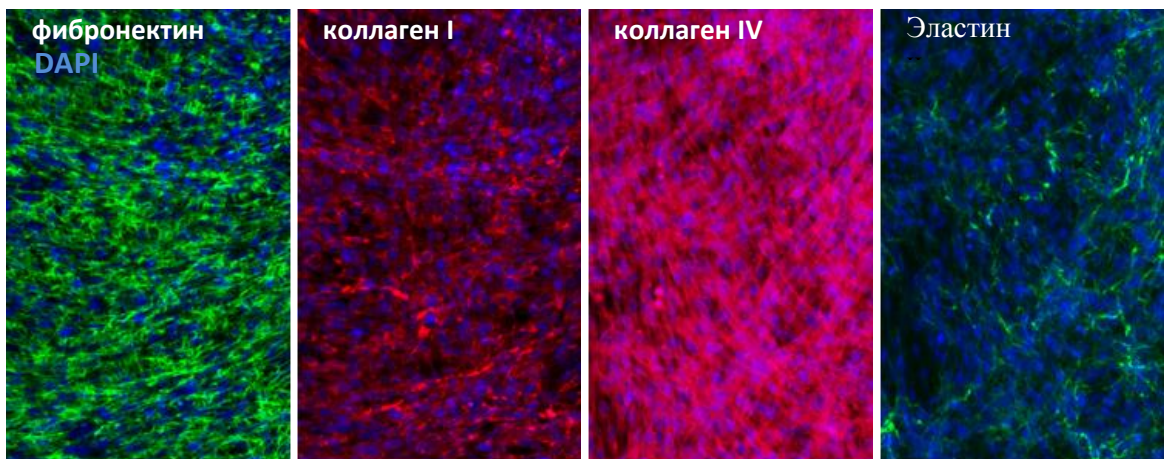


Рисунок 11. Иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток антителами к компонентам межклеточного матрикса

Примечание: Внеклеточный матрикс культуры ЭК (фибронектин, коллаген I и IV), сортированных по маркеру CD 31 из кардиального экспланта человека.

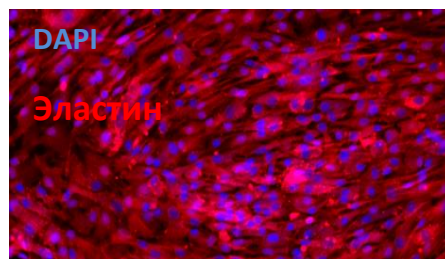


Рисунок 12 – Иммунофлуоресцентное окрашивание гладкомышечных клеток антителами к компонентам межклеточного матрикса

Примечание: Гладкомышечные клетки, выделенные на селективной среде из кардиального экспланта человека, окрашены антителами к компоненту внеклеточного матрикса – эластину. Окрашивание ядер с помощью DAPI.

3.2 Оценка функциональных свойств обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vivo*

3.2.1 Оценка функциональных свойств *in vivo* обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток на модели ишемизированной нижней конечности иммунодефицитных мышей *Nude*

Стандартным тестом для оценки функциональных свойств васкулярных клеток *in vivo* является эксперимент по реваскуляризации ишемизированной конечности мыши [132].

В ряде работ на модели ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей оценивали регенеративный потенциал разных типов клеток человека, применяемых и потенциально перспективных для применения в клинической практике: эндотелия пупочной вены (HUVEC), эндотелиальных производных клеток костного мозга, дифференцированных в эндотелиальном направлении производных эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [133]. Критериями оценки служат доплерометрические показатели изменения скорости кровотока после трансплантации исследуемых клеток, а также количественный анализ окрашенных сосудистых структур на гистологических срезах. Самые низкие показатели при оценке реваскуляризации ишемизированной конечности демонстрировали клетки HUVEC [133,134]. Наиболее высокие показатели выявлялись при одновременном введении в ишемизированную конечность эндотелиальных и муральных (гладкомышечные клетки и перициты) клеток [132]. Это доказывает значение взаимодействия эндотелиальных и гладкомышечных клеток в ангиогенезе. При этом большинство исследований свидетельствует о том, что реваскуляризация ишемизированной области происходит за счет привлечения трансплантированными клетками паракринных факторов, способствующих ангиогенезу, а не за счет пролиферации этих клеток и встраивания в сосудистую систему животного-реципиента.

Целью этого исследования была оценка функциональных свойств *in vivo* обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток на модели ишемизированной задней конечности иммунодефицитных мышей Nude. Мы анализировали способность к реваскуляризации ишемизированной области после введения исследуемых клеточных популяций.

Для проведения этого эксперимента мы исследовали 3 группы животных. Первая группа контрольная – в ишемизированную ткань вводили раствор (PBS) без клеток, вторая группа – в ишемизированную конечность вводили эндотелиальные клетки, в ишемизированные ткани третьей группы мы вводили смесь эндотелиальных и гладкомышечных клеток.

Для визуализации расположения клеток в ишемической области использовали эндотелиальные клетки, меченные прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM. Сигнал детектировали сразу после трансплантации клеток, на 7 и 14 день. Установили, что на 7 и 14 день после трансплантации сигнал детектировался в области исходной локализации (Рисунок 13).

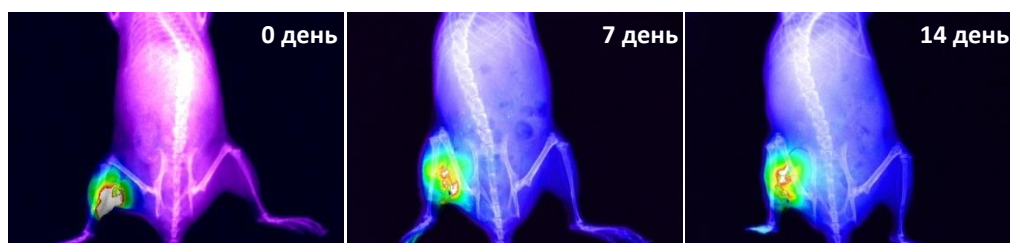


Рис. 13. Эндотелиальные клетки, меченные прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM.

Примечание: ЭК, введенные в ишемизированную конечность, не мигрировали и не покидали область введения течение до 14 дней.

Препараты гистологических срезов окрашивались флуоресцентно меченным маркером васкулярных клеток – изолектином GS-IB4 (Рисунок 14). Показали наличие изолектин-положительных структур на 7 и 14 день после инъекции эндотелиальных клеток и смеси ЭК и ГМК. Для сравнения окрасили изолектином неишемизированную конечность (рис 15).

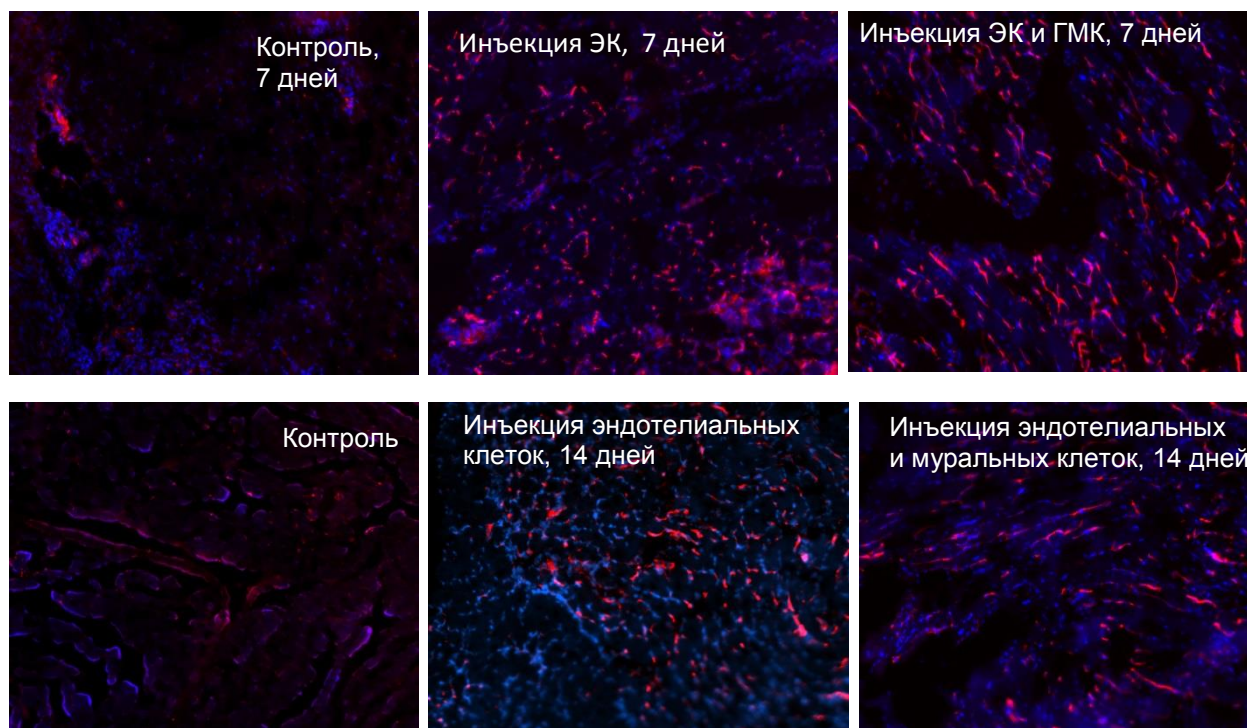


Рисунок 14. Окраска криосрезов ишемизированных нижних конечностей с Isolectin GS-IB4

Примечание: В криосрезках, где вводилась смесь ЭК и ГМК, и изолированные ЭК детектировалась флуоресценция изолектина (эндотелий). Окраска ядер с DAPI.

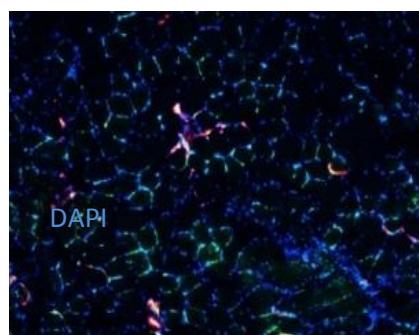


Рисунок 15. Окраска криосреза неишемизированной нижней конечностей с Isolectin GS-IB4.

Примечание: Выявлена флуоресценция изолектин-положительных структур (эндотелий).

Кроме того, на гистологических срезах задних конечностей мышей через 7 и 14 дней после инъекций клеток в ишемическую область провели оценку степени развития сосудов: количества, плотности и общей длины сосудов с помощью программного обеспечения Angio Tool (Рисунок 16).

Далее провели подсчет сосудов в 10 полях зрения на препаратах при 10-кратном увеличении, выделяя изолектин-положительные капилляры и сосуды. Степень развития изолектин-положительных структур на 14-й день после инъекции в трех группах различается. При введении смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток наблюдаются достоверно повышенные относительно контрольной группы (с инъекцией PBS) показатели общей длины и количества сосудов в поле зрения. Было отмечено, что инъекция PBS характеризуется низкой степенью развития сосудов в ишемической области: количество сосудов на 14 день составляет 365 в поле зрения, а площадь, занимаемая сосудистой сетью, составляет 5,6% от общей площади (Рисунок 16).

Общая длина сосудов в контрольной группе на 14 день составляет 12948 мкм, а в группах после инъекций эндотелиальных клеток и клеточной смеси составляет 32911 и 95376 мкм. В группе с введенными эндотелиальными клетками также прослеживается тенденция повышенных относительно контроля показателей общей длины и количества сосудов в поле зрения, однако эти показатели ниже соответствующих значений в группе с одновременно введенными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. На 14 день количество сосудов после инъекции эндотелиальных клеток и клеточной смеси составляло 1084 и 2158 в поле зрения соответственно, а площадь, занимаемая сосудистой сетью составляет 13% и 11% от общей площади. Плотность сосудов в контрольной группе более чем в 2 раза ниже по сравнению с экспериментальными группами. При этом значения данного критерия незначительно выше в группе с введенными эндотелиальными клетками по сравнению с группой смешанных клеток. Анализ гистологических срезов образцов нижних конечностей с инъекцией эндотелиальных и смеси эндотелиальных и гладкомышечных клеток выявил выраженное развитие сосудистой сети с высокой плотностью капилляров.

Таким образом, введение клеток способствует стимуляции реваскуляризации и стабилизации новых сосудов и подтверждает функциональность *in vivo* исследуемых клеточных популяций.

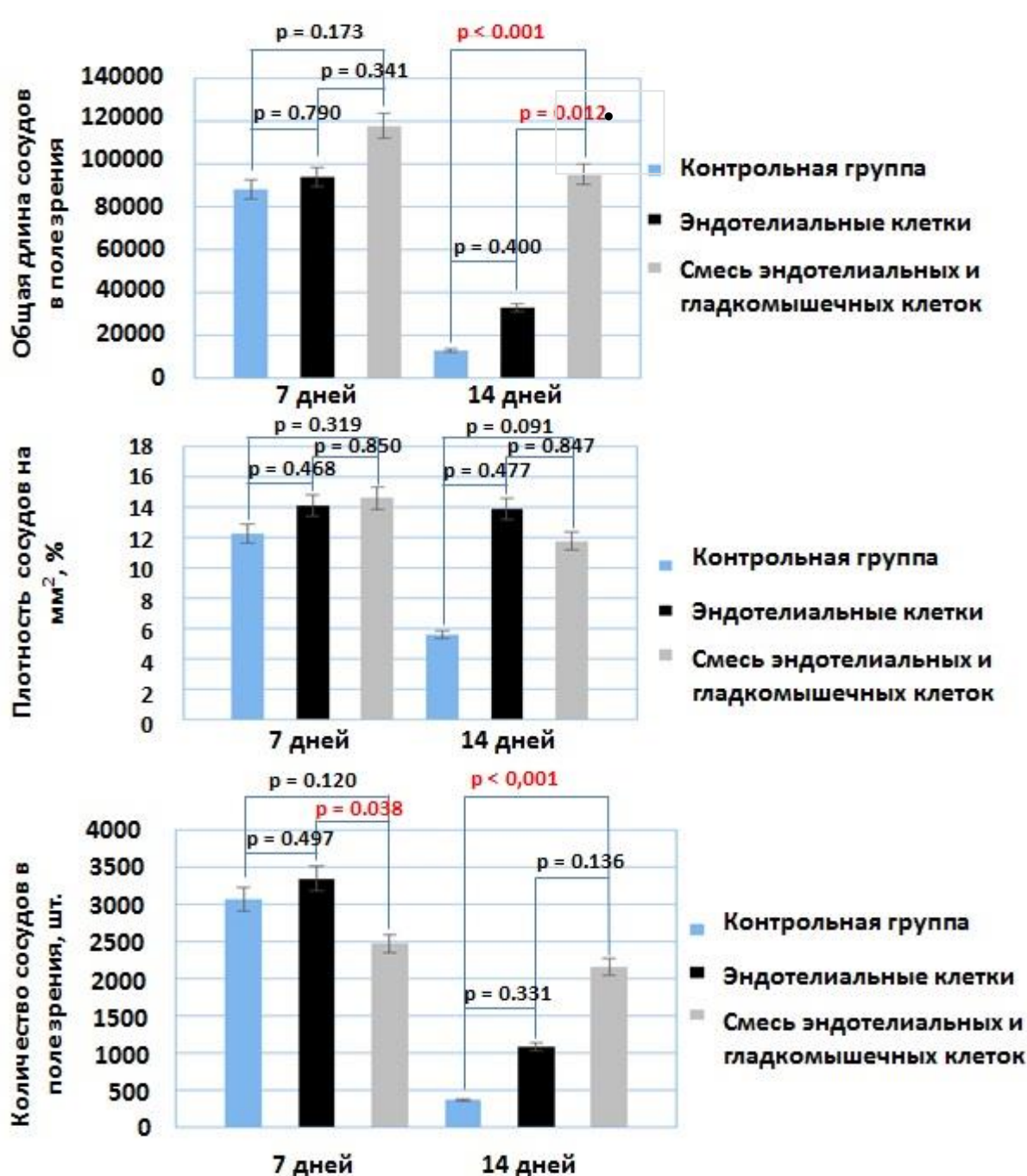


Рисунок 16. Гистограмма количества, плотности и общей длины сосудов на 7 и 14 день после инъекции клеток в ишемическую область

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

3.2.2 Оценка функциональных свойств эндотелиальных и гладкомышечных клеток *in vivo* в составе абдоминального матригельного трансплантата

Другим методом оценки функциональных свойств *in vivo* обогащенных культур эндотелиальных и гладкомышечных клеток является анализ степени развития капиллярной сети после введения клеток иммунодефицитным мышам SCID в составе абдоминального матригельного трансплантата.

