ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

INTERNATIONAL WORKSHOP

**«Multiscale Biomechanics and Tribology
of Inorganic and Organic Systems»**

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

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

**VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ,
ПОСВЯЩЕННАЯ 50-ЛЕТИЮ ОСНОВАНИЯ
ИНСТИТУТА ХИМИИ НЕФТИ**

«Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа»

DOI: 10.17223/9785946218412/439

**РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНОГО КАРКАСА КАК ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА**

Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кривкина Е.О., Севостьянова В.В., Ханова М.Ю.,
Кудрявцева Ю.А., Антонова Л.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово

Важным направлением тканевой инженерии является разработка протезов сосудов малого диаметра. [1] Для успешного решения этой задачи в условиях *in vitro* необходимо сочетание трех основных условий: формирование каркаса из биосовместимого материала, использование оптимальной культуры клеток, обеспечение, по возможности, максимально физиологичных условий формирования эндотелиального монослоя.

Активные исследования ведутся в области разработки скаффолда – подбор материалов, способных формировать поверхность, пригодную для роста клеток и при этом выдерживать биомеханическую нагрузку, сопровождающую функционирование кровеносного сосуда. В настоящее время популярны различные синтетические полимеры, обладающие оптимальными механическими и физико-химическими характеристиками; однако в большинстве случаев они требуют дополнительной модификации поверхности для увеличения биосовместимости и стимуляции адгезии и роста клеток. В частности, в различных исследованиях было показано успешное использование с этой целью коллагена [2].

Цель исследования: создание биосовместимого полимерного трубчатого каркаса методом электроспиннинга и формирование на его основе эндотелиального слоя в условиях пульсирующего потока.

Материалы и методы

Графты изготавливали методом электроспиннинга из поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактона) в соотношении 1:2, растворенных в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол. Для улучшения биосовместимости в состав внутренней трети стенки графтов вводился коллаген I типа. Для проведения экспериментов были использованы полученные из периферической крови пациентов с ИБС колониеформирующие эндотелиальные клетки (ECFCs). Клетки получали по протоколу Koble [4]. Эксперименты проводили в стерильных условиях, культивировали в условиях CO₂-инкубатора при 37°C, 5% CO₂. Внутреннюю поверхность графтов покрывали раствором фибронектина человека в концентрации 10 мкг/мл. В графты вводили суспензию клеток в концентрации 700 тыс./мл. Для предварительного заселения поверхности клетками графты культивировали в статических условиях. Затем графты подключали в систему пульсирующего биореактора и культивировали с постепенным увеличением значения напряжения сдвига до 2,85 дин/см². Общее время культивирования составило 7 суток. В качестве контроля использовали графты, культивированные в статических условиях. Структуру поверхности графтов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности графта на маркеры эндотелиальных клеток: CD31, VEGFR2, CD144, vWF, маркер адгезии F-actin, ламинин, талин и на коллаген IV типа.

Результаты и обсуждение.

Сканирующая электронная микроскопия показала, что сосудистые графты обладали высокопористой структурой и гомогенными хаотично переплетенными волокнами диаметром от 0,7 до 3,0 мкм, при этом волокна покрыты коллагеном. Таким образом, архитектура поверхности соответствует ожидаемой для использования в качестве клеточного носителя.

Оценка количества клеток на поверхности графта показала, что покрытие фибронектином значительно увеличивало адгезию клеток, а также равномерность их

распределения по поверхности. Поэтому для дальнейших исследований использовали графты, покрытые фибронектином.

Культура ECFCs при культивировании в статике и в условиях потока сохраняла фенотип, интенсивно экспрессируя маркеры эндотелиальных клеток CD31, CD144. Под действием напряжения сдвига значительно усиливалась экспрессия VEGFR2. Был отмечен выраженный синтез vWF, коллагена IV типа, а также ламинина, что свидетельствует о функциональной активности клеток. Как в статике, так в динамике в клетках обнаруживали выраженные филаменты F-актина, при этом при культивировании в динамических условиях отмечали их большую упорядоченность и тенденцию к ориентированию по направлению потока (Рис.1).

Таким образом, ECFCs демонстрировали адаптацию к действию напряжению сдвига, выражавшуюся в увеличении синтетической активности, усилении экспрессии VEGFR2, механотрансдукции, ориентации клеток по направлению потока.

Рис. 1. Результаты культивирования ECFCs в пульсирующем потоке. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Лазерная сканирующая микроскопия, ув. х63.

Заключение. С помощью раздельной подачи растворов ПГБВ/ПКЛ и коллагена I методом электроспиннинга есть возможность формировать каркас сосудистого графта, пригодного для поддержания клеточной жизнеспособности. Дополнительная обработка поверхности раствором фибронектина улучшает адгезию клеток. Хорошая биосовместимость графта подтверждается успешным культивированием колониеформирующих эндотелиальных клеток на поверхности в условиях пульсирующего потока.

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

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. Dippold, D.; Cai, A.; Hardt, M.; Boccaccini, A.R.; Horch, R.; Beier, J.P.; Schubert, D.W. Novel approach towards aligned PCL-collagen nanofibrous constructs from a benign solvent system. *Mater. Sci. Eng. C* 2017, 72, 278–283.
3. Kolbe M, Dohle E, Katerla D, Kirkpatrick CJ, Fuchs S. 2010. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods*. 16(5): 877-886