

РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДОВ В ПРОТОЧНОМ БИОРЕАКТОРЕ

**© А. С. Насрединов,^{1,*} С. В. Анисимов,¹ В. Н. Вавилов,^{1, 2}
М. В. Пузанов,¹ Д. И. Курапеев¹**

¹Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Минздрава РФ и ²Первый государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,
Минздрава РФ, Санкт-Петербург;
* электронный адрес: vsurg@yandex.ru

Тканеинженерные кровеносные сосуды малого калибра способны решить острую нехватку материала для шунтов в реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. Ранее нами был разработан эффективный способ децеллюляризации артерий пуповины человека, которые могут быть использованы как носитель клеток. Целью настоящего исследования была оптимизация протокола заселения децеллюляризованной артерии мезенхимными стволовыми клетками. Показана возможность роста клеток на децеллюляризированном сосуде и доказано, что использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации.

Ключевые слова: рецеллюляризация, артерии пуповины, биореактор.

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс, ДА — децеллюляризованные артерии пуповины, ЖТ — жировая ткань, МСК — мезенхимные стволовые клетки, КМ — костный мозг, ТИКС — тканеинженерный кровеносный сосуд.

Активное развитие сердечно-сосудистой хирургии выявило очевидный в настоящее время дефицит сосудов малого диаметра для трансплантаций (Seifu et al., 2013). Эти сосуды необходимы для таких распространенных операций, как аортокоронарное шунтирование, реваскуляризация артерий нижних конечностей, создание артериовенозных fistул для гемодиализа. Используемые сейчас для этого подкожные вены часто недоступны или изменены. Синтетические протезы из дакрона и политетрафторэтилена с успехом применяются для шунтирования сосудов диаметром более 6 мм, а при меньшем размере они приводят к быстрому тромбозу зоны реконструкции (Naito et al., 2011; Seifu et al., 2013). Все эти факторы оказали существенное влияние на быстрое развитие в последнее десятилетие тканевой инженерии кровеносных сосудов. Искусственные артерии и вены, как ожидается, будут отвечать всем требованиям, предъявляемым в настоящее время к сосудистым заменителям (Naito et al., 2011; Seifu et al., 2013).

Тканевая инженерия сосудов в своем классическом виде основана на колонизации клетками реципиента пористого биодеградируемого носителя (от англ. scaffold — каркас) в форме трубы нужных длины и диаметра. Такой каркас производится из различных природных и синтетических полимерных материалов и играет роль временной основы для клеток, пока те под действием внешних факторов не сформируют собственный внеклеточный матрикс (ВКМ) (Naito et al., 2011).

Ранее нами был описан оригинальный способ децеллюляризации артерий пуповины человека, позволяющий

эффективно удалять клетки и их остатки с сохранением структуры и биомеханического профиля ВКМ сосудов (Насрединов, 2012; Насрединов и др., 2013). Полученные результаты позволили нам предположить, что децеллюляризованные артерии пуповины (ДА) могут стать подходящей основой в тканевой инженерии кровеносных сосудов. Однако ключевым моментом создания тканеинженерных кровеносных сосудов (ТИКС) принято считать посев клеток на носитель (рецеллюляризация) (Villalona et al., 2010; Krawiec, Vorpg, 2012). В нескольких исследованиях было показано, что независимо от типа основы будущего сосуда наличие клеток улучшает его проходимость (Cho et al., 2005; Krawiec, Vorpg, 2012). Проведенные нами предварительные эксперименты по рецеллюляризации подтвердили возможность клеточного роста на внутренней поверхности ДА. Одной из первых решенных задач было определение эмпирическим путем оптимального количества мезенхимных стволовых клеток (МСК) в клеточной супензии, вводимой в просвет ДА. Оно составило $1 \cdot 10^6$ клеток.

Для повышения эффективности статичного засева были апробированы два способа динамичной доставки клеток на носитель, которые используются в тканевой инженерии кровеносных сосудов (Villalona et al., 2010; Насрединов, Лаврешин, 2014). В частности, показано, что совмещение гладкомышечных клеток и фибробластов с носителем из полигликолевой кислоты с помощью центрифугирования позволяет в течение 10 мин добиться трехкратного увеличения эффективности заселения по сравнению со статичным методом (Godbey et al., 2004).

Подобный подход был использован позже и другими исследователями (Roh et al., 2007; Ng et al., 2010). Для оценки такой возможности применительно к ДА нами был сконструирован специальный ротор для имеющейся лабораторной мультифункциональной центрифуги. Однако серия экспериментов с варьированием параметров центрифугирования не показала лучшего проникновения клеток в глубь сосудистой стенки по сравнению со статичным засеванием. Более того, центрифугирование сосудов при скорости вращения более 2000 об/мин (11.2 g) приводило к их сильному перекручиванию (необратимой деформации). Эффективность засеваания оказалась ниже, чем при статичном способе.

