ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«Перспективные материалы с иерархической структурой
для новых технологий и надежных конструкций»**

**X МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«Химия нефти и газа»**

Томск

Издательский Дом ТГУ

2018

DOI: 10.17223/9785946217408/203

**ЭПИКАРДИАЛЬНАЯ И ПОДКОЖНАЯ ЖИРОВАЯ ТКАНЬ КАК ИСТОЧНИК
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Козырин К.А.,

Зинец М.Г., Иванов С.В., Фанаскова Е.В., Барбараш О.Л.

*ФГБУН «Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

Все возрастающая потребность в эффективных протезах сосудов малого диаметра определяет активное развитие сосудистой тканевой инженерии. Наиболее физиологичный подход к созданию протезов сосудов предполагает заселение трубчатого каркаса аутологичными клетками пациента с последующим культивированием *in vitro* в условиях пульсирующего потока [1]. Создание тканеинженерного сосудистого протеза обуславливает необходимость поиска оптимальных источников клеток, в частности, эндотелиальных.

Одним из основных требований к потенциальному источнику клеток является его доступность – возможность минимально травматичными методами получить достаточно большой объем биологического материала. Поэтому жировая ткань, насыщенная кровеносными сосудами и содержащая популяции различных прогениторных клеток, считается потенциально перспективным источником микрососудистых эндотелиальных клеток [2]. При этом интерес может представлять уровень пролиферативной активности и жизнеспособность эндотелиальных клеток, полученных из различных жировых депо пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Цель: оценить перспективность использования жировой ткани в качестве источника эндотелиальных клеток для заселения тканеинженерных сосудистых графтов.

Материалы и методы.

Образцы эпикардиального и подкожного жира были интраоперационно забраны у пациентов во время проведения планового аорто-коронарного шунтирования. Полученные образцы промывали в растворе Хенкса и механически измельчали. Затем проводили обработку коллагеназой I типа (0,2%) в течение 30 мин при 37°C. Диссоциированную ткань отфильтровывали через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм с последующим центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и расселяли в чашки Петри диаметром 6 см, культивировали в питательной среде EGM-2MV (Lonza, Швеция) с 5% FBS (Hyclone, США). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. В первые 2 суток культивирования замену среды проводили ежедневно, в дальнейшем – через 2 суток. После появления визуально определяемых колоний эндотелиальных клеток с характерной морфологией «булыжной мостовой» (на 7-10 день культивирования) проводили механическую очистку поверхности чашки от клеток с отличающейся морфологией. При необходимости через несколько дней процедуру повторяли. После разрастания колоний их снимали с поверхности раствором трипсина (Gibco, США), пересеивали в чашки Петри, покрытые фибронектином. Для анализа экспрессии в культуре специфических маркеров эндотелиальных клеток, клетки культивировали на покровных стеклах. Проводили сочетанное иммунофлуоресцентное окрашивание на фактор фон Виллебранда (vWF) и CD144. Ядра клеток докрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение.

Начиная с первых дней и в течение всего срока культивирования в культуре, полученной из эпикардиального жира, преобладали распластаные клетки округлой или полигональной формы. Клетки формировали отдельные колонии, по мере разрастания

Секция 4. Научные основы разработки материалов с многоуровневой иерархической структурой, в том числе для экстремальных условий эксплуатации

сливающиеся друг с другом, однако, в целом, культура характеризовалась относительно низкой скоростью пролиферации.

Культура клеток, полученная из подкожного жира, в первые сутки после выделения была гетерогенной: визуализировались клетки различной морфологии – как округлой, так и вытянутой формы. В течение 2 недель культивирования происходило формирование колоний клеток с типичной морфологией «булыжной мостовой» – округлой или полигональной формы, хорошо распластанных. Культура также обладала низкой скоростью пролиферации.

При иммунофлуоресцентном окрашивании культуры клеток эпикардialного жира было отмечено наличие обособленных колоний клеток, экспрессирующих CD144 (Рис.1). Также в цитоплазме этих клеток обнаруживались тельца Вайбеля-Паладе, что свидетельствует о функциональной активности в отношении синтеза vWF. Аналогичные результаты были получены при окрашивании культуры, полученной из подкожного жира.

Рис. 1. Окраска клеток, полученных из эпикардialного (а,б) и подкожного (в,г) жира на CD144 (красный) и vWF (зеленый). Ядра докрашены DAPI (синий). Лазерная сканирующая микроскопия, а, в – ув. об. $\times 20$, б, г – ув. об. $\times 63$.

Таким образом, из эпикардialной и подкожной жировой ткани получены культуры микрососудистых эндотелиальных клеток, не отличавшиеся по уровню экспрессии эндотелиальных маркеров. Показана возможность получения функционально активных эндотелиальных клеток из жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца. Однако несмотря на то, что скорость пролиферации в культуре клеток эпикардialного жира была несколько выше по сравнению с культурой из подкожного жира, для обеих популяций был характерен достаточно низкий выход клеточного продукта. Тем не менее, подкожная жировая ткань может служить источником эндотелиальных клеток, при условии использования большего количества эксплантированной жировой ткани (например, при процедуре липоаспирации) и дополнительных способов очистки культуры (магнитная сепарация).

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №17-75-20004 «Разработка физиологически обоснованной технологии изготовления персонафицированного тканеинженерного сосудистого имплантата малого диаметра in vitro в условиях имитации естественного кровотока с использованием клеточных технологий»).

Литература

1. Benrashid E, McCoy CC, Youngwirth LM, Kim J, Manson RJ, Otto JC, Lawson JH. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application. *Methods*. 2016;99:13-9.
2. Johal KS, Lees VC, Reid AJ. Adipose-derived stem cells: selecting for translational success. // *Regen Med*. 2015;10(1):79-96. doi: 10.2217/rme.14.72.