

DOI: 10.31116/tsitol.2018.06.02

БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ СТИМУЛЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ СОСУДИСТОЙ ТКАНИ IN VITRO

© В. В. Севостьянова,* Е. А. Великанова

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, 650002;

* электронный адрес: sevostyanova.victoria@gmail.com

Развитие регенеративной медицины в области сердечно-сосудистых заболеваний способствовало значительным успехам в разработке тканеинженерных кровеносных сосудов. Искусственное создание кровеносного сосуда требует глубокого понимания основных механизмов функционирования нативного органа и особенностей его ремоделирования. Кроме того, необходимо воспроизведение критических параметров и состояния среды для получения структурно сформированных тканей и функционирующих органов. К основным проблемам сосудистой тканевой инженерии относится создание необходимых сигналов и условий в микроокружении клеток для стимуляции эффективного роста тканей с правильной иерархической организацией. Такие сигналы опосредованы как биологически активными веществами, например ростовыми факторами, так и механическими стимулами, воздействующими на клетки и регулируемыми тем самым их функции. В настоящем обзоре рассматриваются основные механические стимулы, которым подвергаются сосудистые клетки в организме, и обсуждается возможность их использования при создании динамической среды и разработке тканеинженерных кровеносных сосудов с использованием клеток различных типов.

Ключевые слова: кровеносные сосуды, тканевая инженерия, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, стволовые клетки, напряжение сдвига, циклическое растяжение, биореактор.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ВКМ — внеклеточный матрикс, ГМК — гладкомышечные клетки, иПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ММСК — мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, ЭК — эндотелиальные клетки, ЭПК — эндотелиальные прогениторные клетки, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, HUVEC — эндотелиальные клетки пупочной вены человека, KLF — Круппель-подобный фактор, VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста, vWF — фактор фон Виллебранда.

В настоящее время сосудистая тканевая инженерия является перспективной и активно развивающейся областью регенеративной медицины по созданию кровеносных сосудов преимущественно малого диаметра для применения в хирургии (Benrashid et al., 2016). Потребность в новых эффективных протезах кровеносных сосудов и в полноценных кровеносных сосудах, созданных *in vitro*, обусловлена главным образом невозможностью использования аутологических вен и артерий у 30 % пациентов в результате повторных операций и перенесенных заболеваний. Кроме того, синтетические протезы диаметром менее 6 мм, доступные для клинического применения, характеризуются низкой проходимостью в результате тромбообразования и гиперплазии неоинтимы (Drews et al., 2017).

Существует достаточно разнообразный спектр подходов по созданию кровеносных сосудов, которые могут включать в себя формирование сосудистых тканей *in vitro*, *in vivo* или *in situ* на основе искусственного матрикса либо без его применения (биопринтинг) (Hoch, 2014; Антонова и др., 2016; Benrashid et al., 2016). Подход *in vitro* является традиционным, так как он отражает

основную концепцию тканевой инженерии, т. е. выращивание жизнеспособных тканей и органов из клеток пациента до имплантации. При этом производят экспансию аутологических клеток, которыми в дальнейшем заселяют трубчатый тканеинженерный матрикс, и культивируют в условиях биореактора до образования структур сосудистой стенки (Couet, Mantovani, 2012).

Тканевая инженерия *in vivo* подразумевает использование внутренней среды организма в качестве биореактора для формирования тканей на искусственном трубчатом матриксе (Hoening et al., 2005; Li et al., 2014). При этом матрикс имплантируется подкожно или в брюшную полость. Принцип этого подхода основан на формировании соединительнотканной капсулы вокруг трубчатого имплантата, которая впоследствии может быть отделена и использована в качестве протеза. Однако этот метод так и не нашел клинического применения. Одним из частных случаев выращивания кровеносного сосуда в организме является подход *in situ*, который основан на регенеративных способностях организма (Li et al., 2014; Talacua et al., 2015; Матвеева и др., 2017). Для этого функционально активный трубчатый матрикс имплантируют в кровеносное

русло, где он заселяется благодаря миграции в его структуру собственных клеток организма в физиологических условиях.