Описано использование вакуумирования для совмещения МСК с синтетическим носителем из кополимера полигликолевой кислоты (Solchaga et al., 2006). Это позволило авторам за 10 мин повысить эффективность засеваания минимум в 2 раза по сравнению со статичным методом (72 ч). В нашем случае использование вакуумирования не дало повышения эффективности засеваания: за период меньше 20 мин клетки не успевали адгезировать на поверхности ДА. Более длительное время мы не исследовали в связи с возможным негативным воздействием на клетки из-за отсутствия газообмена в герметичной камере.

Таким образом, динамичные способы активного быстрого внедрения клеток посредством центрифугирования и вакуумирования, подходящие для крупнопористых носителей из синтетических полимеров, оказались неприменимы для заселения клетками децеллюляризованного матрикса сосудов вследствие малого размера пор и огромного гидродинамического сопротивления ткани. Дальнейшее исследование этих методов было приостановлено. Для улучшения результатов рецеллюляризации решено было использовать комбинацию статичного метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе.

Биореакторы часто используют в тканевой инженерии кровеносных сосудов для воссоздания физиологических условий, которые сосуды и клетки испытывают *in vivo*. Биореакторы способствуют улучшению клеточной адгезии, дифференцировке и созреванию клеток, содействуют формированию собственного ВКМ (Pei et al., 2002). Кроме того, вследствие циркуляции культуральной среды улучшаются доставка питательных веществ клеткам и газообмен. В статичных условиях, когда не происходит смешивания среды, формируются большие градиенты диффузии между тканеинженерными конструкциями и окружающей средой, и клетки в центре конструкции получают меньше питательных веществ, чем необходимо, а устранение продуктов обмена происходит медленнее, что в конце концов приводит к гибели клеток (Shachar, Cohen, 2003; Wang, 2012).

Описанные в литературе биореакторы построены по общему принципу: в камере биореактора находится 1 или несколько культивируемых сосудистых кондуитов, через который перфузируется культуральная среда с помощью перистальтического насоса из специальной емкости по замкнутому кругу. Все компоненты биореактора находятся в CO₂-инкубаторе для обеспечения необходимого газового состава среды и температурных условий (Lyons, Pandit 2005).

Целью настоящего исследования было сравнение результатов рецеллюляризации ДА с помощью МСК в статичных условиях и в оригинальном проточном биореакторе.

Материал и методика

Получение и децеллюляризация АП. АП получали и обрабатывали, как было подробно описано нами ранее (Насрединов, 2012; Насрединов и др., 2013). ДА хранили в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, Росмедбио, Россия), содержащем 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США), при 4 °C. Непосредственно перед проведением рецеллюляризации ДА помещали в полную питательную среду (см. ниже) на 16—24 ч при 4 °C.

Выделение и экспансия МСК. Для культивирования клеток и проведения экспериментов по рецеллюляризации использовали питательную среду α-МЕМ (ПанЭко, Россия), содержащую 10 % фетальной сыворотки коров (Hyclone, США), 1 % глутамина (Invitrogen, США) и 1 % смеси пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США) без добавления факторов роста.

Культивирование клеток и рецеллюляризацию сосудистых кондуитов проводили в лабораторном CO₂-инкубаторе ShelLab (Sheldon Manufacturing, США) при 5%-ном содержании CO₂ и 37 °C.

Для получения первичной культуры МСК костного мозга (МСК-КМ) и МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) взрослых крыс использовали традиционную методику селекции по адгезии к пластику (Dmitrieva et al., 2012). Для этого использовали одного взрослого самца белой лабораторной крысы линии Wistar массой 255 г. Обращение с животным соответствовало правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «ФМИЦ им. В. А. Алмазова».

Эвтаназию животного проводили интраперitoneальным введением летальной дозы хлоралгидрата из расчета 1.2 г на 1 кг массы тела. В асептических условиях выделяли бедренные кости, ножницами отсекали эпифизы. Костный мозг из диафизов костей вымывали на пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия) с помощью шприца и PBS. Добавляли полную питательную среду и переносили чашки в CO₂-инкубатор (пассаж 0). Кроме того, выделяли 0.3—0.5 мл ЖТ из забрюшинного пространства. ЖТ в чашке Петри механически гомогенизировали, затем проводили энзиматическую диссоциацию клеток коллагеназой III (Worthington, США) в концентрации 1000 ед./мл в течение 30 мин при 37 °C. После нейтрализации действия коллагеназы полной питательной средой все клетки помещали в культуральные флаконы и культивировали в тех же условиях, что и МСК-КМ.

Через 48 ч неприкрепившиеся клетки, форменные элементы крови и соединительнотканную струму удалили двукратной отмыvkой PBS. Половину питательной среды меняли через 1 сут. Через 7 сут клетки мобилизовали 0.05%-ным раствором трипсина (Invitrogen, США) и пересевали. В дальнейшем культивирование МСК проводили в культуральных плашках площадью 25 и 75 см² (Sigma, США) до достижения субконфлюэнтности монослоя перед каждым пассажем. Для проведения рецеллюляризации использовали клетки 3—8 пассажей.