В переднюю брюшную стенку подкожно вводили смесь клеток с матригелем. Животные были разделены на 3 группы. Первой, контрольной группе животных вводился матригель без содержания клеток. Второй группе вводился матригель с эндотелиальными клетками, третьей группе – матригель со смесью эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Для визуализации расположения клеток в области инъекции использовали эндотелиальные клетки, меченные прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM. Сигнал детектировали с помощью прибора Kodak In-vivo Multispectral Imaging System (рис.17). Препараты гистологических срезов окрашивались флуоресцентно меченным маркером васкулярных клеток – изолектином Б4. В результате исследования показано наличие в составе трансплантата изолектин-положительных структур на 14 день после трансплантации (рис. 18).

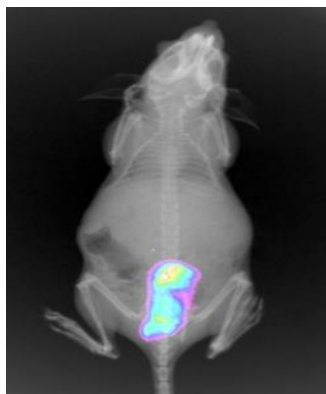


Рисунок 17. Эндотелиальные клетки, меченные прижизненным красителем MitoTracker DeepRed FM

Примечание: Введенные подкожно в переднюю брюшную стенку клетки в течении 14 дней не мигрируют с места первоначальной локализации.

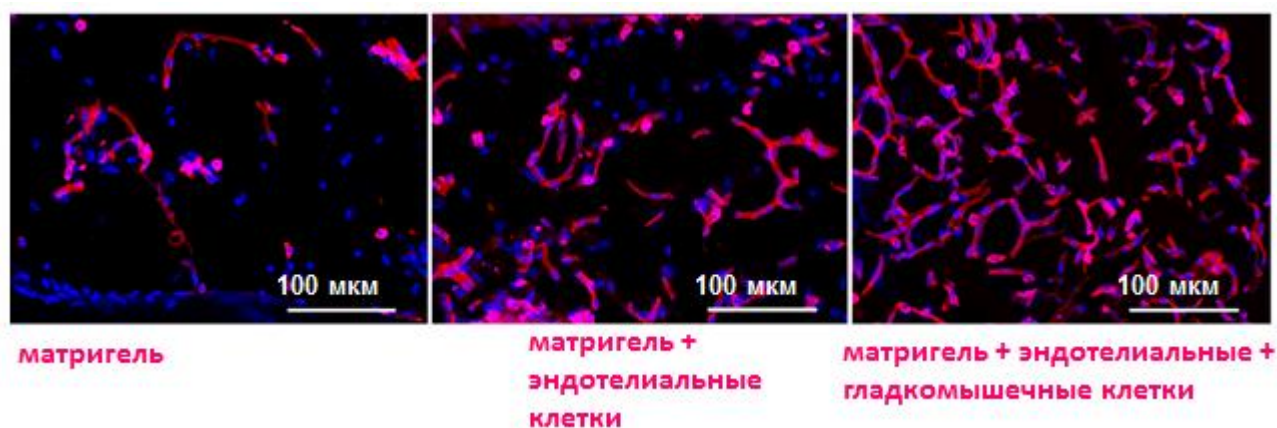


Рисунок 18. Окраска криосрезов ишемизированных нижних конечностей с Isolectin GS-IB

Примечание: Детекция изолектин позитивных структур в абдоминальном трансплантате

Анализ гистологических срезов образцов трансплантата в 10 полях зрения при помощи программы AngioTool (рис.19) показал, что количество сосудов в поле зрения при введении эндотелиальных клеток составляет 164 ± 57 , что достоверно больше, чем при контрольном введении бесклеточного трансплантата – 33 ± 15 . При этом совместное введение эндотелиальных и гладкомышечных клеток приводит к достоверно большему количеству сосудов – 508 ± 38 по сравнению с введением только эндотелиальных клеток и по сравнению с введением бесклеточного трансплантата. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение эндотелиальных клеток

способствует стимуляции ангиогенеза и подтверждает функциональность *in vivo* исследуемых клеточных популяций.

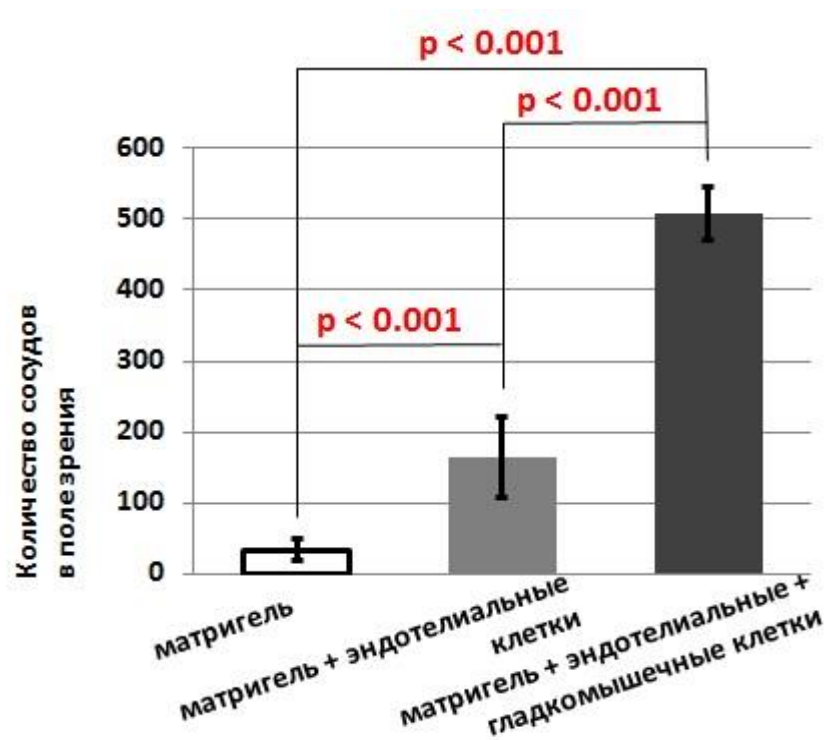


Рисунок 19. Гистограмма количества сосудов в поле зрения

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

3.3 Сравнительный анализ применения эндотелиальных и гладкомышечных клеток на синтетических и естественных материалах

Одна из ключевых задач тканевой инженерии сосудов – выбрать такой материал для 3D матрикса (каркаса), который будет поддерживать правильное взаимодействие между двумя ключевыми клеточными типами – эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками, обеспечивая правильное функционирование трансплантата. На функциональные свойства клеток существенно влияет микроокружение, в том числе заселяемая поверхность, под влиянием которой происходит модуляция паттерна характерных

поверхностных антигенов и способности нарабатывать межклеточный матрикс [135,136].

Мы изучили способность эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из кардиальных эксплантов человека, к адгезии и пролиферации на подложках из синтетических материалов, широко используемых в настоящее время в клинической практике: полиэтилентерефталате (ПЭТ, лавсан, дакрон, Intergard) и политетрафторэтилене (ПТФЭ, Gore-Tex), на подложке из ксеноперикарда (Neocor), а также на подложках из синтетических материалов поликапролактона (ПКЛ с МПВС) и полилактид-ко-гликолида (ПЛГА), полученных методом электроспиннинга в лаборатории молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН.

Ксеноперикард

Поверхность ксеноперикарда, используемого в клинической практике, заселялась сначала гладкомышечными клетками в количестве 3×10^5 клеток/см², заранее прижизненно окрашенными красным флуоресцентным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (MitoTracker). Заселенные гладкомышечными клетками поверхности помещались в обычные условия культивирования: 5% CO₂, 37°C. Через 24 часа другая сторона поверхности заселялась заранее прижизненно окрашенными эндотелиальными клетками в количестве 3×10^5 клеток/см². Окраска эндотелиальных клеток основана на их способности метаболизировать ацетилированную форму липопротеина низкой плотности (acLDL), в результате чего зеленый флуоресцентный краситель Alexa 488 инкорпорирует в цитоплазму клеток. Качественная оценка распределения клеточных типов проводилась спустя 48 часов от начала эксперимента. На поверхности ксеноперикарда происходило слабое заселение и неадекватная пролиферация гладкомышечных клеток (рис.20а). Анализ конфокальных микрофотографий позволяет заключить, что не происходит упорядоченного бинарного формирования клеточных слоев.

Ксеноперикард – один из наиболее используемых материалов в сердечно-сосудистой хирургии. Предварительная обработка перикарда позволяет избавиться от клеточных элементов. Использование ксеноперикарда для пластики сонных артерий приводит к рестенозам чаще, чем при аутоартериальной пластике. Возможно, это связано отсутствием клеток в стенке матрикса. Однако неудовлетворительное заселение клетками ограничивает использование этого материала для дальнейшего исследования. Слабое заселение перикарда клетками подтверждают и другие исследования [137,138], в которых отмечено, что после 16 часов заселенные клетки начинают постепенно терять свои витальные функции.

Децеллюляризованная гомоартерия

На поверхность децеллюляризованного сосуда заселялись эндотелиальные клетки в количестве 3×10^5 клеток/см², заранее прижизненно окрашенные красным флуоресцентным митохондриальным красителем MitoTracker DeepRedFM (MitoTracker). В течение часа эндотелиальные клетки успешно прикреплялись к внутренней поверхности сосуда, спустя 24 часа начинали активно пролиферировать. Наблюдения за клетками в течение 48 часов показали, что они не проникают внутрь сосуда, располагаются на поверхности графта и не формируют плотного монослоя (рис. 20 б).

Полиэтерэфторэтилен (ПТФЭ) и полиэтилентерэфталат (ПЭТ)

Поверхности из синтетических материалов ПТФЭ и ПЭТ, используемых в клинической практике, заселялись эндотелиальными клетками по вышеописанному протоколу. Перед заселением на поверхность из ПТФЭ эндотелиальные клетки окрашивались прижизненно MitoTracker DeepRedFM. Дальнейшие наблюдения показали, что в течение 48 часов не происходит нормального заселения поверхности и активной пролиферации заселенных клеток (рис 20 в).

Перед заселением поверхности из ПЭТ клетки также прижизненно окрашивались другим митохондриальным красителем – TMRM. Данный краситель флуоресцентно окрашивает митохондрии с ненарушенным мембранным потенциалом, т.е. является маркером живых клеток. Несмотря на то, что через 48 часов клетки на поверхности ПЭТ являются жизнеспособными и активно пролиферирующими, на данной поверхности не происходит формирования нормального монослоя (рис 20 г). Клетки прикрепляются к отдельным субъединицам синтетического волокна и распределяются вдоль каждой отдельной субъединицы. Для адекватного функционирования эндотелиальные клетки должны располагаться монослоем, сохранять характерные поверхностные антигены и нарабатывать компоненты межклеточного матрикса. Через 6 дней культивирования – времени, достаточного для наработки межклеточного матрикса монослоем эндотелиальных клеток на поверхности культурального пластика, в клетках на поверхности ПЭТ утрачивается специфический эндотелиальный маркер CD31, и они практически не нарабатывают фибронектин и коллаген.

В настоящее время протезы из ПТФЭ и ПЭТ широко используются для хирургии артерий малого диаметра при отсутствии подходящего аутотрансплантата. Однако они имеют высокую частоту рестеноза и окклюзии после имплантации [139]. Преэндартелизация может увеличить их тромборезистентность и улучшить проходимость шунтов малого диаметра [140,141]. До настоящего времени многочисленные исследования не определили четкого протокола заселения их клетками и периода предварительного культивирования *in vitro* [142]. При имплантации таких ТИС в аорту экспериментальным животным заселенные клетки смывались током крови. Эти исследователи показали, что инкубационный период для оптимального прикрепления клеток на ПЭТ и ПТФЭ может варьировать от 30 минут до 24 часов [143]. Однако для успешного функционирования тканеинженерного трансплантата необходимо обеспечить не только заселение

и пролиферацию клеток в составе протеза, но и сохранение их специфических антигенов и способности к наработке межклеточного матрикса. По полученным нами результатам ПЭТ, и ПТФЭ являются неоптимальными для клеточной модификации, поскольку функционального монослоя эндотелия не образуется на поверхности обоих типов протезов, заселенные клетки теряют свои специфические антигены и способность набирать межклеточный матрикс.

Поликапролактон(ПКЛ) и полилактид-ко-гликолид (ПЛГА)

Следующим материалом для заселения мы использовали заплату из ПКЛ с МПВС, с отличающимися поверхностями. Одна сторона имела более гладкую поверхность за счет плотно уложенных волокон полимера. На эту поверхность заселялись эндотелиальные клетки. На противоположной поверхности было большее расстояние между волокнами, что создает внешнюю шероховатость. Эту поверхность использовали для заселения гладкомышечных клеток. Между этими поверхностями располагался малопроницаемый внутренний слой (МПВС). Сначала заселялись ГМК в количестве 3×10^5 клеток/см², через сутки подложка переворачивалась и заселялась ЭК в том же количестве. Оценка заселения клеток при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания проводилась на 6-е сутки. Несмотря на активную пролиферацию и высокую плотность, ЭК располагались в разных плоскостях, не образуя монослой с четкими межклеточными границами, часто формируя несколько слоев (рис 19 д). ГМК утрачивали характерную веретеноподобную морфологию, ориентация актиновых волокон в них становилась более свободной, при этом они сохраняли способность к продукции внеклеточного эластина. Около половины эндотелиальных клеток, культивируемых на поликапролактоне, утрачивали экспрессию поверхностного антигена CD31. Несмотря на частичную утрату эндотелиального фенотипа, клетки успешно набивали внеклеточный матрикс – коллаген.

Аналогичным способом клетки заселяли на поверхность ПЛГА. В силу структурных особенностей матрикса эндотелиальные и гладкомышечные клетки изменяли свою морфологию, эндотелиальный маркер CD31 сохранялись лишь в части эндотелиальных клеток, в гладкомышечных клетках также менялись структура актиновых волокон. Тем не менее, детектировалась наработка внеклеточного коллагена и фибронектина (рис 19 е). На поверхности ПЛГА заселенные гладкомышечные клетки изменяли свою морфологию, часть эндотелиальных клеток теряли антигенную специфичность. Несмотря на это, детектировалась хорошая наработка фибронектина и коллагена клетками на этой поверхности. Учитывая то, что на поверхности заплат из ПКЛ и ПЛГА ЭК и ГМК экспрессируют характерные маркеры, сохраняют функциональные свойства, имеют тенденцию к образованию монослоя, эти синтетические материалы могут быть использованы как 3D матриксы для создания клеточно-заселенных тканеинженерных конструкций. В качестве источника клеток возможно использование послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека.

Таким образом, наши исследования показали, что ЭК и ГМК теряют функциональные маркеры при заселении на ксеноперикард, ПТФЭ, поэтому данные материалы не подходят для создания клеточно-заселенных трансплантатов. Несмотря на удовлетворительное заселение клетками поверхности децеллюляризованной гомоартерии, возможно, требуется ее дополнительная модификация в связи с тем, эндотелиальные клетки не формируют функционального монослоя. По результатам эксперимента, наиболее оптимальными для создания клеточно-заселенных тканеинженерных сосудов малого диаметра являются синтетические биodeградируемые ткани, полученные из волокон полимеров ПКЛ и ПЛГА.