Несмотря на различия подходов, конечной целью каждого из них является создание жизнеспособного сосудистого имплантата со свойствами, аналогичными нативному кровеносному сосуду. При создании функционального клеточного графта необходимо иметь представление о структуре и функционировании кровеносных сосудов малого диаметра. Стенка сосуда состоит из нескольких слоев клеток и внеклеточного матрикса (ВКМ) (Hahn et al., 2007; Barreto-Ortiz et al., 2015). Интима представляет собой внутренний слой, который формирует просвет кровеносного сосуда и образован монослоем эндотелиальных клеток (ЭК), лежащих на базальной мембране (Sivarapatna et al., 2015). В его состав также входят белки ВКМ, которые образуют подэндотелиальный слой и внутреннюю эластическую мембрану. Эндотелий формирует динамический барьер между кровью и окружающими тканями (Sivarapatna et al., 2015). ЭК способны распознавать изменения в кровотоке, участвуют в регуляции воспаления, способствуют поддержанию вазомоторного тонуса и гомеостаза. Взаимодействуя с гладкомышечными клетками (ГМК), ЭК регулируют вазоактивность (Bilodeau et al., 2006). Вокруг внутреннего слоя располагается медиа (медиаальный слой), который образован муральными клетками, включающими в себя перicyты, ГМК и ВКМ (Hahn et al., 2007; Barreto-Ortiz et al., 2015). Этот слой обеспечивает сократительную способность и принимает основную нагрузку, оказываемую на стенку сосуда. ГМК обеспечивают биомеханическую функциональность сосуда, включая вазоконстрикцию и дилатацию (Bilodeau et al., 2005; Buttafoco et al., 2006). Главными компонентами ВКМ в этом слое являются эластические волокна и коллаген. Эластин в составе ВКМ увеличивает эластичность и комплаентность сосуда (Hahn et al., 2007). При этом наибольшее значение в данном слое для структурной целостности артерий имеют коллагеновые волокна благодаря их циркулярному расположению, которое способствует растяжению стенки сосуда при более низких уровнях давления и увеличивает предельное напряжение до разрыва в результате предотвращения чрезмерного растяжения стенки сосуда при высоких давлениях (Buttafoco et al., 2006). Внешний слой кровеносного сосуда представлен адвентицией, которая присутствует только в кровеносных сосудах большого диаметра и образована плохо организованными фибробластами (Barreto-Ortiz et al., 2015).

Детальное воссоздание сложной структуры стенки кровеносного сосуда является необходимым условием для получения функциональных тканеинженерных сосудистых графтов. Для изготовления подобных конструкций требуется обеспечение условий, при которых клетки будут способны образовывать функциональные слои, характерные для нативного кровеносного сосуда (Couet, Mantovani, 2012). Основными факторами, регулирующими поведение клеток, являются биохимические и механические стимулы (Van Naaften et al., 2017). К биохимическим стимулам относят состав культуральной среды, а также дополнительно используемые ростовые факторы и биоактивные молекулы для активации пролиферации, дифференцировки клеток и поддержания их жизнеспособности. В свою очередь механические стимулы можно разделить на пассивные (морфология субстрата) и активные (механическая нагрузка, оказываемая на клетки током крови) (Van Naaften et al., 2017).

В последнее время достаточно активно ведутся исследования особенностей влияния различных видов механической нагрузки на функционирование клеток. Полученные данные могут быть использованы для регуляции формирования новых тканей *in vitro*. В настоящем обзоре подробно рассматриваются основные активные механические стимулы и их воздействие на различные клетки, которые могут быть использованы в сосудистой тканевой инженерии.

Механические стимулы *in vivo*

Активные механические сигналы напрямую вызывают клеточную реакцию. В кровеносных сосудах такие механические стимулы обычно представляют собой нагрузку, оказываемую током крови, и создают динамическое окружение, в котором находятся клетки (Elliott, Gerecht, 2016). При этом гемодинамическая нагрузка, которую испытывают кровеносные сосуды, определяет строение тканей сосудистой стенки. В результате пульсирующего кровяного давления, генерируемого сердечными сокращениями, сосудистая стенка постоянно подвергается окружному напряжению, так называемой растягивающей центробежной нагрузке (около 100—150 кПа), что приводит к растяжению сосудистой стенки на 10—15 % (Humphrey, 2008). В свою очередь ток крови, циркулирующей по сосудам, оказывает напряжение сдвига около 1—5 Па, однако это значение варьирует в различных отделах сосудистого русла (Cheng et al., 2007). Несмотря на то что значение напряжения сдвига на пять порядков ниже окружного напряжения, его влияние на поведение клеток очень велико. Помимо воздействия механических стимулов, обусловленных током крови, сосуды, особенно средние и крупные артерии, проявляют остаточное напряжение, обусловленное предрастяжением волокон эластина (Humphrey et al., 2009). Остаточное напряжение возникает при созревании эластина, которое происходит до того, как сосуд достигнет своего конечного диаметра в процессе роста.

Напряжение сдвига. Напряжению сдвига в большей степени подвергаются ЭК, так как они формируют тонкую границу между кровью и сосудистой стенкой. Реакция ЭК на напряжение сдвига продемонстрирована для 2D-условий *in vitro* (Sakamoto et al., 2004; Wang et al., 2013). Под действием стимула клетки выровнялись относительно друг друга, формировали монослой и осуществляли межклеточные взаимодействия с другими клетками кровеносного сосуда. Было показано, что некоторые из этих клеточных ответов, например выравнивание клеток, опосредованы рецептором эндотелиального фактора роста VEGFR-2 (Tzima et al., 2005).