Подготовка клеток к рецеллюляризации, посев клеток на ДА. Мобилизованные клетки (МСК-КМ и МСК-ЖТ) осаждали путем центрифugирования в течение 10 мин при 300 g. После этого мембранны клеток метили прижизненным флуоресцентным красите-

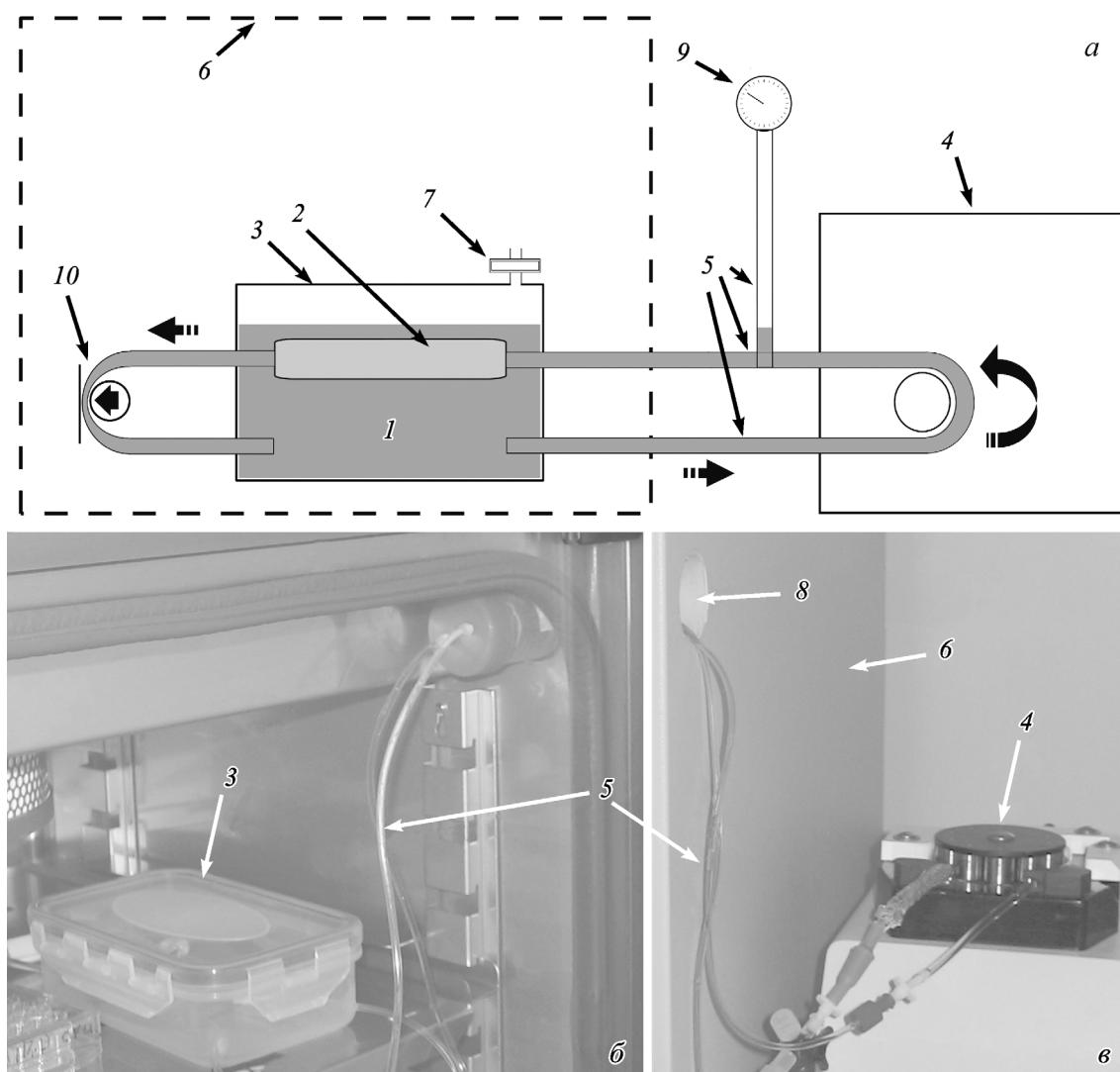


Рис. 1. Схема (а) и фотографии (б, в) биореактора; вид внутри (б) и снаружи (в) CO₂-инкубатора.

1 — питательная среда, 2 — рецеллюляризируемый сосуд, 3 — камера биореактора, 4 — перистальтический насос, 5 — соединительные трубы, 6 — CO₂-инкубатор, 7 — антибактериальный фильтр, 8 — технологическое отверстие в боковой стенке инкубатора, 9 — манометр, 10 — регулируемое сужение выходной трубы.

лем РКН26 согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma, США). ДА канюлировали с обеих сторон адаптером типа Люер (B. Braun, Германия). Меченные МСК ($1 \cdot 10^6$) ресуспенсировали в 100 мкл культуральной среды и с помощью пипетки вводили в просвет сосуда. Затем канюли закрывали заглушкой CombiStopper (B. Braun, Германия) и инкубировали засеянный сосудистый кондит в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе, вручную поворачивая сосуд каждые 15 мин на 90° для более равномерного распределения клеток по его внутренней поверхности. Через 1 ч снимали заглушки и аккуратно промывали засеянные клетками сосуды при помощи PBS.