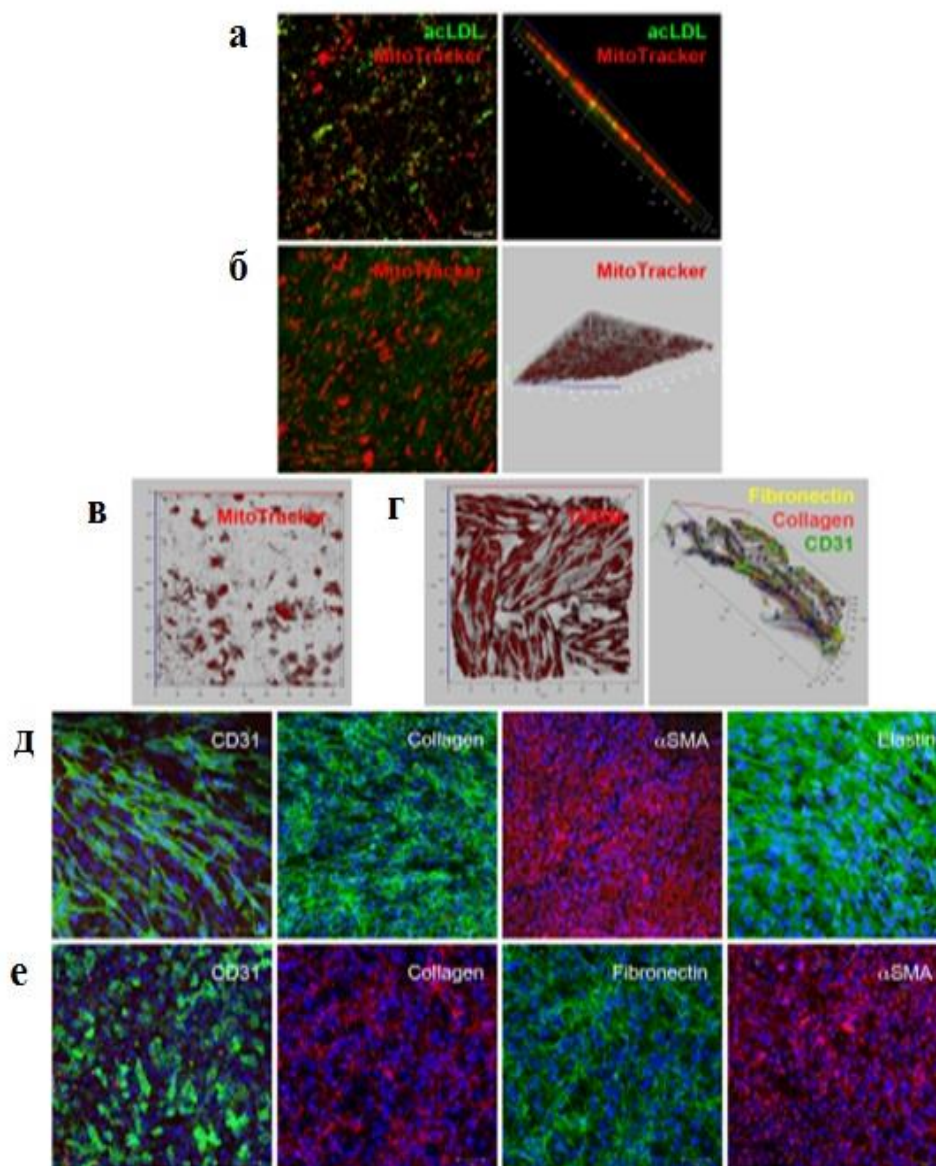


Рисунок 20. Клетки, заселенные на сосудистые матрицы

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

3.4 Эксперимент *in vivo*: оценка био- и тромборезистентности тканеинженерных конструкций из ПКЛ с МПВС, апплицированных донорскими ЭК и ГМК в эксперименте на иммунодефицитных мышах

В данном эксперименте мы исследовали способность ЭК и ГМК клеток, культивируемых на матриксе из ПКЛ с 10% желатина и малопроницаемым

внутренним слоем, сохранять свою жизнеспособность, функциональный статус и способность поддерживать формирование эндотелия в условиях непрерывного кровотока. Схема заселения 3D матрикса из ПКЛ с 10% желатином, представлена на рисунке №21.

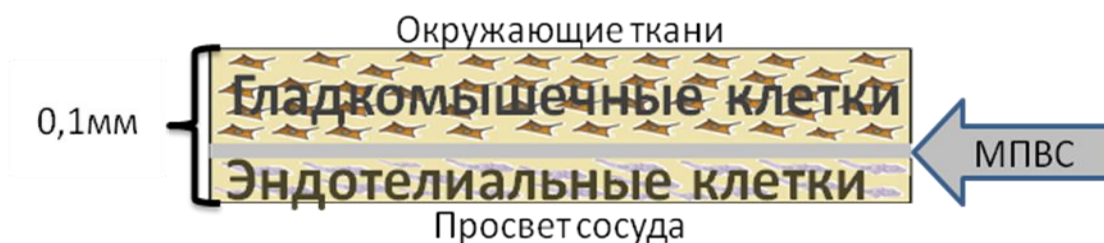


Рисунок 21. Схема заселения 3D матрицы из ПКЛ с МПВС эндотелиальными и гладкомышечными клетками

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

Для выполнения такого эксперимента нами был разработан дизайн исследования, представленный на рисунке 22. Оценка био- и гистосовместимости проводилась на 35 мышах. Чтобы исключить индукцию иммунного ответа на человеческие клетки, для эксперимента использовались иммунодефицитные мыши SCID линии $Cr1:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}$, которые содержались в ЦКП «SPF»-виварий ИЦиГ СО РАН.

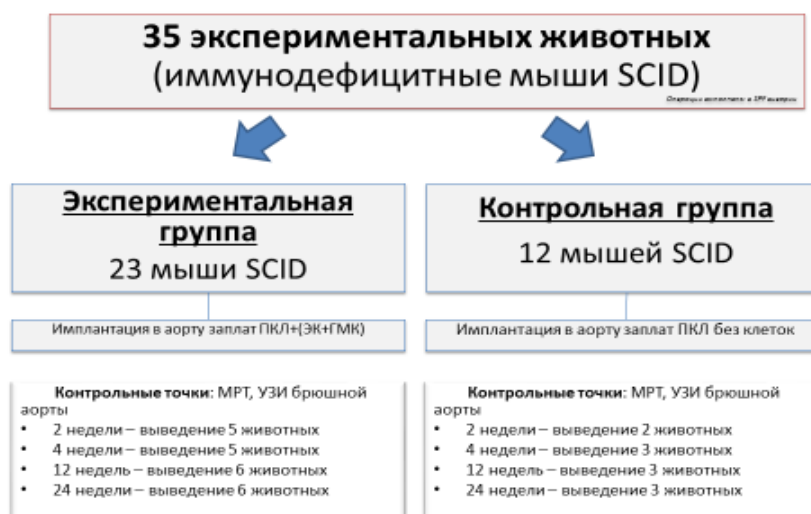


Рисунок 22. Дизайн эксперимента *in vivo*

Было прооперировано 35 мышей согласно протоколу (см. материалы и методы). Этапы имплантации заплаты показаны в рисунке 23. При прошивании нитями прорезывания и деформации заплат не отмечались. Места проколов не зияли, кровотечения из них после запуска кровотока не было. Это связано с наличием в этих 3D матрицах среднего слоя - МПВС, выступающего в роли эластомерного слоя, плотно обволакивающего нить и герметизирующего прокол. Заплата к аорте прилегала плотно за счет волокнистой структуры, которая обеспечивала многочисленные контакты со стенкой аорты. Хирургически значимого кровотечения после запуска кровотока не было, гемодинамически значимой деформации области имплантации заплат не наблюдалось, пульсация аорты проксимальнее и дистальнее места операции была удовлетворительной. Достоверной разницы времени операции, времени окклюзии аорты и гемостаза между 2мя группами не выявлено (таблица 3).

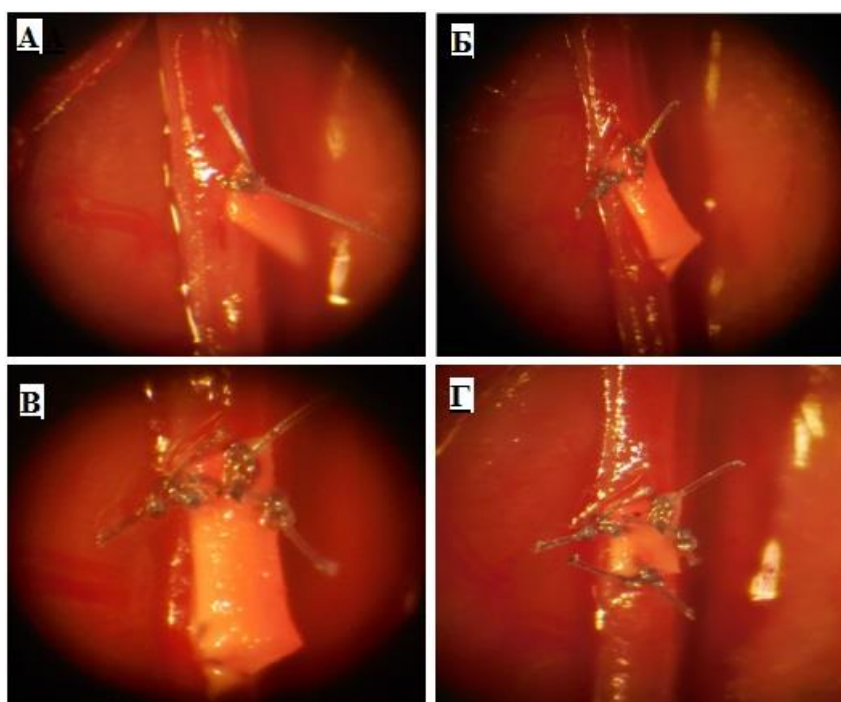


Рисунок 23. Заплата, имплантированная в брюшную аорту мыши

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

Согласно дизайну исследования, мыши были разделены на 2 группы: 1-ая группа экспериментальная – в брюшную аорту имплантировалась заплата из ПКЛ с МПВС, заселенная ЭК и ГМК, 2-я группа контрольная – в брюшную аорту имплантировалась заплата из ПКЛ с МПВС без заселения клеток. Достоверных различий некоторых параметров в этих двух группах не выявлено (таблица 3)

Таблица 3

Характеристика прооперированных животных

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

По одной мышце из каждой группы на вторые сутки после операции умерли от тромбоза брюшной аорты. На первые сутки после операции у обеих умерших мышцей наблюдалась тотальная мышечная контрактура задних конечностей вследствие тромбоза аорты. Вероятно, аорта была критически сужена при наложении сосудистых швов. Одна мышца из контрольной группы на 20 неделе умерла по причине, не связанной с оперативным вмешательством. Остальные мыши в течение 24 недель были живы. Достоверных различий в продолжительности операций и окклюзий аорты в экспериментальных группах не выявлено (таблица 4). На каждой точке у всех мышцей оценивалась проходимость брюшной аорты при помощи УЗИ и МРТ.

Продолжительность операции и окклюзии аорты в экспериментальных группах

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

Результаты УЗИ и МРТ брюшной аорты исследуемых мышей представлены на рис. 21 и 22. По результатам ультразвукового триплексного исследования у всех мышей контрольной и экспериментальной групп на всех контрольных точках брюшная аорта была проходима, скорости кровотока в пределах нормы с магистральным типом кровотока (рисунок 24). Учитывая сохранение нормального кровотока без повышения линейной скорости кровотока в области имплантированной заплаты мы исключили гемодинамически значимое сужение и/или окклюзия брюшной аорты. Таким образом, это указывает на то, что имплантированные заплаты в обеих группах обеспечивают хорошую тромборезистентность в течение 24 недель.

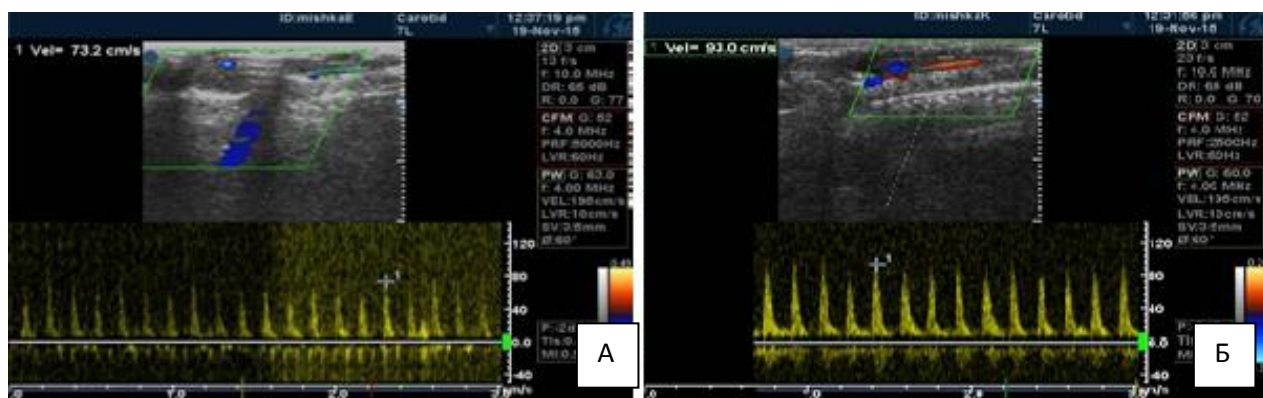


Рисунок 24. Дуплексное сканирование аорты в области имплантированной заплаты через 2 недели после операции. Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Израиль)

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

Таблица 5

Ультразвуковая характеристика кровотока в оперированной аорте

Тип заплаты	Линейная скорость кровотока в зоне имплантации заплаты на 4 неделе наблюдения (см/сек)			Р
	Проксимальнее заплаты	В области заплаты	Дистальнее заплаты	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	74,47 [70,02; 78,93]	84,82 [79,54; 90,11]	81,13 [77,97; 84,28]	0,36
Заплата из ПКЛ без клеток	77,66 [72,09; 83,23]	81,25 [74,83; 87,66]	85,75 [82,64; 88,85]	0,09
Р	0,93	0,10	0,49	

Примечание: Как видно из таблицы 5 характеристики кровотока на 4 неделе наблюдения в исследуемых группах не отмечались.

Таблица 6

Ультразвуковая оценка кровотока в оперированной аорте

Тип заплаты	Линейная скорость кровотока в зоне имплантации заплаты на 24 неделе наблюдения (см/сек)			Р
	Проксимальнее заплаты	В области заплаты	Дистальнее заплаты	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	84,69 [81,62; 87,76]	83,69 [80,41; 86,97]	83,78 [79,88; 87,67]	0,66
Заплата из ПКЛ без клеток	83,58 [78,80; 88,35]	84,33 [79,32; 89,33]	83,01 [77,76; 88,23]	0,45
Р	0,15	0,63	0,10	

Примечание: Как видно из таблицы 6 – характеристики кровотока на 24 неделе наблюдения в исследуемых группах не отмечались.

По данным ультразвукового доплеровского сканирования, линейная скорость кровотока (ЛСК) в области имплантации заплаты достоверно не отличалась между двумя группами ($p > 0,10$) на 4 неделе наблюдения (таблица 5). Аналогично достоверной разницы линейной скорости кровотока через 24 недели между экспериментальной и контрольной группами также не выявлено (таблица 6). Средняя линейная скорость кровотока в брюшной аорте у неоперированных мышей была равна 87,51 см/с.

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

группах визуализированы брюшная аорта и подвздошные артерии без дефектов наполнения, что исключало гемодинамически значимые стенозы или окклюзии брюшной аорты. Отсутствие аневризм и разрывов заплат характеризует их механическую прочность (рис 25).