Ламинарное напряжение сдвига способствует ориентации ЭК вдоль стенки сосуда и регулирует активацию механосенсоров, внутриклеточных сигнальных путей, специфических транскрипционных факторов и экспрессию генов и белков (Nayak et al., 2011). Таким образом, напряжение сдвига играет центральную роль в сосудистом гомеостазе, обуславливая его атеропротективные, антикоагулянтные и противовоспалительные функции. *In vivo* физиологический диапазон значений напряжения сдвига, которому подвергаются ЭК, составляет 5—20 дин/см² (Fisher et al., 2001).

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) также подвергаются напряжению сдвига, но они более чувстви-

тельные к значениям 0.1—2.5 дин/см² (0.01—0.25 Па), которые способствуют их дифференцировке в ЭК (Yamamoto et al., 2003). Под воздействием биомеханических стимулов ЭК и дифференцирующиеся ЭПК экспрессируют на своей поверхности маркеры, такие как CD31, сосудистый эндотелиальный кадгерин, фактор фон Виллебранда (vWF) и рецептор VEGFR-1 (Allen et al., 2010). Более того, физиологическое напряжение сдвига влияет на продукцию оксида азота (NO) под действием эндотелиальной NO-синтазы через высокий уровень экспрессии цинковых пальцев транскрипционного фактора KLF-2 (Krüppel-like Factor 2) (Fisher et al., 2001; Nayak et al., 2011). NO представляет собой одну из наиболее важных молекул, вовлеченных в сосудистый гемостаз в результате его антикоагулянтных и антитромботических свойств, так как он ингибирует адгезию тромбоцитов, а также регулирует продукцию вазоактивных медиаторов (брадикинина и тромбина), участвующих в сосудодвигательных реакциях (Michiels, 2003; Deanfield et al., 2007). Более того, NO ингибирует миграцию ЭК, активируя плазменный гликопротеин β -GPI, который стимулирует сигнальный путь ядерного фактора NF- κ B и активацию NO-синтазы (Chiu et al., 2012). Напряжение сдвига также выступает как модулирующий фактор экспрессии KLF-2, опосредующей противовоспалительные и антитромботические свойства. В частности, пульсирующий ламинарный ток повышает экспрессию KLF-2 в ЭК через активацию внеклеточного сигнала, регулируемого сигнальным путем киназы-5 ERK5/MEF2, приводя к снижению экспрессии адгезивной молекулы сосудистых клеток VCAM-1 NO-синтазы и ингибируя сигнал NF- κ B. Кроме того, длительное напряжение сдвига индуцирует экспрессию KLF-2-зависимой NO-синтазы, особенно в присутствии провоспалительного цитокина, фактора некроза опухоли α , поддерживающего атеропротективные функции напряжения сдвига (Van Thienen et al., 2006).

Кроме того, напряжению сдвига подвергаются и другие клетки сосудистой стенки. Однако ЭК, ГМК и фибробласты отвечают на механические стимулы различным образом. В то время как ЭК выстраиваются параллельно направлению потока, ГМК ориентируются перпендикулярно току перфузируемой жидкости. Помимо этого, градиент трансмурального давления является причиной того, что ГМК и фибробласты подвергаются трансмуральному напряжению сдвига, значение которого на один порядок ниже, чем напряжение сдвига в просвете, и составляет примерно 0.1 Па (Wang, Tarbell, 1995). Несмотря на относительно малое значение, трансмуральное напряжение сдвига значительно влияет на передачу сигналов, пролиферацию, сократимость и фенотип клеток (Shi, Tarbell, 2011).

Окружное напряжение и циклическое растяжение. Окружное напряжение в сосудистой стенке обусловлено давлением в кровеносном русле. То, каким образом оно приводит к деформации сосудистой стенки, диктуется в свою очередь механическими свойствами ВКМ. Деформации, вызванные окружным напряжением, определяют распределение крови внутри циркуляторного русла, а также воздействуют и на клетки (Stella et al., 2010). Вероятно, клетки испытывают локальные напряжения из-за деформации субстрата, к которому они прикреплены. Таким образом, микроокружение клетки (структура субстрата и его жесткость) оказывает значительное влияние на ее поведение (Argento et al., 2012).

Хорошо известно, что подобные механические стимулы влияют на рост ткани. Увеличение числа клеток и (или ВКМ) может стимулироваться растяжением и ингибироваться сжатием (Chanet, Martin, 2014). Преимущественно рост ткани и ориентация клеток происходят вдоль направления приложенной нагрузки в статичных условиях и вдоль деформации, которая происходит с минимальной скоростью при циклической нагрузке (De Jonge et al., 2013). Интересно, что комбинация циклического растяжения с напряжением сдвига, направленных перпендикулярно друг другу, усиливает выравнивание ЭК вдоль направления потока (Owatverot et al., 2005).