Устройство биореактора. Оригинальный биореактор собственной конструкции (рис. 1) представляет собой систему с закрытым контуром, позволяющую проводить постоянную перфузию питательной среды (1) через просвет рецеллюляризируемого сосуда (2). Он состоит из камеры (3) и перистальтического насоса (4), соединенных полихлорвиниловыми трубками (5).

Камера биореактора изготовлена из прозрачного пластикового пищевого контейнера 15×10×5 см с герметич-

но закрывающейся крышкой (Lock&Lock, Китай). Она находится внутри CO₂-инкубатора (рис. 1, б) и служит резервуаром для питательной среды. В верхне-боковой части контейнера сделано вентиляционное отверстие, которое для снижения риска контаминации защищено фильтром (7) с размером пор 0.45 мкм (Jet Biofil, Китай). Перистальтический насос Gilson MiniPulse 3 (Gilson, США) размещали рядом с инкубатором. Одноразовые стерильные соединительные трубы (B. Braun, Германия) пропускали внутрь инкубатора через технологическое отверстие в его боковой стенке (8). Все соединения осуществляли через Люер-коннекторы. Снаружи инкубатора на выходную трубку насоса устанавливали аналоговый манометр (Microlife, Швейцария) (9) для измерения давления жидкости в системе. Необходимое давление создавали путем увеличения периферического сопротивления на выходе из камеры биореактора, осуществляя внешнюю компрессию трубы (10).

Культивирование тканеинженерных соудов. Часть сосудов (группа I, n = 18) инкубировали в статических условиях. Засеянные сосудистые кондиты

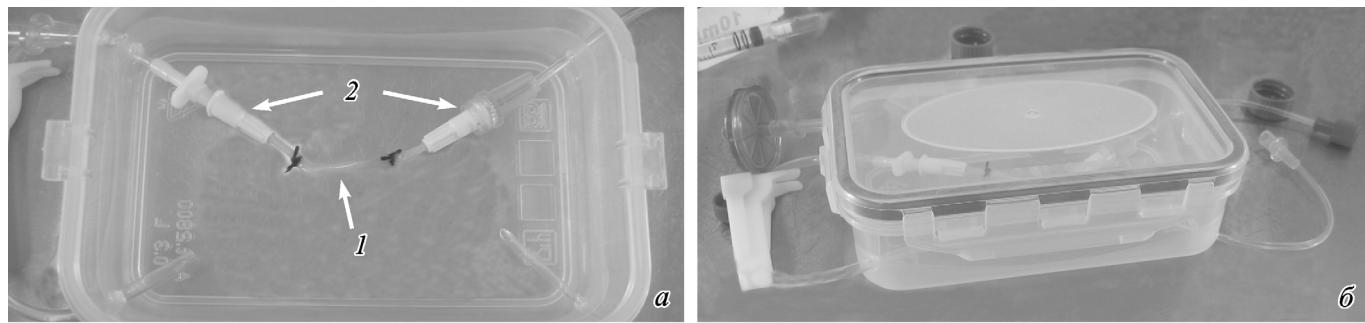


Рис. 2. Фотография сосудистого кондукта, засеянного МСК (а), и камеры биореактора, подготовленной к работе (б).

Сосудистый кондукт (1) соединен с помощью адаптеров (2) с камерой биореактора.

помещали в 6-луночные планшеты (Corning-Costar, США), добавляли по 3 мл культуральной среды в каждую лунку, после чего инкубировали течение 5, 10 и 21 сут. Смену среды проводили каждые 3 сут. Другую часть сосудов (группа II, $n = 6$) культивировали в биореакторе. Засеянные сосуды через Люэр-адаптеры фиксировали к соответствующим разъемам в камере биореактора (рис. 2). После этого камеру заполняли культуральной средой объемом 30 мл и начинали перфузию через просвет сосуда со скоростью 1 мл/мин. Через 1 ч скорость перфузии увеличивали до 2 мл/мин. На следующие сутки внутри системы создавали давление 20—40 мм рт. ст., а скорость перфузии увеличивали до 5 мл/мин. Перфузию продолжали в течение 5 сут. Среду в биореакторе не меняли. По окончании рецеллюляризации сосудистые кондукты обеих групп отмывали в PBS. Большую часть каждого гraftа (около 2—3 см) фиксировали в формалине, дегидратировали в растворах этилового спирта восходящей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной программе на автоматическом тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica, Германия). Изготавливали поперечные срезы рецеллюляризованных сосудов, которые окрашивали гематоксилином и эозином (Dako, Дания) для общей оценки препарата и визуализации клеток. Использовали световой микроскоп с фотокамерой и объектив с увеличением от 4× до 40× (Leica, Германия).