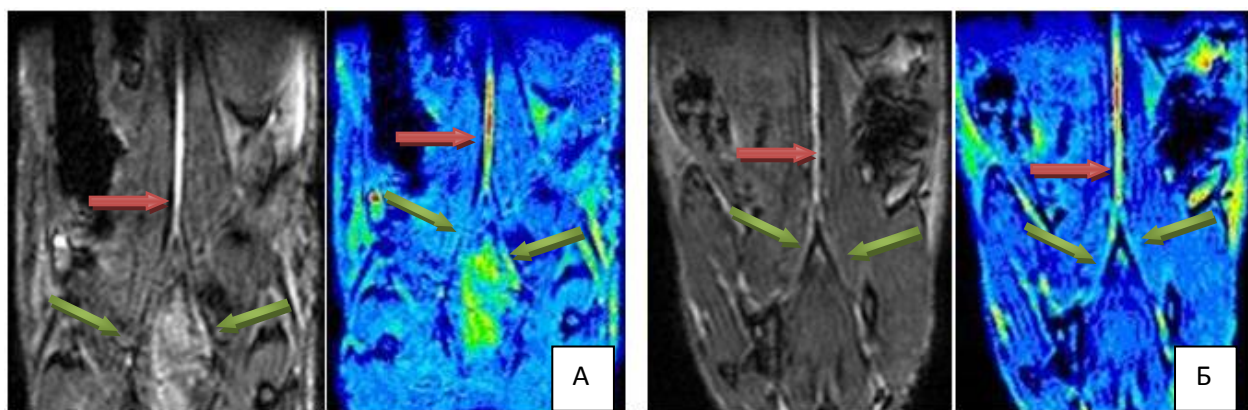


Рисунок 25. МРТ брюшной аорты в ангиорежиме через 4 недели после операции. BioSpec 117/16 USR (Bruker)

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

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

При выделении брюшной аорты в экспериментальной группе, где имплантированы заплаты с ЭК и ГМК человека, визуально отмечалась выраженная локальная неоваскуляризация в области наружной поверхности имплантированной заплаты (рис 26А), в отличие от контрольной группы (рис 26Б), где количество новообразованных сосудов было мало. Такое различие подтверждает наличие паракринного эффекта апплицированных на заплаты клеток.

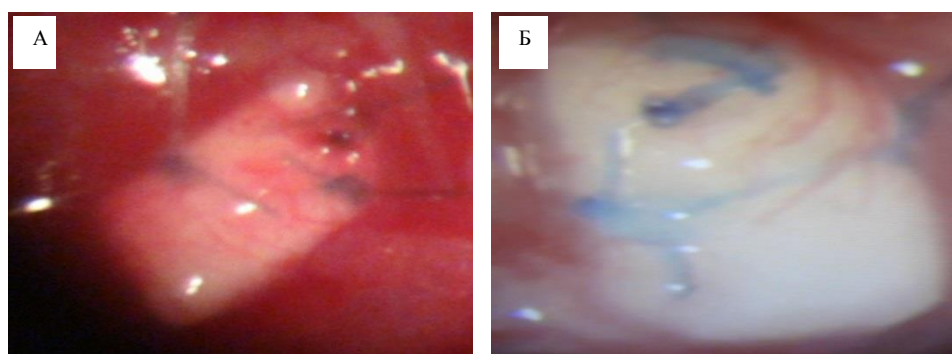


Рисунок 26. Имплантированные в брюшную аорту заплаты

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

Для того, чтобы доказать то, что имплантированные в дефект брюшной аорты заплаты контактировали с кровотоком, после эксплантации аорты вместе с заплатой выполняли продольное рассечение задней стенки сосуда противоположной имплантированной заплате, таким образом, чтобы при разведении краев стенки аорты на внутренней ее поверхности определялась имплантированная заплата, контактирующая с протекающей кровью (рис 27). Визуально в этой области отмечалось незначительно углубление. Дном этого углубления являлась заплата, покрытая полупрозрачной пленкообразной субстанцией, переходящей на внутреннюю поверхность аорты.

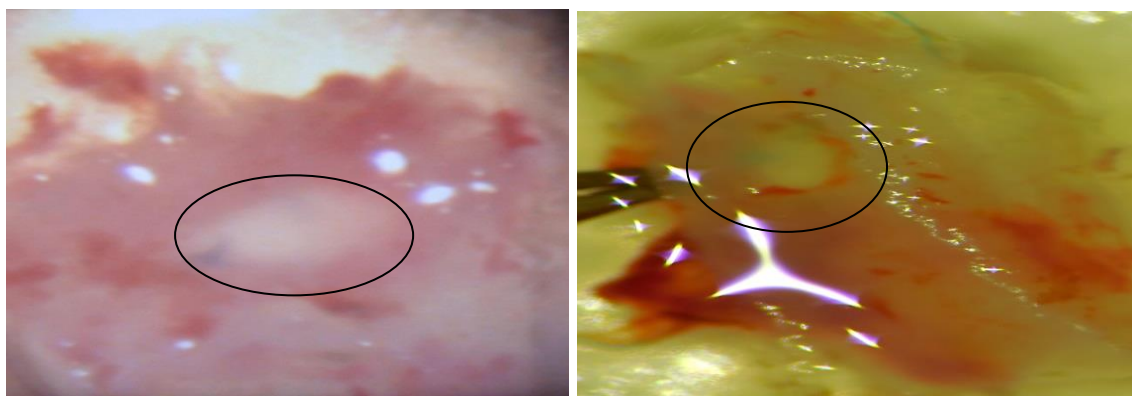


Рисунок 27. Имплантированные в брюшную аорту заплаты

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

До имплантации выполнено измерение толщины заплат. Выявлено незначительное утолщение клеточно-заселенных заплат в отличие от незаселенных. Такое утолщение, вероятно, связано с пропитыванием заплат в питательной среде во время клеточного заселения. Однако через 24 недели в экспериментальных заплатах изменения толщины не наблюдается. Толщина контрольных заплат через 24 недели после имплантации в брюшную аорту незначительно увеличилась, несмотря на это достоверной разницы не выявлено (таблица 7).

Таблица 7

Измерение толщины заплат

Тип заплаты	Толщина заплат в зависимости от срока наблюдения (мкм)		P
	До имплантации (мкм)	Через 24 недели после имплантации (мкм)	
Клеточно-заселенная заплата из ПКЛ	90,47 [89,51; 93,43]	90,30 [87,63; 92,97]	0,28
Заплата из ПКЛ без клеток	90,33 [87,00; 93,66]	91,41 [87,58; 95,25]	0,53
P	0,39	0,63	

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

При этом следует отметить, что толщина стенки предварительно клеточно-заселенных и незаселенных заплат на 24 неделе наблюдения значимо не влияла на показатели линейной скорости кровотока. Коэффициент корреляции в экспериментальной и контрольной группе был $R_{xy}=0,23$ (рис. 28) и $R_{xy}=0,37$ (рис 29) соответственно.

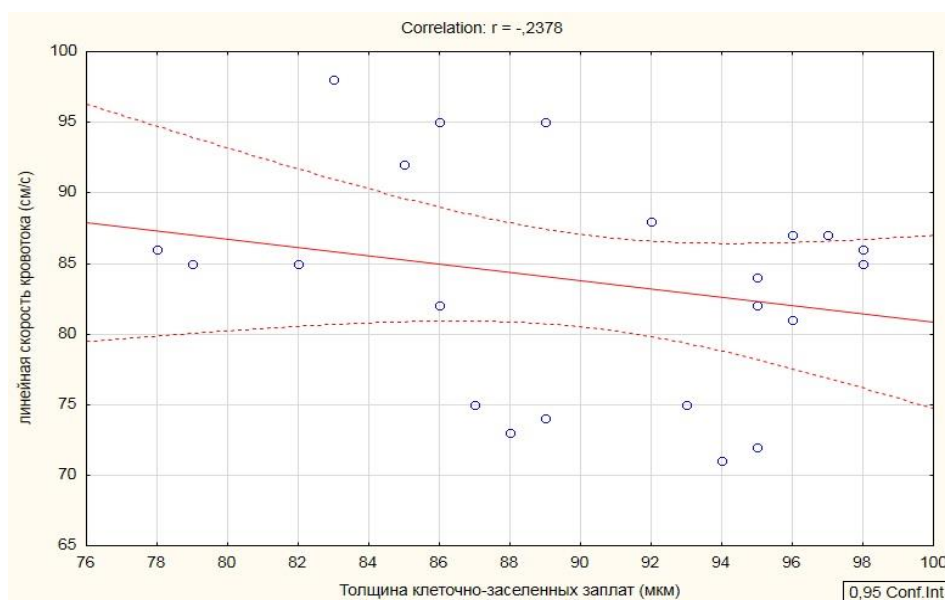


Рисунок 28. Корреляция толщины стенки клеточно-заселенных заплат и линейной скорости кровотока на 24 неделе наблюдения.

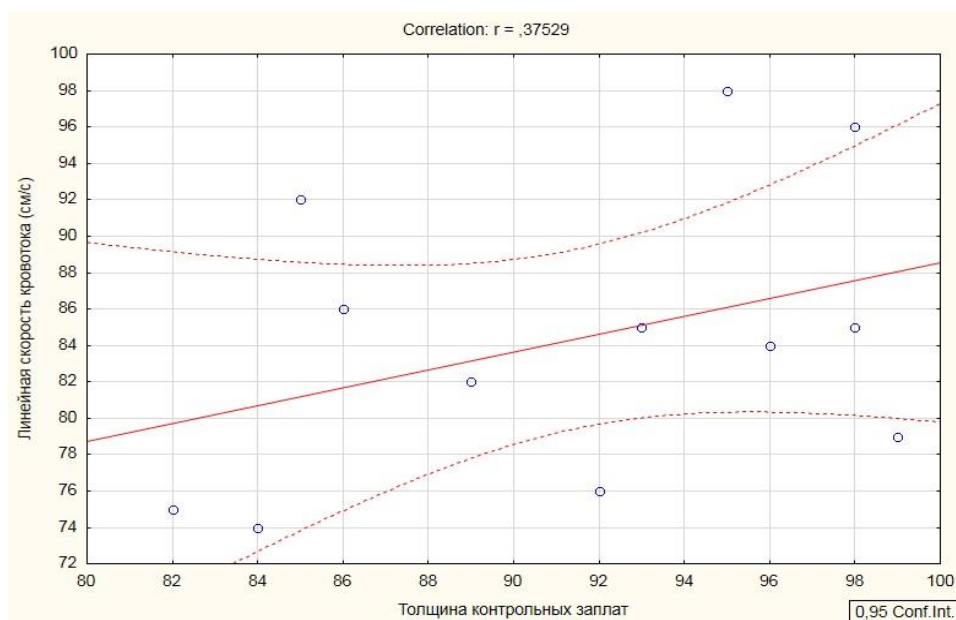


Рисунок 29. Корреляция толщины стенки не заселенных заплат и линейной скорости кровотока на 24 неделе наблюдения.

Для сравнения наличия клеточных элементов мы выполнили иммунофлуоресцентное окрашивание заплат, забранных у умерших на вторые сутки мышей. После окрашивания заплат красителем, который детектирует клеточные ядра (DAPI), выявлено, что в проекции клеточно-заселенной заплаты отмечается флуоресценция синего цвета – клеточные ядра. В контрольной группе в области заплаты наличие клеточных ядер было минимальным (рис. 30).

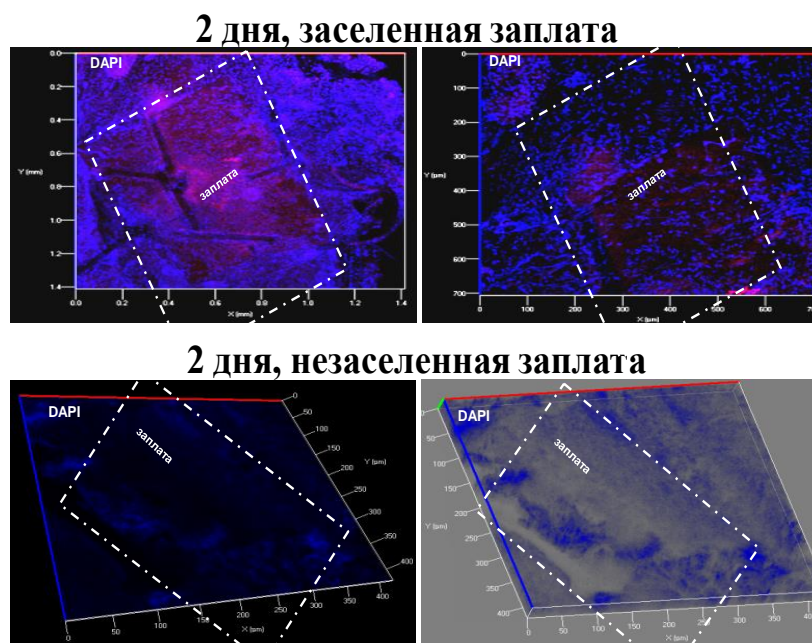


Рисунок 30. Иммунофлуоресцентное окрашивание заплат через 2 дня после имплантации

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

При исследовании предварительно заселенных заплат уже спустя 2 недели после имплантации на внутренней поверхности были обнаружены не только человеческие эндотелиальные клетки (hCD31), но и эндотелиальные клетки мыши (mCD31) (рис.31А). На 4 и 12 неделях по результатам исследований на внешней стороне заплат идентифицировались заселенные *in vitro* гладкомышечные клетки (αSMA, SMMHC), которые ограничивались проекцией заплаты. При этом мышинный маркер ЭК (mCD31) с 4 недели в области заплат не прослеживался. Несмотря на хорошую плотность клеточных ядер в области заплат, флуоресценция маркера человеческих ЭК на 24 неделе незначительно уменьшалась в отличие от 12 недель. Флуоресценция маркеров гладкомышечных клеток на 12 неделе ограничивалась пределами заплат, а на 24 неделе выходит за границы заплат. Кроме того, в экспериментальных заплатках динамика синтеза межклеточного матрикса на протяжении всего периода наблюдения остается удовлетворительной (рис. 31 Б-Г).

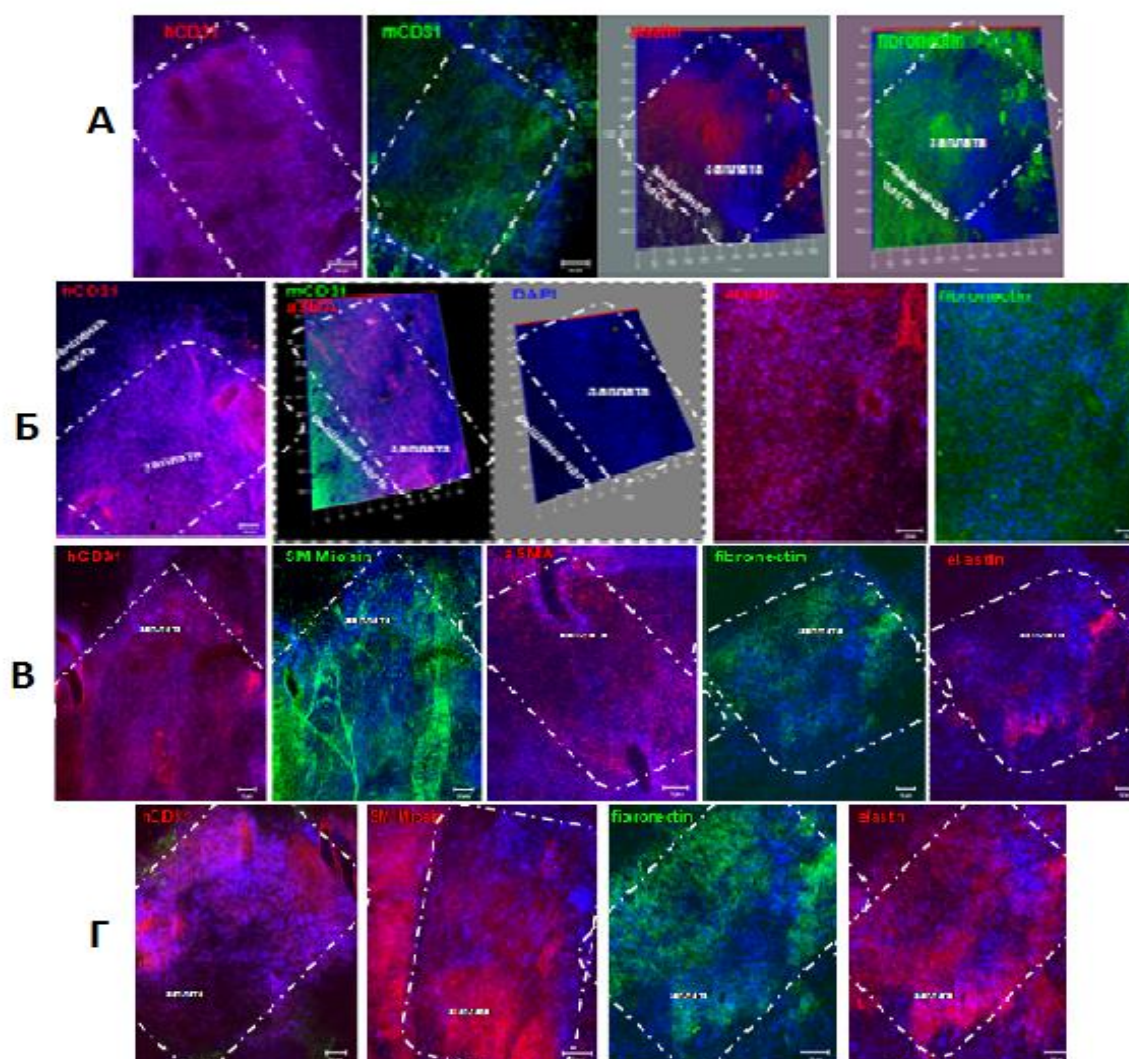


Рисунок 31. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточно-заселенных заплат на контрольных точках исследования

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

При исследовании незаселенных заплат было обнаружено, что спустя 2 недели после имплантации заплата заселяется собственными мышинными эндотелиальными и гладкомышечными клетками. При этом расположенные на заплате мышинные клетки были не склонны к наработке межклеточного матрикса. После 12 и 24 недель на предварительно незаселенных заплатках специфические маркеры ЭК и ГМК обнаруживались в незначительном количестве. Нарботка фибронектина эндотелиальными клетками в динамике уменьшалась, однако эластин, вырабатываемый гладкомышечными клетками сохранялся, хотя и в незначительном количестве (рис.32А-Г).