Для оценки количества и жизнеспособности клеток в стенке рецеллюляризованных сосудов от каждого гraftа (рецеллюляризованного сосуда) отсекали участок длиной 1 см. Визуализацию живых клеток проводили с помощью флуоресцентного красителя CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester; Invitrogen, США). Для этого применяли рекомендованную фирмой-производителем методику окрашивания прикрепившихся клеток с собственными модификациями. Участок исследуемого сосуда длиной 1 см разрезали вдоль так, что получался прямоугольный участок ткани, который помещали в раствор красителя CSFE (10 мкМ) и инкубировали 15 мин при 37 °C. Затем образец трижды отмывали раствором PBS и инкубировали его 30 мин в полной питательной среде при 37 °C. После этого его снова трижды отмывали в PBS, распластывали на предметном стекле и изучали с помощью микроскопа Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Германия) с флуоресцентной лампой и фотокамерой (Canon, Япония). Количество клеток, меченных PKH26 и видимых в красном диапазоне спектра, соответствовало общему количеству клеток на матриксе. Визуализировавшиеся в желто-зеленом свете клетки, цитоплазма которых окрасилась CFSE, считали живыми. Клетки подсчитывали в 4 полях зрения при увеличении объектива 20×.

Статистическая обработка. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel 2010. Данные приводятся в виде средних значений и их стандартных отклонений. Степень достоверности межгрупповых различий средних значений оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента с двухсторонним распределением (функция «СТЬЮДЕНТ.ТЕСТ» в Microsoft Excel 2010). Нулевая гипотеза заключалась в равенстве исследуемых групп. Если результат *t*-теста был больше уровня значимости ($\alpha = 0.05$), различия в выборках считали достоверно не отличающимися друг от друга ($P < 0.05$) (Гмурман, 2003).

Использовали следующие реактивы: PBS, РНКаза А, ДНКаза I (Биолот, Россия); L-глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин, трипсин и набор для мечения клеток CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit; Invitrogen, США); набор для мечения мембранных клеток PKH26 (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit; Sigma-Aldrich, США); фетальная бычья сыворотка (Hyclone, США); деионизированная вода (Milli-Q, Millipore, США); трипсин (Самсон-Мед, Россия); додецилсульфат натрия; Тритон X-100 (Amresco, США); коллагеназа III (Worthington, США).

Результаты

После децеллюляризации АП сохраняли свои исходные форму и размеры, теряли свой естественный цвет и становились белесыми. Срок хранения ДА составлял 26 ± 14 сут. МСК-ЖТ на культуральном пластике быстрее пролиферировали, чем МСК-КМ (данные не представлены). Однако при рецеллюляризации ДА различий между использованием МСК-КМ и МСК-ЖТ не обнаружено.

Через 5 сут культивирования число клеток в поле зрения участка рецеллюляризованного в статичных условиях сосуда (группа I) составило 16.0 ± 3.4 , через 14 сут — 17.5 ± 4.4 , через 21 сут — 15.8 ± 4.9 (достоверных различий нет). В группе II аналогичный показатель был существенно выше и после 5-суточной перфузии сосудов в биореакторе составил 27.9 ± 6.0 . Средняя доля живых клеток в группе I через 5 сут, 2 и 3 нед составляла 81.3 ± 4.2 , 74.5 ± 4.6 и $75.8 \pm 4.3\%$ соответственно. Снижение жизнеспособности клеток при культивировании более 5 сут статистически достоверно.

При культивировании тканеинженерного сосуда в биореакторе доля жизнеспособных клеток (группа II) была выше, чем в статичных условиях, и составляла $89.3 \pm 5.9\%$ (рис. 3; различие достоверно). При гистоло-

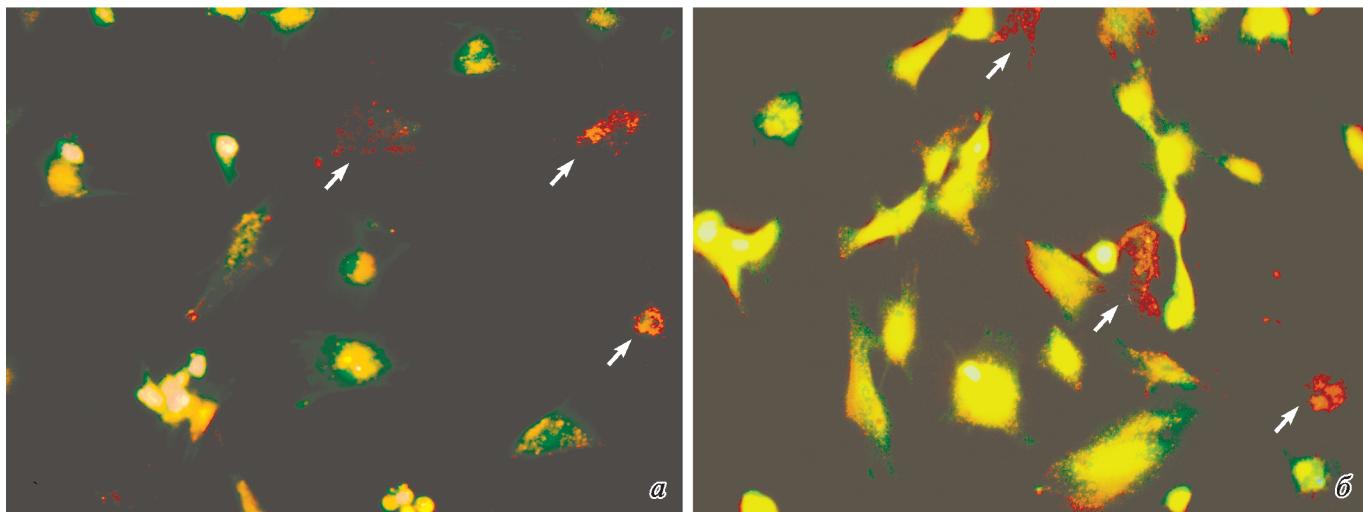


Рис. 3. Микрофотография внутренней поверхности сосудистого кондуита через 5 сут культивирования в статичных условиях (а) и в проточном биореакторе (б).

Окраска красителем PKH26 (красный) и CFSE (желто-зеленый). Мертвые клетки показаны стрелками. Об. 20×.

гическом исследовании обнаружено наличие клеток на внутренней поверхности всех исследуемых сосудов.

В образцах группы I чаще всего наблюдали образование монослоя клеток без их проникновения в глубь сосудистой стенки. ВКМ практически не изменялся. С увеличением времени культивирования не замечено значимой динамики гистологической картины (рис. 4, а). В образцах группы II отмечено образование нескольких слоев клеток на внутренней поверхности гraftа, в некоторых местах наблюдали инфильтрацию клеток в глубь сосудистой стенки, которая становилась более компактной, чем при культивировании сосудов в статичных условиях (рис. 4, б).

Обсуждение

ДА представляют собой подходящую основу для тканевой инженерии сосудов в связи с сохраненной нативной структурой ВКМ, отсутствием иммуногенных

свойств и способностью к оптимальной по времени биодеградации (Cho et al., 2005; Naito et al., 2011; Seifu et al., 2013). Детальному изучению морфологических и biomechanical свойств ДА мы уделили внимание на первом этапе работы при разработке протокола децеллюляризации, на который впоследствии получен патент РФ на изобретение (Насрединов, 2012; Насрединов и др., 2013). Как было установлено, разработанный нами способ децеллюляризации эффективно удаляет клетки и клеточный деб里斯, оставляя ВКМ неповрежденным. Сохранность и пригодность ВКМ подтверждена при изучении механических свойств децеллюляризованных сосудистых кондуитов, в том числе при длительном хранении (до 10 мес).

Известно, что остатки детергентов, использующихся в процессе децеллюляризации, обладают цитотоксическими свойствами и могут стать причиной отсутствия роста клеток на децеллюляризованной ткани (Cebotari et al., 2010). Для снижения остатков децеллюляризующих аген-

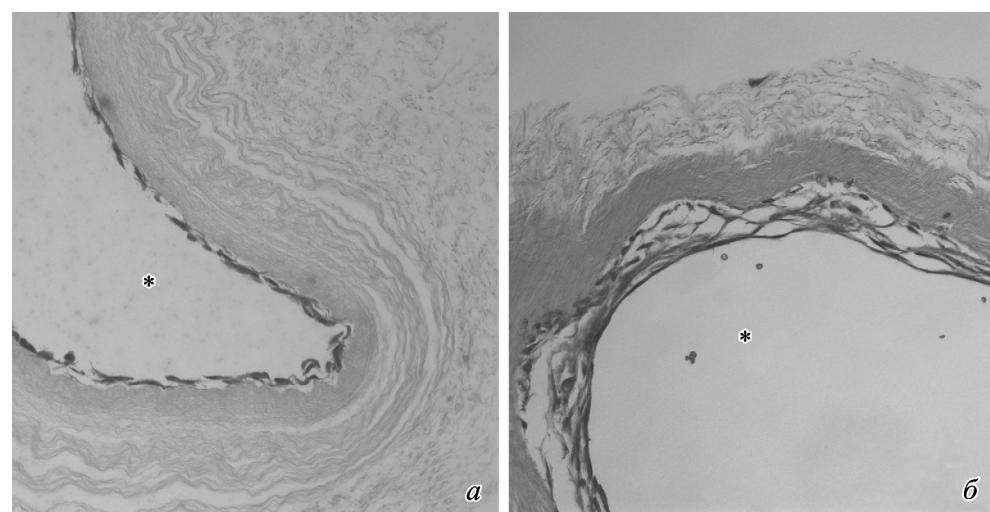


Рис. 4. Микрофотография поперечного среза сосудистого кондуита, рецеллюляризованного в статичных условиях (а) и в проточном биореакторе (б).

Окраска гематоксилином и эозином. Звездочкой показан просвет. Об. 20×.

тов Да многократно отмывали в большом количестве PBS. Кроме того, для насыщения матрикса необходимыми для роста клеток питательными веществами граffiti за 1 сут до рецеллюляризации помещали в культуральную среду. Отдельного теста на цитотоксичность Да не проводили. Однако доказательствами отсутствия негативного влияния состава Да на клетки являлись и рост МСК на поверхности матрикса при проведении экспериментов по рецеллюляризации, и высокий уровень жизнеспособности этих клеток.