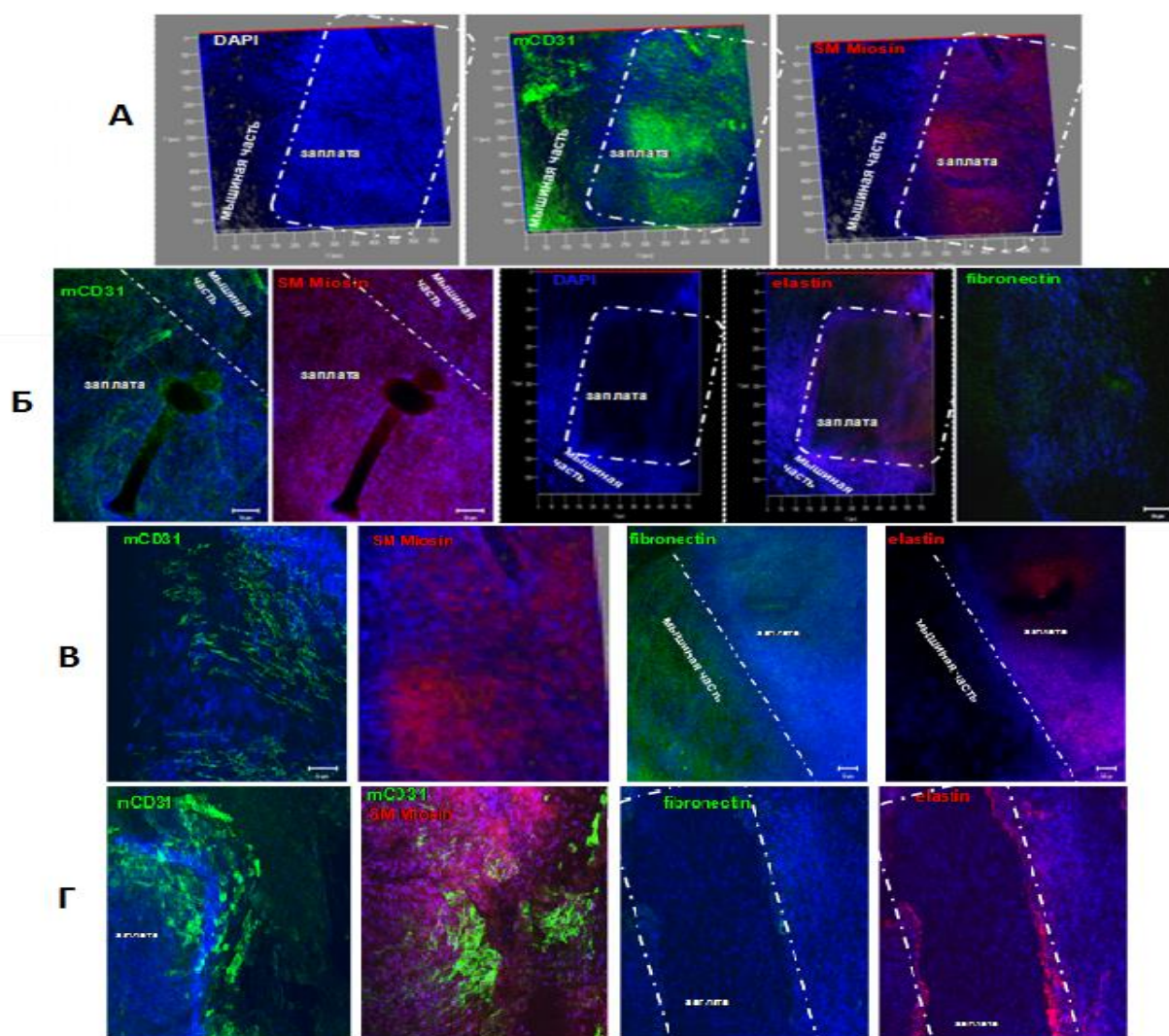


Рисунок 32. Иммунофлуоресцентное окрашивание заплат без клеточного заселения на контрольных точках исследования

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

Для того, чтобы оценить наличие человеческих клеток, которыми были заселены заплаты, дополнительно была выполнена флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) криосрезов трансплантатов с флуоресцентно-меченой ДНК человека и ДНК мыши. Было обнаружено, что в предварительно заселенных клетками заплатках отмечается ДНК мыши (mCot) и человека (hCot) (рис.33). Этот метод исследования также подтверждает, что заселенные человеческие клетки не теряются и поддерживают жизнеспособность в течение 4 недель в условиях непрерывного артериального кровотока.

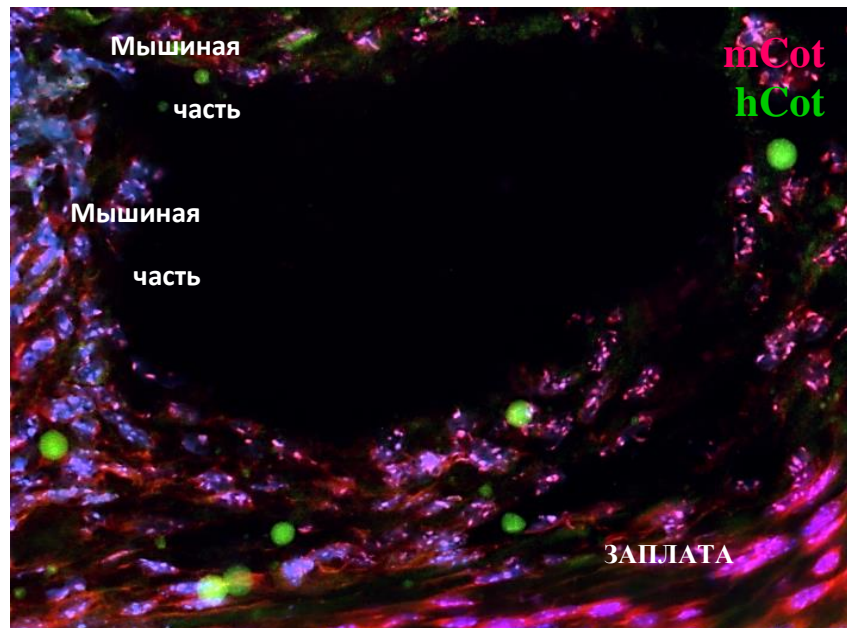


Рисунок 33. FISH (Флуоресцентная in situ гибридизация) криосреза трансплантата с зондами ДНК мыши (mCot) и человека (hCot).

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

Гистологическое исследование в экспериментальной группе показало, что ядра клеточных элементов в толще заплат прослеживаются на всем периоде наблюдения по всем контрольным точкам (рис. 34 А-Г). На внутренней стороне заплат, контактирующей с кровотоком, в течение всего эксперимента визуализировался монослой эндотелиоцитоподобных клеток. Уже со второй недели на наружной поверхности клеточно-заселенных заплат отмечается формирование фиброзной капсулы с постепенным ее утолщением. На всех сроках исследования новообразованная капсула состоит из плотной фиброзной ткани с большим содержанием клеток гладкомышечного и фибробластического типов с участками формирования микрососудов.

Клеточные ядра в толще контрольных заплат при окрашивании гематоксилином и эозином визуализируются на 2 и 4 неделях. Это указывает на то, что структура 3D матрикса не препятствует миграции клеток внутрь (рис.34 Д,Е). Несмотря на это, с 12 и 24 недели гистологические исследования показывают уменьшение количества клеточных ядер в составе заплат (рис.34

Ж,3). Вероятно, заплаты контрольной группы *in vivo* заселяются в первую очередь непролиферирующими клетками крови (например, лимфоцитами), которые впоследствии погибают путем апоптоза. Первичное заселение непролиферирующими клетками может создавать препятствие для миграции других клеток и формирования эндотелиального монослоя. В некоторых заплатках контрольной группы отмечались участки разрыхления и даже отсутствия волокон синтетической матрицы. В этих местах возникали как отдельные коллагеновые волокна, так и очаги фиброза. Можно предположить, что при отсутствии функциональных клеток в составе 3D матрикса происходит более быстрая его деградация, которая может привести к частичной потере структурной целостности заплат. По внутренней поверхности заплат контрольной группы на всех этапах исследования целостного монослоя эндотелиоцитоподобных клеток не было отмечено. В отличие от экспериментальной группы, наружная фиброзная капсула в этой группе характеризуется тонким слоем из плотной фиброзной ткани с незначительным содержанием фибробластоподобных клеток.

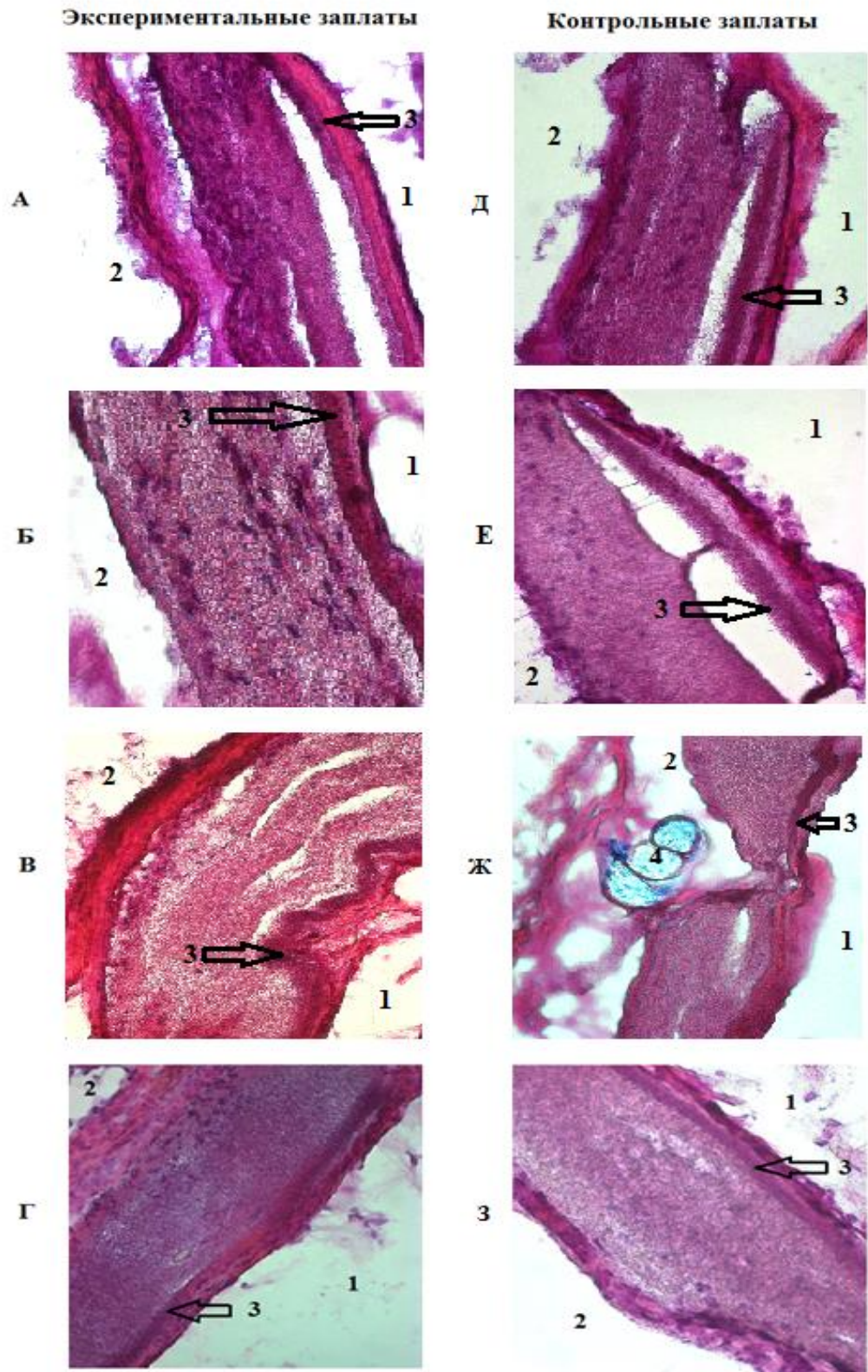


Рисунок 34. Окраска эксплантированных заплат гематоксилином и эозином.

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

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время для хирургического лечения сердечно-сосудистых заболеваний применяются аутологические сосуды и синтетические протезы. Для шунтирования артерий малого диаметра наиболее оптимальными являются аутовены, т.к. время проходимости этих шунтов больше, чем синтетических протезов. Однако аутологичные сосуды не всегда применимы в связи с их ограниченностью и наличия сопутствующих заболеваний (варикозная болезнь вен, перенесенные тромбозы вен и др.). Таким образом, разработка биомиметических тканеинженерных сосудов является актуальной задачей. Вероятно, клеточное заселение синтетических протезов уменьшит частоту рестенозов и тромбозов за счет способности сосудистых клеток вырабатывать биологически активные вещества, которые, в свою очередь, обеспечивают тромборезистентность и ингибируют гиперплазию интимы. В этой научной работе мы разработали протокол получения и провели исследование тканеинженерных сосудистых протезов с клеточным заселением.

Уже давно ученые обратили внимание на возможность терапевтического применения предшественников эндотелиальных клеток, позитивных по маркеру CD 34 (EPCs). Позже из периферической крови человека выделены две популяции клеток-предшественников (CD34 и VEGFR2), способных дифференцироваться *in vitro* в эндотелиальные клетки [102]. Популяции TRA-1-60 – и VEGF-R2+ популяцию клеток можно эффективно дифференцировать в гладкомышечном и эндотелиальном направлении с появлением характерных маркеров α -sma + и VE-cadherin+ соответственно [109,110]. Протоколы получения и дифференцировки ЭК и ГМК из различных источников разработаны и применены в тканевой инженерии [85]. Используются эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки костного мозга, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и др. Однако применение этих источников ограничены в связи с их сложностью получения. Поэтому

поиск новых источников ЭК и ГМК является очень актуальной задачей. Для нашей работы мы предложили получить ЭК и ГМК из кардиоэкспланта. Впервые нами разработан и применен протокол получения ЭК и ГМК из миокарда выходного отдела правого желудочка. Полученные нами клетки имеют маркеры эндотелиальных клеток CD31, и маркеры ГМК – α SMA. Ранее о способности эндотелиальных и гладкомышечных клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток, экспрессировать антигены CD31 и α SMA доложили Yamahara и др [132].

Нативный артериальный кровеносный сосуд кроме клеточных элементов состоит также и из внеклеточных структур, таких как коллаген, эластин и др. Последние, в свою очередь, являются каркасом сосуда, обеспечивающим механическую прочность, эластичность и участвуют при регенерации сосудов после повреждения [144,145,146]. Одной из важных характеристик клеток является способность наработки этих компонентов межклеточного матрикса и биологически активных веществ, которые характеризуют их функциональные свойства. Для функционирования эндотелиальные клетки должны прочно прикрепляться к внутренней поверхности сосуда, распространяться по ней и формировать монослой [147]. Эндотелиальные клетки, располагающиеся на контактирующей с кровью поверхности сосуда, синтезируют разнообразные активные вещества, такие как оксид азота, фибронектин, гепарансульфат, интерлейкин-1, тканевой активатор плазминогена, факторы для поддержания тонуса, структуры и тромборезистентности [148,149]. При помощи электронной микроскопии в полученных из кардиоэкспланта эндотелиальных клетках обнаружены структуры, называемые тельцами Вейбеля-Палладе. Это особые микровезикулы, которые детектируются в ЭК, они содержат P-селектин, фактор фон-Виллебранда, интерлейкин-8, эотаксин-3, эндотелин-1, ангиопоэтин-2, остеопоэтин, CD63 и другие биологически активные вещества. Известно, что при повреждении сосуда эти микровезикулы участвуют в процессе регенерации эндотелия [150]. Для функциональной характеристики

ЭК широко применяется «тест с матригелем». В составе матригеля эндотелиальные клетки способны образовывать тубулоподобные структуры [129,130]. В нашем эксперименте максимальное количество сосулоподобных структур, образованных эндотелиальными клетками после культивирования в составе матригеля, отмечалось через 16 часов. Липопротеиды низкой плотности, добавленные в этот раствор, были поглощены эндотелиальными клетками, что также характеризует их функциональные способности [131].

По литературным данным, предшественники сосулистых клеток (VPS), имплантированные иммунодефицитным мышам, были встроены в стенку кровеносных сосулов опухолей и значительно увеличили приток крови. Это позволяет предположить, что VPC могут способствовать усилению роста сосулов в ишемизированной ткани [151]. Yamahara и др. для оценки терапевтического эффекта ЭК и ГМК, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека, провели тест с ишемией задней конечности у иммунодефицитных мышей. Авторы отмечают хороший терапевтический эффект у мышей, которым они вводили смесь эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Результаты нашего исследования с ишемизированной задней конечностью у иммунодефицитных мышей NUDE показали, что общая длина сосулов и количество сосулов в поле зрения были достоверно выше по сравнению с контрольной группой, где клетки не вводились. Полученные результаты свидетельствуют о том, что совместное введение ЭК и ГМК способствует стимуляции к неоваскуляризации и стабилизации новообразованных сосулов и подтверждает функциональность *in vivo* исследуемых клеточных популяций. Вероятно, это в большей степени связано с паракринным эффектом введенных сосулистых клеток.

Для оценки паракринного эффекта сосулистых клеток также используется и другой метод. Суть этого метода заключается в том, что ЭК и ГМК в составе матригеля вводятся подкожно мышам. Матригель представляет собой растворимый экстракт базальной мембраны опухоли. Было

продемонстрировано, что при введении матригеля подкожно эндотелиальные клетки мигрируют в область инъекции и образуют капилляроподобные структуры. Эти новообразованные сосуды могут содержать эритроциты, которые указывают на то, что они являются функциональными капиллярами [152]. Для анализа паракринных свойств мы имплантировали смесь клеток с матригелем в переднюю брюшную стенку иммунодефицитным мышам SCID. Через 14 дней сделали криосрезы передней брюшной стенки с матригельной областью для анализа количества новообразованных сосудов. В результате, подобно предыдущим результатам, в группе, где вводились ЭК и ГМК, количество новообразованных сосудов было достоверно выше, чем в контрольных группах (матригель+ЭК и матригель).

После получения функциональных эндотелиальных и гладкомышечных клеток из миокарда выходного отдела сердца человека следующей задачей стал выбор оптимального сосудистого материала, который обеспечит удовлетворительную фиксацию, миграцию, пролиферацию клеток с сохранением функциональных свойств.

В доступной научной литературе описано множество попыток изготовления 3D матриксов для тканевой инженерии сосудов. Были протестированы как синтетические, так и природные полимеры, стабильные и биodeградирующие полимеры [8,42]. Были предприняты попытки изготовления клеточно-наполненных матриксов. Тем не менее, до настоящего времени широкого применения в клинической практике такие протезы сосудов и материалы, из которых они изготовлены, не получили. Первые попытки их клинического применения имели место в педиатрии и в качестве гемодиализных шунтов [121,73]. Проблемы протезирования сосудов маленького диаметра упираются в необходимость формирования однослойного эндотелия, нормальное функционирование которого необходимо для предотвращения гиперплазии интимы и стенозирования протеза или места восстановления дефекта в длительной перспективе.

Несмотря на ряд неудачных попыток заселения протезов сосудов клетками перед их имплантацией, такой способ подготовки протеза к заселению рассматривается как перспективный [139-141]. Действительно, не только клетки как таковые, но и «подготовленная» такими клетками среда (внеклеточный матрикс, а именно его состав, ориентация и т.д.) могут обеспечить наиболее привлекательные условия для адгезии клеток-предшественников эндотелиоцитов и пролиферации эндотелиальных клеток в замещаемом участке [14,15].

В соответствие с имеющимися данными после имплантации протезов сосудов с заранее сформированным эндотелиальным слоем большинство клеток открепляются от внутренней стенки в процессе операции или под действием тока крови [19,162,163]. Оставшиеся клетки, тем не менее, своим паракринным эффектом могут предотвратить острый тромбоз трансплантатов в раннем послеоперационном периоде [164,165].

Как уже упоминалось во введении, прочность связывания клеток с матриксом зависит как от прочности взаимодействия клеток с материалом, так и от структуры материала [166]. В нашем исследовании *in vitro* мы установили, что структура 3D матрицы из ПКЛ с МПВС способствует миграции клеток в толщу заплат с обеспечением хороших условий для жизнедеятельности иммигрировавших клеток. Narutoshi и др. предполагают, что заселенные клетки погибают путем апоптоза [75,121], хотя еще одним фактором, уменьшающим количество прикрепленных к поверхности полимерных матриксов клеток, является также их механическое смывание [143,162,163].

Наши исследования показали, что ксеноперикард [137, 138], ПТФЭ, ПЭТ [139-143] не подходят для создания клеточно-заселенных трансплантатов. Несмотря на удовлетворительное заселение клетками поверхности децеллюляризованной гомоартерии, возможно, требуется его дополнительная модификация в связи с тем, что клетки не мигрируют в толщу его

стенки [86-88]. По результатам эксперимента, наиболее оптимальными для создания клеточно-заселенных тканеинженерных сосудов являются синтетические биodeградируемые ткани, полученные методом электроспиннинга из волокон полимеров поликапролактона (ПКЛ) и полилактид-ко-гликолида (ПЛГА), т.к. они обеспечивают более удовлетворительное заселение клетками, их адгезию и пролиферацию.

Для анализа тромборезистентности выбранного нами клеточно-заселенного синтетического материала следующим этапом мы провели эксперимент *in vivo* с имплантацией этих заплат в брюшную аорту иммунодефицитных мышей SCID.

По литературным данным, для изучения тканеинженерных сосудов были использованы разные виды животных, такие как свиньи, овцы, собаки, кролики, крысы и мыши. Позиции для имплантации выбирались в зависимости от диаметра и прочности полученных трансплантатов. Выполняли имплантации в сонные артерии, брюшную аорту, подвздошные артерии и в нижнюю полую вену [86,88,95,155].

Встречаются работы применения тканеинженерных конструкций в клинической практике. В 2010 году ТИС, состоящий из биоразлагаемого каркаса с аутологичными мононуклеарами костного мозга, был использован в качестве cavo-пульмонального шунта у пациентов с врожденным пороком сердца. За 5 лет наблюдения не наблюдалось развития аневризмы, разрыва имплантата, инфекций и кальцификации. Пристеночный тромбоз тканеинженерного шунта у одного пациента был успешно пролечен с варфарином. Проподимость трансплантата после сужения успешно восстановлены путем чрескожной баллонной ангиопластики [121]. В другом клиническом исследовании полученные ТИС в качестве артериовенозных шунтов для гемодиализа были проходимы в течение 11 месяцев и не вызывали иммунного ответа [73].

В нашей работе для исключения иммунопатологического ответа на человеческие клетки при имплантации в брюшную аорту выбранного клеточно-заселенного материала мы использовали иммунодефицитных мышей SCID. В литературе встречаются работы, в которых для подавления иммунитета у животных при ксенотрансплантации используются фармакологические препараты [156,157,158]. Однако на данный момент существуют специальные линии мышей и крыс, в которых иммунитет ослаблен или отсутствует. Эти животные имеют генетические мутации, в результате которых происходят нарушения развития и созревания лимфоцитов, что приводит к тяжелым иммунопатологиям. В связи с этим использование таких животных стало применимым и для изучения тканеинженерных сосудов с человеческими клетками.

В 2009 году Tamar и др. для исследования использовали иммунодефицитных мышей. Они сконструировали сосудистый каркас из биodeградируемых полимеров с внутренним диаметром 700 мкм. Получили ЭК и ГМК из аорты человека, которые культивировали в специальных коммерческих средах EGM и SmGM фирмы LONZA. Затем после заселения синтетической матрицы сосудистыми клетками выполнили имплантацию созданной тканеинженерной конструкции в брюшную аорту 30 мышам. За период наблюдения от 4 дней до 1 года случаев разрыва, тромбоза и стеноза транспланатов, по результатам УЗИ и микро-КТ ангиограмм, не наблюдалось. По гистологическому анализу все трансплантаты показали хорошее ремоделирование с формированием монослоя эндотелия, а гладкомышечный слой содержал ГМК и межклеточный матрикс (коллаген, эластин) [159]. В нашем исследовании источником ЭК и ГМК является миокард человека, из которого, по литературным данным, сосудистые клетки ранее не выделяли. Стоит отметить, что доля ГМК среди клеток, выделенных из миокарда, изначально составляла 88%. При культивировании этих клеток в среде SmGM доля ГМК клеток увеличилась до 94%. ЭК клетки после магнитного сортирования

культивировали в среде EGM. Важно отметить, что при хирургическом лечении сосудов используют не только трубчатые протезы, но и часто выполняются пластические операции при помощи синтетических или биологических заплат. Именно такой подход был использован в представленном исследовании: для имплантации в брюшную аорту мышам в качестве заплат мы использовали 3D матриксы из ПКЛ с МПВС с толщиной 50-70мкм, размером 500x500мкм.

Для контроля были исследованы 3D матриксы без клеток, так как многие авторы предполагают, что бесклеточные трансплантаты могут не уступать в биосовместимости и тромборезистентности клеточно-заселенным трансплантатам. В 2014г. S.Tara и др. провели эксперимент, в котором прооперировали 28 мышей. Они разработали тканеинженерный сосуд из биоразлагаемых полимеров с внутренним диаметром 500-600мкм, толщиной стенки 250 мкм. В послеоперационном периоде проводили неинвазивную диагностику УЗИ и КТ ангиографию. Период наблюдения составляли от 4 до 12 месяцев. По результатам КТ ангиографии исследователи установили аневризматические изменения почти половины имплантированных трансплантатов. По гистологическим срезам было выявлено образование монослоя интимы и гладкомышечного слоя с высоким содержанием эластина и коллагена. Через 12 месяцев на некоторых трансплантатах наблюдались кальцифицированные отложения, активность макрофагов в области остаточного синтетического материала была выше, чем в нормальной аорте. Это указывает на длительную воспалительную реакцию на синтетический полимерный сосудистый каркас [160]. В нашем исследовании, по данным результатов иммунофлуоресцентного окрашивания, в группе, в которой мы исследовали бесклеточные 3D матрицы через 24 недели после имплантации, отмечается минимальное содержание коллагена и эластина, в отличие от экспериментальной группы, где наработка межклеточного матрикса оставалось удовлетворительной в течение этого периода.

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

Одним из важных требований для тканеинженерных 3D матриксов является инфильтрация клеток в толщину стенки трансплантата для обеспечения поддержания жизнеспособности и способности наработки межклеточного вещества. T. Siguira и др. показали то, что тканеинженерные сосудистые матриксы *in vivo* после имплантации в брюшную аорты мышам не только могут инфильтрироваться клетками хозяина, но также обеспечивают наработку межклеточного матрикса заселенными клетками. При этом они выявили, что размеры пор не играют ключевую роль для миграции клеток [41]. Мы показали, что 3D матрицы из ПКЛ с МПВС тоже могут обеспечить миграцию клеток в свою стенку *in vitro* и *in vivo*. Мы отметили, что часть ЭК в экспериментальных заплатах в начальном периоде покидают заплату, а оставшиеся клетки прочно связываются волокнами заплат и остаются в течение 24 недель.

Возможность миграции клеток с наружной поверхности во внутреннюю поверхность стенки протеза показали V. Catto и др., имплантировав трубчатые

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

Учитывая то, что ЭК и ГМК выделяют ангиогенные факторы, можно предположить их паракринный эффект, который наблюдается в нашей экспериментальной группе, где неоваскуляризация была более выражена, чем в контрольной группе без клеточного заселения.

ВЫВОДЫ:

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

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

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

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

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

матриков без клеточного заселения, и может быть использована в качестве сосудистого трансплантата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Миокард человека может быть источником получения эндотелиальных и гладкомышечных клеток для разработки клеточно-заселенных конструкций.
2. Для повышения количества эндотелиальных клеток в популяции, их следует культивировать в среде с факторами роста для эндотелиальных клеток (EGM) после обогащения методом магнитного сортирования. Для повышения количества гладкомышечных клеток в популяции, их следует культивировать в среде с факторами роста для гладкомышечных клеток (SmGM).
3. Учитывая хорошее сохранение жизнеспособности и функциональных свойств апплицированных клеток на 3D матриксах из ПКЛ с МПВС и ПЛГА, полученных методом электроспиннинга, эти материалы могут быть применимы для производства клеточно-заселенных сосудистых протезов.
4. Синтетическая 3D матрица из поликапролактона с малопроницаемым внутренним слоем, заселенная с внутренней стороны ЭК и наружной стороны ГМК человека, может быть использована для создания персонализированных сосудистых трансплантатов.