МСК обладают такими ключевыми свойствами, как высокая пролиферативная активность и способность к дифференцировке в различные типы специализированных клеток. При этом они легко могут быть получены в необходимом количестве в аутогенном варианте в отличие от HUVEC и стволовых клеток пуповинной крови, что в совокупности делает использование МСК для создания ТИКС привлекательным для многих исследователей (Cho et al., 2005; Zhao et al., 2010; Krawiec, Vorgr, 2012). Кроме того, известно, что МСК обладают анти тромбогенной активностью (Hashi et al., 2007). В ходе настоящего исследования МСК лабораторных крыс были выбраны по нескольким причинам. Во-первых, использование лабораторных животных снимает этические проблемы, связанные с забором клеточного материала у человека. Во-вторых, крысы относительно доступны. В-третьих, методологии забора, выделения и культивирования МСК-КМ и МСК-ЖТ крыс в нашей лаборатории являются хорошо отработанными. В-четвертых, экспансия МСК крыс *in vitro* является относительно недорогой и эффективной. И наконец, это дает возможность проведения в будущем эксперимента по изучению функциональности полученного сосудистого кондуита у крыс *in vivo*, основанного на его трансплантации в аортальную позицию.

Использованный нами флуоресцентный краситель РКН26 связывается липидными мембранами клеток, не влияя на функциональную активность МСК. Он позволяет оценивать наличие и концентрацию клеток в рецеллюляризованным сосуде без дополнительных окрасок, что мы нашли чрезвычайно удобным. Кроме того, в связи с длительным сохранением метки (до 100 сут по данным фирмы-производителя) может быть изучена динамика клеточного состава ТИКС в дальнейших экспериментах *in vivo*.

Для оценки жизнеспособности клеток мы использовали другой флуоресцентный краситель, а именно CFSE. Его особенность заключается в том, что он свободно проникает в цитоплазму всех клеток, но начинает флуоресцировать только после расщепления внутриклеточными эстеразами, которые функционируют лишь в живых клетках. Несмотря на то что использование CFSE с такой целью ранее не описано, мы пришли к выводу о том, что это простой, наглядный и информативный метод оценки жизнеспособности клеток.

В поисках способа улучшения результатов рецеллюляризации Да мы пробовали увеличить время культивирования, но это привело лишь к снижению доли жизнеспособных клеток без увеличения их общего количества (группа I). Тогда нами был сконструирован проточный биореактор, который часто используют в тканевой инженерии кровеносных сосудов для воссоздания физиологических условий и биомеханических стрессов (Pei et al., 2002). Факторы, воздействие которых сосуды и клетки постоянно испытывают *in vivo* (напряжение сдвига, циклическое растяжение и гидростатическое давление), спо-

собствуют улучшению клеточной адгезии, дифференцировке и созреванию клеток, содействуют формированию собственного ВКМ (Pei et al., 2002). Кроме того, вследствие циркуляции культуральной среды улучшаются доставка питательных веществ к клеткам и газообмен.

Оригинальная модель биореактора, используемая в данной работе, созданная из недорогих и доступных компонентов, обеспечивает постоянную перфузию ростовой среды с заданной скоростью через просвет культивируемого сосуда. Основными отличиями от аналогов, описанных в литературе (Lyons, Pandit 2005), являются наружное расположение перистальтического насоса и компактные размеры камеры биореактора, которая одновременно является также резервуаром для питательной среды, что позволяет культивировать ТИКС внутри любого CO₂-инкубатора, причем в этом же инкубаторе могут одновременно размещаться и другие культуральные плашки. Сужая (механически) трубку на выходе из камеры биореактора, мы получаем требуемое давление внутри ТИКС. Основной недостаток системы — отсутствие пульсовой волны — можно в будущем исправить, поменяв стеноз на клапан, и периодически (например, 1 раз за 1 с) кратковременно полностью перекрывать просвет выходной трубы.

С помощью перфузии сосудистого кондуита в биореакторе удалось улучшить результаты статичного посева клеток, повысить жизнеспособность клеток, сократить продолжительность культивирования до 5 сут, достигая образования нескольких слоев клеток по всей внутренней поверхности граffiti с их инфильтрацией в глубь сосудистой стенки. В итоге мы получили ТИКС, подготовленный *in vitro* для трансплантации в артерию донора клеток. Предполагается, что дальнейшая перестройка в зрелый кровеносный сосуд будет продолжаться *in vivo*.

Заключение. Итак, мы обосновали применение Да пуповины человека в качестве носителя клеточного субстрата для тканевой инженерии кровеносных сосудов малого калибра и подтвердили рост МСК на них. Результаты рецеллюляризации оказались лучше при использовании оригинального проточного биореактора, чем при статичном культивировании. Тем не менее для функциональной оценки свойств полученных ТИКС необходимо проведение дальнейших исследований *in vivo*.

Список литературы

- Гмурман В. Е. 2003. Теория вероятностей и математическая статистика. Учеб. пособие для вузов. М.: Высш. шк. 479 с. (Gmurmam V. E. 2003. Probability theory and mathematical statistics. M.: Vysshaja Shkola. 479 p.)
- Насрединов А. С. 2012. Способ децеллюляризации кровеносных сосудов малого калибра. Патент РФ на изобр. № 2504334. (Nasredinov A. S. 2012. Decellularization method for small diameter vessels. Russian Patent to an Invention N 2504334.)
- Насрединов А. С., Лаврешин А. В. 2014. Тканевая инженерия кровеносных сосудов: способы совмещения клеток и носителя. Гены и клетки. 9 (1): 23—34. (Nasredinov A. S., Lavreshin A. V. 2014. Tissue engineering of vascular vessels: the methods of cells and scaffold combining. Genes Cells. 9 (1): 23—34.)
- Насрединов А. С., Лаврешин А. В., Анисимов С. В., Вавилов В. Н., Курапеев Д. И. 2013. Децеллюляризованные артерии пуповины человека как основа тканеинженерных кровеносных сосудов малого калибра. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 8 (1): 66—71. (Nasredinov A. S., Lavreshin A. V., Anisimov S. V., Vavilov V. N., Kurapeev D. I. 2013. Decellularized human umbilical arteries as a potential scaffold for small diameter

- tissue engineered vascular grafts. *Cell Transplant. Tis. Eng.* 8 (1) : 66—71.)
- Cebotari S., Tudorache I., Jaekel T., Hilfiker A., Dorfman S., Ternes W., Haverich A., Lichtenberg A. 2010. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif. Organs.* 34 : 206—210.
- Cho S.W., Lim S.H., Kim I.K., Hong Y.S., Kim S.S., Yoo K.J., Park H.Y., Jang Y., Chang B.C., Choi C.Y., Hwang K.C., Kim B.S. 2005. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann. Surg.* 241 : 506—515.
- Dmitrieva R. I., Minullina I. R., Bilibina A. A., Tarasova O. V., Anisimov S. V., Zaritskey A. Y. 2012. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle.* 11 : 377—383.
- Godbey W. T., Hindy S. B. S., Sherman M. E., Atala A. 2004. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials.* 25 : 2799—2805.
- Hashi C. K., Zhu Y., Yang G. Y., Young W. L., Hsiao B. S., Wang K., Chu B., Li S. 2007. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 11 915—11 920.
- Krawiec J. T., Vorp D. A. 2012. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: a review. *Biomaterials.* 33 : 3388—3400.
- Lyons E., Pandit A. 2005. Design of bioreactors for cardiovascular applications. In: *Topics in tissue engineering.* Finland: University of Oulu. 2 : 1—32.
- Naito Y., Shinoka T., Duncan D., Hibino N., Solomon D., Cleary M., Rathore A., Fein C., Church S., Breuer C. 2011. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 : 312—323.
- Ng R., Gurm J. S., Yang S.-T. 2010. Centrifugal seeding of mammalian cells in nonwoven fibrous matrices. 26 : 239—245.
- Pei M., Solchaga L. A., Seidel J., Zeng L., Vunjak-Novakovic G., Caplan A. I., Freed L. E. 2002. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J.* 16 : 1691—1694.
- Roh J. D., Nelson G. N., Udelesman B. V., Brennan M. P., Lockhart B., Fong P. M., Lopez-Soler R. I., Saltzman W. M., Breuer C. K. 2007. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffold. *Tissue Eng.* 13 : 2743—2749.
- Seifu D. G., Purnama A., Mequanint K., Mantovani D. 2013. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nature Rev. Card.* 10 : 410—421.
- Shachar M., Cohen S. 2003. Cardiac tissue engineering, *ex-vivo*: design principles in biomaterials and bioreactors. *Heart Failure Rev.* 8 : 271—276.
- Solchaga L. A., Tognana E., Penick K., Baskaran H., Goldberg V. M., Caplan A. I., Welter J. F. 2006. A Rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs. *Tis. Eng.* 12 : 1851—1863.
- Villalona G. A., Udelesman B., Duncan D. R., McGillicuddy E., Sawh-Martinez R. F., Hibino N., Painter C., Mirensky T., Erickson B., Shinoka T., Breuer C. K. 2010. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng. (B, Rev).* 16 : 341—350.
- Wang X. 2012. Intelligent freeform manufacturing of complex organs. *Artif. Organs.* 36 : 951—961.
- Zhao Y., Zhang S., Zhou J., Wang J., Zhen M., Liu Y., Chen J., Qi Z. 2010. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 31 : 296—307.

Поступила 1 VIII 2014

RECELLULARIZATION OF TISSUE ENGINEERED VASCULAR GRAFTS IN PERfusion BIOPReACTOR

A. S. Nasredinov,^{1,*} S. V. Anisimov,¹ V. N. Vavilov,^{1,2} M. V. Puzanov,¹ D. I. Kurapeev¹

¹ Federal V. A. Almazov Medical Research Centre, S.-Petersburg,
and ² St. Petersburg First I. P. Pavlov State Medical University;
*e-mail: vsurg@yandex.ru

Small diameter tissue engineered vascular grafts could be a potential solution to the shortage of vascular substitutes in reconstructive cardiovascular surgery. Previously, we have developed a decellularization method for human umbilical arteries, which could be used as a scaffold in vascular tissue engineering. Objective of the study was to optimize the recellularization of decellularized scaffolds with mesenchymal stem cells. In the study, the possibility of cell growth on decellularized vessel has been shown. We also have proved that the use of perfusion-bioreactor improves the results of recellularization.

Key words: recellularization, umbilical artery, bioreactor.