Список литературы

1. Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzner N.R. et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47(6): 1239–312.
2. Michael A. Seidman, MD, PhD1, Richard N. Mitchell, MD, PhD1, James R. Stone, MD, PhD2 Pathophysiology of Atherosclerosis. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease* (<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405206-2.00012-0>)
3. А.В. Гавриленко, Д.А. Воронов, Н.П. Бочков: Комплексное лечение пациентов с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных индукторов ангиогенеза: ближайшие и отдаленные результаты (*Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* Том VI, № 3, 2011 с 84-88)
4. H. Van Damme,1* L. Zhang,2 E. Baguet,1 E. Creemers,1 A. Albert2 and R. Limet: Crural Artery Bypass with the Autogenous Greater Saphenous Vein (*Eur J Vasc Endovasc Surg* 26, 635–642, 2003).
5. Frank B. Pomposelli, MD, Nikhil Kansal, MD, Alan D. Hamdan, MD, Alana Belfield, BA, Malachi Sheahan, MD, David R. Campbell, MD, John J. Skillman, MD, and Frank W. Logerfo. A decade of experience with dorsalis pedis artery bypass: Analysis of outcome in more than 1000 cases (*J Vasc Surg* 2003;37:307-15.)
6. M. Albers,2* M. Romiti,1 C.A.B. Pereira,3 M. Antonini1 and M. Wulkan: Meta-Analysis of Allograft Bypass Grafting to Infrapopliteal Arteries (*Eur J Vasc Endovasc Surg* 28, 462–472, 2004)
7. Maximiano Albers, Marcello Romiti, Francisco Cardoso Brochado-Neto and Carlos Alberto Bragança Pereira: Meta-analysis of alternate autologous vein bypass grafts to infrapopliteal arteries (*J Vasc Surg* 2005;42:449-55.)
8. Carlos Eduardo Pereira, MD,a Maximiano Albers, MD, PhD,a Marcello Romiti, MD, PhD,a Francisco Cardoso Brochado-Neto, MD, PhD,a and Carlos Alberto Bragança Pereira: Meta-analysis of femoropopliteal bypass grafts for lower extremity arterial insufficiency(*J Vasc Surg* 2006;44:510-7.)
9. Lam E, Landry G, Edwards J, Yeager R, Taylor L, Moneta G. Risk factors for autogenous infrainguinal bypass occlusion in patients with prosthetic inflow grafts. *J Vasc Surg* 2004;39
10. Maximiano Albers, Marcello Romiti, Francisco Cardoso Brochado-Neto, Nelson De Luccia, and Carlos Alberto Bragança Pereira: Meta-analysis of popliteal-to-distal vein bypass grafts for critical ischemia (*J Vasc Surg* 2006;43:498-503.)
11. Igor J. Rychlik, MB, MRCS,a Philip Davey, MB, MRCS,a Jamie Murphy, BChir, PhD,b and Mark E. O'Donnell, MMedSc, MD, FRCS: A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass(*J Vasc Surg* 2014;60:506-15.)
12. D. R. Duncan and C. K. Breuer, “Challenges in translating vascular tissue engineering to the pediatric clinic.,” *Vasc. Cell*, vol. 3, no. 1, p. 23, Jan. 2011.
13. M. Olausson, P. B. Patil, V. K. Kuna, P. Chougule, N. Hernandez, K. Methe, C. Kullberg-Lindh, H. Borg, H. Ejnell, and S. Sumitran-Holgersson, “Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study.,” *Lancet* (London, England), vol. 380, no. 9838, pp. 230–7, Jul. 2012.
14. J. G. Nemen-Guanzon, S. Lee, J. R. Berg, Y. H. Jo, J. E. Yeo, B. M. Nam, Y.-G. Koh, and J. I. Lee, “Trends in tissue engineering for blood vessels.,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 956345, Jan. 2012
15. S. Tara, K. A. Rocco, N. Hibino, T. Sugiura, H. Kurobe, C. K. Breuer, and T. Shinoka, “Vessel bioengineering.,” *Circ. J.*, vol. 78, no. 1, pp. 12–9, Jan. 2014.
16. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; 354: SI32 – SI34.

17. R. M. Nerem and A. E. Ensley, "The tissue engineering of blood vessels and the heart.," *Am. J. Transplant*, vol. 4 Suppl 6, pp. 36–42, Jan. 2004.
18. M. Pate, V. Damarla, D. S. Chi, S. Negi, and G. Krishnaswamy, "Endothelial cell biology: role in the inflammatory response.," *Adv. Clin. Chem.*, vol. 52, pp. 109–30, Jan. 2010.
19. H. Wang, J. Zhou, Z. Liu, and C. Wang, "Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 1044–55, May 2010.
20. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992;326:381-6.
21. Hirsch AT, Hartman L, Town RJ, Virnig BA. National health care costs of peripheral arterial disease in the Medicare population. *Vasc Med* 2008;13:209-15.
22. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013;382:1329-40.
23. Fowkes Fg, Housley E, Cawood Eh, Macintyre Cc, Ruckley Cv, Prescott Rj. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* 1991;20(2)
24. Hirsch A,Criqui M, Treat-Jacobson D, Regensteiner J, Creager M, Olin J et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001;286(11):
25. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation* 2004;110:738-43.
26. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45(Suppl S):S5-67
27. Selvin E, Erlinger Tp. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999e2000. *Circulation* 2004;
28. Mcdermott Mm, Criqui Mh, Greenland P, Guralnik Jm, Liu K, Pearce Wh et al. Leg strength in peripheral arterial disease: associations with disease severity and lower-extremity performance. *J Vasc Surg* 2004;39(3)
29. Widmer L, Biland L. Risk profile and occlusive peripheral arterial disease. *Proceedings of 13th International Congress of Angiology* 1985:28.
30. Kannel Wb, Skinner Jr Jj, Schwartz Mj, Shurtleff D. Intermittent claudication. Incidence in the Framingham Study. *Circulation* 1970;41(5)
31. Catalano M. Epidemiology of critical limb ischaemia: North Italian data. *Eur J Med*. 1993; 2: 1: 11–14.
32. Beard J, Gaines P, Earnshaw J. Management of acut lower limb ischaemia. *Vascular and Endovascular surgery*. 4th edition. 2009; 8: 129–146.
33. Davies B, Braithwaite B.D, Birch PA, et al. Acute leg ischaemia in Gloucestershire. *Br J Surg*. 1997; 846: 504–8.
34. Ebskov B. Relative mortality and long term survival for the non-diabetic lower limb amputee with vascular insufficiency. *Prosthetics and Orthotics International*.1999; 23: 3: 209–216
35. Pell J. Association Between Age and Survival Following Major Amputation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999; 17; 2: 166–169.
36. The i.c.a.i. Group. Long-term Mortality and its Predictors in Patients with Critical Leg Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997; 14; 2: 91–95 (80).
37. Золоев, Г.К. Облитерирующие заболевания артерий. Хирургическое лечение и реабилитация больных с утратой конечности. М.: Медицина. 2004; 432.

38. Pieter Klinkert, MD,^a Abbey Schepers, MD,^a Desire'e H. C. Burger, MD,^a J. Hajo van Bockel, MD, PhD,^b and Paul J. Breslau, MD,: Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: Five-year results of a randomized controlled trial (*J Vasc Surg* 2003;37:149-55.)
39. P. Klinkert, P. N. Post, P. J. Breslau^{1*} and J. H. van Bockel. Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature (*Eur J Vasc Endovasc Surg* Vol 27, April 2004).
40. Hisato Takagi, MD, PhD, Shin-nosuke Goto, MD, Masafumi Matsui, MD, Hideaki Manabe, MD, and Takuya Umemoto, MD, PhD, Shizuoka, Japan A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting (*J Vasc Surg* 2010;52:232-6.).
41. R.J. van Det a,^{*}, B.H.R. Vriens a, J. van der Palen b, R.H. Geelkerken. Dacron or ePTFE for Femoro-popliteal Above-Knee Bypass Grafting: Short- and Long-term Results of a Multicentre Randomised Trial (*European Society for Vascular Surgery* 1078-5884 2009)
42. Richard M. Green, MD, William M. Abbott, MD, Teruo Matsumoto, MD, Jock R. Wheeler, MD, Normand Miller, MD, Frank J. Veith, MD, Sam Money, MD, and H. Edward Garrett, MD: Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: Five-year results of a randomized trial (*J Vasc Surg* 2000;31:417-25.)
43. D.M. Scharn,¹ M. Dirven,¹ W.B. Barendregt,² A.P.M. Boll,^{1,2} D. Roelofs¹ and J.A. van der Vliet. Human Umbilical Vein versus Heparin-bonded Polyester for Femoro-popliteal Bypass: 5-year Results of a Prospective Randomized Multicentre Trial (*Eur J Vasc Endovasc Surg* Vol 35, January 2008).
44. Willard C. Johnson, MD,^a Kelvin K. Lee, PhD,^b and members of the Department of Veteran Affairs COOP Study A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization *Journal Of Vascular Surgery* August 2000
45. Schneider PA, Caps MT, Ogawa DY, Hayman ES: Intraoperative superficial femoral artery balloon angioplasty and popliteal to distal bypass graft: an option for combined open and endovascular treatment of diabetic gangrene. (*J Vasc Surg* 2001;33:955-62.)
46. Roman Nowygrod, MD,^a Natalia Egorova, PhD,^b Giampaolo Greco, PhD,^b Patrice Anderson, MD,^b Annetine Gelijns, PhD,^b Alan Moskowitz, MD,^b James McKinsey, MD,^a Nicholas Morrissey, MD,^a and K. Craig Kent :Trends, complications, and mortality in peripheral vascular surgery (*J Vasc Surg* 2006;43:205-16.)
47. Marcello Romiti, MD,^a Maximiano Albers, MD,^a Francisco Cardoso Brochado-Neto, MD,^a Anai Espinelli S. Durazzo, MD,^b Carlos Alberto Bragança Pereira, PhD,^c and Nelson De Luccia: Meta-analysis of infrapopliteal angioplasty for chronic critical limb ischemia (*J Vasc Surg* 2008;47:975-81.)
48. Wolf G, Wilson S, Cross A, Deupree R, Stason W. Surgery or balloon angioplasty for peripheral vascular disease: a randomized clinical trial. Principal investigators and their Associates of Veterans Administration Cooperative Study Number 199. *J Vasc Interv Radiol* 1993;4(5)
49. George A. Antoniou, MD, PhD, Nicholas Chalmers, FRCR, George S. Georgiadis, MD, Miltos K. Lazarides, MD, EBSQvasc, Stavros A. Antoniou, MD. A meta-analysis of endovascular versus surgical reconstruction of femoropopliteal arterial disease (*Journal Of Vascular Surgery* Jul 15, 2012).
50. Spence M. Taylor, MD, John W. York, MD, David L. Cull, MD, Corey A. Kalbaugh, MS, Anna L. Cass, MPH, and Eugene M. Langan III. Clinical success using patient-oriented outcome measures after lower extremity bypass and endovascular intervention for ischemic tissue loss (*J Vasc Surg* 2009;50:534-41.)

51. Hunink MG, Wong JB, Donaldson MC, Meyerovitz MF, Harrington DP: Patency results of percutaneous and surgical revascularization for femoropopliteal arterial disease. *Med Decis Making* 1994;14:71-81.
52. B. Demirbag, P. Y. Huri, G. T. Kose, A. Buyuksungur, and V. Hasirci, "Advanced cell therapies with and without scaffolds," *Biotechnology Journal*, vol. 6, no. 12, pp. 1437–1453, 2011.
53. B. S. Kim and D. J. Mooney, "Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering," *Trends in Biotechnology*, vol. 16, no. 5, pp. 224–230, 1998.
54. Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. *Science* 1993; 260: 920 –926.
55. Naito Y, Shinoka T, Duncan D, Hibino N, Solomon D, Cleary M, et al. Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 312 – 323.
56. T. C. Flanagan and A. Pandit, "Living artificial heart valve alternatives: a review," *European Cells and Materials*, vol. 6, pp. 28–45, 2003.
57. Wenhui Gong, Dong Lei, Sen Li, Peng Huang, Quan Qi, Yijun Sun, Yijie Zhang, Zhe Wang, Zhengwei You, Xiaofeng Ye, Qiang Zhao Hybrid small-diameter vascular grafts: anti-expansion effect of electrospun poly ϵ -caprolactone on heparin-coated decellularized matrices *Biomaterials* (2015), doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.066.
58. H.M. Nugent and E. R. Edelman, "Tissue engineering therapy for cardiovascular disease," *Circulation Research*, vol. 92, no. 10, pp. 1068–1078, 2003.
59. S. Ravi and E. L. Chaikof, "Biomaterials for vascular tissue engineering," *Regenerative Medicine*, vol. 5, no. 1, pp. 107–120, 2010.
60. M. Parizek, K. Novotna, and L. Bacakova, "The role of smooth muscle cells in vessel wall pathophysiology and reconstruction using bioactive synthetic polymers," *Physiological Research*, vol. 60, no. 3, pp. 419–437, 2011.
61. L. Bacakova, E. Filova, F. Rypacek, V. Svorcik, and V. Stary, "Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering," *Physiological Research*, vol. 53, supplement 1, pp. S35–S45, 2004.
62. L. Bacakova, E. Filova, D. Kubies et al., "Adhesion and growth of vascular smooth muscle cells in cultures on bioactive RGD peptide-carrying polylactides," *Journal of Materials Science*, vol. 18, no. 7, pp. 1317–1323, 2007.
63. L. Bacakova, "Cell colonization control by physical and chemical modification of materials," in *Cell Growth Processes: New Research*, D. Kimura, Ed., pp. 5–56, Nova Science, Huntington, NY, USA, 2008.
64. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 1986; 231: 397 – 400.
65. Nicolas L'Heureux, MSc, Lucie Germain, Phi), Raymond Labb~, MD, FRCSC, and Francois A. Auger, MD, FRCPC, Qulbec, Canada: In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study (*J Vase SURG* 1993;17:499-509.)
66. Matsuda T, Miwa H. A hybrid vascular model biomimicking the hierarchic structure of arterial wall: Neointimal stability and neoarterial regeneration process under arterial circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 988 – 997.
67. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1451 – H1460.
68. Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, Tanios F, Schnoering H, Deichmann T, et al. Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials* 2010; 31: 4731 – 4739.
69. N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig et al., "Human tissueengineered blood vessels for adult arterial revascularization," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 3, pp. 361–365, 2006.

70. J. M. Kelm, V. Lorber, J. G. Snedeker et al., "A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks," *Journal of Biotechnology*, vol. 148, no. 1, pp. 46–55, 2010.
71. Shinako Masuda, Tatsuya Shimizu, Three-dimensional cardiac tissue fabrication based on cell sheet technology, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2015), doi: 10.1016/j.addr.2015.05.002
72. N. L'Heureux, S. P'aque, R. Labb'e, L. Germain, and F. A. Auger, "A completely biological tissue-engineered human blood vessel," *The FASEB Journal*, vol. 12, no. 1, pp. 47–56, 1998.
73. Wojciech Wystrychowski, MD, PhD,^a Todd N. McAllister, PhD,^b Krzysztof Zagalski, MD,^a Nathalie Dusserre, PhD,^b Lech Cierpka, MD, PhD,^a and Nicolas L'Heureux, PhD,^b Katowice, Poland; and Novato, Calif: First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access (*J Vasc Surg* 2013;:-1-5.)
74. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90: e40 – e48.
75. Hibino N, Duncan DR, Nalbandian A, Yi T, Qyang Y, Shinoka T, et al. Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012; 143: 696 – 703.
76. M. Poh, M. Boyer, A. Solan et al., "Blood vessels engineered from human cells," *The Lancet*, vol. 365, no. 9477, pp. 2122– 2124, 2005.
77. C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, and G. Forgacs, "Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5910–5917, 2009.
78. Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, Nakazawa Y, Takahashi R, Takabayashi C, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg* 2010; 51: 155 – 164.
79. Zhou M, Qiao W, Liu Z, Shang T, Qiao T, Mao C, et al. Development and in vivo evaluation of small diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial cells and electrospun chitosan/poly(epsilon-caprolactone) nanofibrous scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2013 November 7, doi:10.1089/ten.tea.2013.0020.
80. Dahl SL, Blum JL, Niklason LE. Bioengineered vascular grafts: Can we make them off-the-shelf? *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21: 83 –89.
81. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007; 28: 3587 – 3593.
82. Sandusky GE Jr, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G. Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am J Pathol* 1992; 140: 317 – 324.
83. Sandusky GE, Lantz GC, Badylak SF. Healing comparison of small intestine submucosa and ePTFE grafts in the canine carotid artery. *J Surg Res* 1995; 58: 415 – 420.
84. Hiles MC, Badylak SF, Lantz GC, Kokini K, Geddes LA, Morff RJ. Mechanical properties of xenogeneic small-intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 883 – 891.
85. Maxwell T. Koobatian , Sindhu Row , Randall J. Smith Jr, Carmon Koenigsnecht , Stelios T. Andreadis, Daniel D. Swartz: Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model. *Biomaterials* 76 (2016) 344e358
86. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001; 7: 1035 – 1040.
87. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23: 1002 – 1006.

88. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 9214 – 9219.
89. Rustad KC, Sorkin M, Levi B, Longaker MT, Gurtner GC. Strategies for organ level tissue engineering. *Organogenesis* 2010; 6: 151 – 157.
90. Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Application of stem cells for vascular tissue engineering [Review]. *Tissue Eng* 2005; 11: 1535 – 1552.
91. T. D. VU and T. KOFIDIS, National University of Singapore, Singapore. Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering 2014. DOI: 10.1533/9780857096715.2.127
92. J.H. Brauker, V. E. Carr-Brendel, L. A. Martinson, J. Crudele, W. D. Johnston, and R. C. Johnson, “Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, no. 12, pp. 1517–1524, 1995.
93. M. C. Peters, P. J. Polverini, and D. J. Mooney, “Engineering vascular networks in porous polymer matrices,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 60, no. 4, pp. 668–678, 2002.
94. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17: 93 – 102.
95. Jason D. Roha,¹ Rajendra Sawh-Martinez, Matthew P. Brennana, Steven M. Jaya, Lesley Devineb, Deepak A. Raa, Tai Yia, Tamar L. Mirensky, Ani Nalbandiana, Brooks Udelsman Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling January 26, 2010 PNAS | March 9, 2010 | vol. 107 | no. 10 | 4669–4674
96. Roh JD, Nelson GN, Brennan MP, Mirensky TL, Yi T, Hazlett TF, et al. Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model. *Biomaterials* 2008; 29: 1454 – 1463.
97. Wojciech Mrówczy_{nski}, MD, PhD,^{a,b} Damiano Mugnai, MD, FEBVS,^a Sarra de Valence, PhD,^c Jean-Christophe Tille, MD, PhD,^d Ebrahim Khabiri, MD,^a Mustafa Cikirikcioglu, MD, PhD, FETCS,^a Michael Möller, PhD,^c and Beat H. Walpoth, Porcine carotid artery replacement with biodegradable electrospun poly-ε-caprolactone vascular prosthesis (*J Vasc Surg* 2014;59:210-9.)
98. Wu H, Fan J, Chu CC, Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 3207 – 3215.
99. Pektok E, Nottelet B, Tille JC, Gurny R, Kalangos A, Moeller M, et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly (epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. *Circulation* 2008; 118: 2563 – 2570.
100. Wang S, Mo XM, Jiang BJ, Gao CJ, Wang HS, Zhuang YG, et al. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency. *Int J Nanomed* 2013; 8: 2131 – 2139.
101. Su Y, Su Q, Liu W, Jin G, Mo X, Ramakrishna S. Dual-drug encapsulation and release from core-shell nanofibers. *J Biomater Sci Polym Ed* 2011 March 18, doi:10.1163/092050611X564137.
102. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
103. Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B. et al. (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285: 1553–1558
104. Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Peishi Y, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI. Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* . 2005;19:1534 –1536.

105. Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T. et al . (2000) FLK1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92–96
106. Taura D., Sone M., Homma K., Oyamada N., Takahashi K., Tamura N., Yamanaka S., Nakao K. Induction and Isolation of Vascular Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells--Brief Report // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009. V. 29. № 7. P. 1100–3.
107. Sone, M., Itoh, H., Yamahara, K., Yamashita, J.K., Yurugi-Kobayashi, T., Nonoguchi, A. et al . (2007) Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2127–2134
108. Hu J., Ma H., Yang B., Ma X. P., Chen Y. E. Construction of Vascular Tissues with Macro-Porous Nano-Fibrous Scaffolds and Smooth Muscle Cells Enriched from Differentiated Embryonic Stem Cells // *PloS One*. 2014. V. 7. №. 4. P. 35580
109. Yurugi-Kobayashi T., Itoh H., Yamashita J., Yamahara K., Hirai H., Kobayashi T., Ogawa M., Nishikawa S., Nishikawa S.-I., Nakao K. Effective Contribution of Transplanted Vascular Progenitor Cells Derived from Embryonic Stem Cells to Adult Neovascularization in Proper Differentiation Stage // *Blood*. 2003. V. 101. № 7. P. 2675–8.
110. Yurugi-Kobayashi T., Itoh H., Schroeder T., Nakano A., Narazaki G., Kita F., Yanagi K., et al. Adrenomedullin/cyclic AMP Pathway Induces Notch Activation and Differentiation of Arterial Endothelial Cells from Vascular Progenitors // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006. V. 26. № 9. P. 1977–8
111. Hirt, Marc N, Hansen A., Eschenhagen T. Cardiac Tissue Engineering: State of the Art // *Circulation Research*. 2014. V 114. № 2. P. 354–67.
112. Pate M., Damarla V., Chi D. S., Negi S., Krishnaswamy G. Endothelial Cell Biology: Role in the Inflammatory Response // *Advances in Clinical Chemistry*. 2010. V. 52. P. 109–30.
113. Parizek M., Kasalkova N., Bacakova L., Slepicka P., Lisa V., Blazkova M., Svorcik V.. Improved Adhesion, Growth and Maturation of Vascular Smooth Muscle Cells on Polyethylene Grafted with Bioactive Molecules and Carbon Particles // *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. V. 10. № 10. P. 4352–74
114. C.-W. Chen, M. Corselli, B. P'eaault, and J. Huard, "Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 597439, 9 pages, 2012.
115. Y. Y. Chen, C. W. Liu, W. Ye, R. Zhang, Y. S. Wei, and D. P. Liu, "Effects of Batroxobin on distal anastomotic intimal hyperplasia after expanded polytetrafluoroethylene bypass grafting in dog common carotid artery," *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, vol. 89, no. 1, pp. 48–53, 2009
116. J. N. Wilcox and N. A. Scott, "Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis," *International Journal of Cardiology*, vol. 54, supplement, pp. S21–S35, 1996.
117. R. M. Nerem and A. E. Ensley, "The tissue engineering of blood vessels and the heart," *American Journal of Transplantation*, vol. 4, supplement 6, pp. 36–42, 2004
118. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323: 27 – 36.
119. Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 1978; 84: 498 – 504.

120. Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Froschl A, Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: S327 – S331.
121. Narutoshi Hibino, MD, PhD,^a Edward McGillicuddy, MD,^a Goki Matsumura, MD, PhD,^b Yuki Ichihara, MD,^b Yuji Naito, MD, PhD,^a Christopher Breuer, MD,^a and Toshiharu Shinoka, MD, PhD. Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:431-6)
122. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 2009; 89: 957 – 989.
123. C. Wang, L. Cen, S. Yin et al., “A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 4, pp. 621–630, 2010.
124. Yue X, van der Lei B, Schakenraad JM, van Oene GH, Kuit JH, Feijen J, et al. Smooth muscle cell seeding in biodegradable grafts in rats: A new method to enhance the process of arterial wall regeneration. *Surgery* 1988; 103: 206 – 212.
125. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489 – 493.
126. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L’Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 144 – 158.
127. Павлова С.В., Перовский П.П., Чепелева Е.В., мышцы человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013 Малахова А.А., Дементьева Е.В., Покушалов Е.А., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Характеристика кардиальных культур клеток, полученных из экспланта сердечной. No 3. С. 132–140
128. Coons, A. H., Creech, H. J., and Jones, R. N. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 200–202.
129. Hynda K. Kleinman *, George R. Martin Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity *Seminars in Cancer Biology* 15 (2005) 378–386 doi:10.1016/j.semcancer.2005.05.004
130. Satsuki Kobayashi,^{a,b} Emi Ito,^{c,d} Reiko Honma,^{c,d} Yoshihisa Nojima,^b Masabumi Shibuya, Shinya Watanabe,^c and Yoshiro Maru: Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis *Genomics* 84 (2004) 185–192
131. Gabriella Lupoa, Ambra Nicotraa, Giovanni Giurdanellaa, Carmelina Daniela Anfusoa, Loriana Romeoa, Giulia Biondib, Cataldo Tiroloc, Bianca Marchettic,^d Nicolò Ragusaa, Mario Alberghina: Activation of phospholipase A2 and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells *Biochimica et Biophysica Acta* 1735 (2005) 135 – 150
132. Yamahara K., Sone M., Itoh H., Yamashita J.K., Yurugi-Kobayashi T., Homma K., Chao T.-H., Miyashita K., Park K., Oyamada N., Sawada N., Taura D., Fukunaga Y., Tamura N., Nakao K. Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells // *PLoS One*. 2008. Vol. 3. № 2. P. e1666.
133. Lai W.-H., Ho J.C.Y., Chan Y.-C., Ng J.H.L., Au K.-W., Wong L.-Y., Siu C.-W., Tse H.-F. Attenuation of hind-limb ischemia in mice with endothelial-like cells derived from different sources of human stem cells // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. № 3. P. e57876.
134. S.H. Bhang, Lee S., Lee T.-J., La W.-G., Yang H.-S., Cho S.- W., Kim B.-S. Three-dimensional cell grafting enhances the angiogenic efficacy of human umbilical vein endothelial cells // *Tissue Eng.* 2012. Part A. Vol. 18. № 3–4. P. 310–9.
135. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur. Spine J.* 2008. Vol. 17. Suppl 4. P. 467–79.

136. Rosenbaum A.J., Grande D.A., Dines J.S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment // *Organogenesis*. 2008. Vol. 4. № 1. P. 23–7.
137. Cynthia S.Wong, PhDa,*, Melissa Sgarioto, Bsc (Hons)a, Amal A. Owida, Enga, William Yang, PhDb, Franklin L. Rosenfeldt, MD, FRACSc and Yos S. Morsi: Polyethyleneterephthalate Provides Superior Retention of Endothelial Cells During Shear Stress Compared to Polytetrafluoroethylene and Pericardium. *Heart, Lung and Circulation* 2006;15:371–377
138. Eybl E, Grimm M, Grabenwoger M, Bock P, Muller MM, Wolner E. Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104(3):763–9.
139. Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: A review. *Biomaterials* 2005;26(14):1857–75.
140. Rotmans JI, Heyligers JM, Verhagen HJ, Velema E, Nagtegaal MM, de Kleijn DP, et al. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation* 2005;112(1):12–8.
141. Mirengi L, Ramires PA, Pentassuglia RE, Rotolo P, Romito A. Growth of human endothelial cells on plasma-treated polyethyleneterephthalate surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11(5):327–31.
142. Thompson MM, Budd JS, Eady SL, Allen KE, James M, James RF, et al. Effect of seeding time and density on endothelial cell attachment to damaged vascular surfaces. *Br J Surg* 1993;80(3):359–62.
143. Miyata T, Conte MS, Trudell LA, Mason D, Whittemore AD, Birinyi LK. Delayed exposure to pulsatile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts. *J Surg Res* 1991;50(5):485–93.
144. Cassandra A. Latimer, MS Meghan Nelson, BS, Camille M. Moore, MS, and Kimberly E. Martin, Effect of collagen and elastin content on the burst pressure of human blood vessel seals formed with a bipolar tissue sealing system *Journal of Surgical Research* Volume 186, Issue 1, January 2014, Pages 73–80
145. M.A. Lillie n, T.E.Armstrong,S.G.Ge´ rard, R.E.Shadwick,J.M.GoslineContribution of elastin and collagen to the inflation response of the pig thoracic aorta: Assessing elastin’s role in mechanical homeostasis. *Journal of Biomechanics* Volume 45, Issue 12, 9 August 2012, Pages 2133–2141
146. V. Samouillan J. Dandurand C. Lacabanne A. Stella M. Gargiulo A. Degani A. Gandaglia, M. Spina Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas *Pathologie Biologie* Volume 60, Issue 1, February 2012, Pages 58–65
147. R. M. Nerem and A. E. Ensley, “The tissue engineering of blood vessels and the heart.,” *Am. J. Transplant*, vol. 4 Suppl 6, pp. 36–42, Jan. 2004.
148. M. Pate, V. Damarla, D. S. Chi, S. Negi, and G. Krishnaswamy, “Endothelial cell biology: role in the inflammatory response.,” *Adv. Clin. Chem.*, vol. 52, pp. 109–30, Jan. 2010.
149. S. Tara, K. A. Rocco, N. Hibino, T. Sugiura, H. Kurobe, C. K. Breuer, and T. Shinoka, “Vessel bioengineering.,” *Circ. J.*, vol. 78, no. 1, pp. 12–9, Jan. 2014.
150. Weibel ER, Palade GE (October 1964). «New cytoplasmic components in arterial endothelia». *J. Cell Biol.* 23: 101–12. DOI: 10.1083/jcb.23.1.101
151. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Yamahara K, Hirai H, et al. (2003) Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *blood* 101: 2675–2678.
152. Susanne M. Stieger, Susannah H. Bloch, Oded Foreman, Erik R. Wisner, Katherine W. Ferrara, And Paul A. Dayton Ultrasound Assessment Of Angiogenesis In A Matrigel Model In Rats *Ultrasound in Medicine and Biology* Volume 32, Number 5, 2006

153. Cikirikcioglu M, Sedelnikov N, Osorio-Da Cruz S, Khabiri E, Donmez Antal A, Tatar T, et al. Improved neo-endothelialization of small diameter ePTFE grafts with titanium coating. *Int J Artif Organs* 2006;29:990-9.
154. Heise M, Schmidmaier G, Husmann I, Heidenhain C, Schmidt J, Neuhaus P, et al. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:418-24.
155. Noriko Isayama, Goki Matsumura, Hideki Sato, Shojiro Matsuda, Kenji Yamazaki. Histological maturation of vascular smooth muscle cells in in situ tissue-engineered vasculature *Biomaterials* 2014 Elsevier Ltd
156. James McDaid a,n, Christopher J. Scott b, Adrien Kissenpfennig c, Huifang Chen d, Paulo N. Martins The utility of animal models in developing immunosuppressive agents *European Journal of Pharmacology* 759 (2015) 295–302.
157. J.M. Lasso, R. Pe´rez Cano, Y. Castro, L. Arenas, J. Garcı´a, M.E. Ferna´ndez-Santos. Xenotransplantation of human adiposederived stem cells in the regeneration of a rabbit peripheral nerve *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* (2015) xx, 1e9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2015.07.005>
158. Willane Bandeira de Sousa a, Joa˜o Batista Santos Garcia b, Joa˜o Nogueira Neto a,*, Pablo Gustavo Ribeiro Furtado a, Jonhnathan Adriano Arau´jo dos Anjos. Xenotransplantation of uterine leiomyoma in Wistar rats: a pilot study *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 190 (2015) 71–75
159. Tamar L. Mirensky a,b,□, Gregory N. Nelson a, Matthew P. Brennan a,b, Jason D. Roha, Narutoshi Hibino a, Tai Yi a, Toshiharu Shinoka a,b, Christopher K. Breuer. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model *Journal of Pediatric Surgery* (2009) 44, 1127–1133
160. Shuhei Tara,MD, PhD,a Hirotsugu Kurobe, MD, PhD,a Mark W. Maxfield,MD,b Kevin A. Rocco,MS, Tai Yi, MD,a Yuji Naito, MD, PhD,b Christopher K. Breuer,MD,a and Toshiharu Shinoka,MD, PhD. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft (*J Vasc Surg* 2014;:-1-10.)
161. Sion G. Jones, Yanhua Hu, Qingbo Xu, and Marjan Jahangiri. Stem Cells Accumulate on a Decellularized Arterial Xenograft In Vivo *The Annals of Thoracic Surgery* Volume 97, Issue 6, June 2014, Pages 2104–2110
162. Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci* 2004;9:1412–21.
163. Roh JD, Nelson GN, Udelsman BV, Brennan MP, Lockhart B, Fong PM, et al. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13(11):2743–9.
164. Gong, Z., and L.E. Niklason. 2006. Blood vessels engineered from human cells. *Trends Cardiovasc Med*. 16 : 153 – 6 .
165. Edelman, E.R. 1999. Vascular tissue engineering : designer arteries. *Circ Res*. 85 : 1115 – 17 .
166. S. J. Lee and A. Atala. *Engineering of tissues and organs*. Wake Forest University School of Medicine, USA DOI : 10.1533/9780857097163.3.347