Более того, действие циклического растяжения на ЭК реализуется через фактор роста TGF- α , который модулирует активацию NF- κ B и уровень активных форм кислорода (АФК). В частности, физиологическое напряжение ингибирует апоптоз ЭК и повышает их выживаемость за счет продукции АФК (Kou et al., 2009). Базальный уровень АФК обеспечивается NAD(P)H-оксидазой для поддержания физиологических сосудистых функций и может увеличиваться через киназный сигнальный путь PKB/Akt при активации NO-синтазы, влияя на пролиферацию ЭК и ангиогенез. Наконец, циклическое напряжение модулирует адгезию ЭК, их подвижность и ориентацию благодаря зиксину и его взаимодействию с α -актином (Ngu et al., 2010). Таким образом, напряжение сдвига и циклическое растяжение синергетически индуцируют морфологические изменения ЭК, модулируя их чувствительность к напряжению сдвига (Zhao et al., 1995).

Циклическое механическое растяжение оказывает влияние на дифференцировку ГМК и их ориентацию по окружности в стенке сосуда. Механическое растяжение индуцирует контрактильный фенотип ГМК, характеризующийся экспрессией гладкомышечного α -актина, гладкомышечного миозина (SM22) и кальпоина (маркеров ранней, поздней и промежуточной стадий дифференцировки соответственно) и ингибированием пролиферативного фенотипа за счет блокирующего Rho-сигнального пути (Sobue et al., 1999; Shyu, 2009). Эта нагрузка может также активировать путь сосудистого ремоделирования, который включает в себя АФК, NO, NF- κ B, рецептор эпидермального ростового фактора, MAP-киназы и протеинкиназу С. Физиологическое окружное напряжение значительно снижает пролиферацию ГМК в пользу сократительной активности, поддерживающей гомеостаз (Kona et al., 2009).

Остаточное напряжение. Остаточное напряжение представляет собой напряжение, которое существует в статическом состоянии при отсутствии активно приложенной нагрузки. В сосудах остаточное напряжение проявляется в преднагрузке, которая пропорциональна сокращению длины кровеносного сосуда после его эксплантации (Genet et al., 2015). Преднагрузка в результате активного клеточного сокращения и остаточного напряжения ВКМ играет важную роль в поведении кровеносных сосудов. Дело в том, что мягкие биологические материалы становятся более жесткими при больших деформациях и, таким образом, ткани оказываются защищенными при высоком давлении. При преднагрузке таких материалов их жесткость падает (Rausch, Kuhl, 2013). Осевое предрастяжение сосуда способно компенсировать влияние таких патологических факторов, как изменение ВКМ и гемодинамическая нагрузка, и обеспечить оптимальный ответ «окружное напряжение—растяжение» (Humphrey et al., 2009).

Влияние механических стимулов *in vitro*

Сосудистая тканевая инженерия располагает всеми ключевыми инструментами и технологиями, необходимыми для создания функциональных кровеносных сосудов (Benrashed et al., 2016). В качестве искусственного матрикса для заселения аутологичными клетками используют различные биоматериалы, а биореакторы обеспечивают биохимические и биомеханические условия культивирования, подобные физиологическим, для стимуляции пролиферации и дифференцировки клеток с инфильтрацией ими искусственного материала и формированием внеклеточного матрикса. В организме физиологические биохимические условия и механические стимулы, обусловленные пульсирующим током крови и сердечными сокращениями, играют важную роль в регуляции развития сосудов, а также ремоделирования и заживления после повреждений. Поэтому создание функциональных тканеинженерных кровеносных сосудов *in vitro* требует имитации этих видов стимулов с помощью биореакторов, которые в данном контексте являются критичным элементом классического тканеинженерного подхода (Couet et al., 2012).

Во-первых, биореакторы обеспечивают условия, в которых биомеханические факторы, такие как ростовые факторы и кислород, могут в равной степени проникать через всю ткань. Во-вторых, они позволяют оказывать механическую нагрузку на ткани, обеспечивая таким образом биомеханические сигналы, которые приводят к пролиферации и дифференцировке клеток в нужном направлении, отложению внеклеточного матрикса и сосудистому ремоделированию (Zhao et al., 2016). *In vitro* наиболее широко используемой механической стимуляцией является перфузия, поскольку она имитирует физиологические условия для кровеносных сосудов, которые подвергаются пульсирующему току крови (Elliott, Gerecht 2016). В результате напряжение сдвига действует на ЭК, поддерживая гомеостаз, а циклическое окружное напряжение способствует приобретению сократительного фенотипа ГМК. Кроме того, при культивировании в биореакторе в тканеинженерных сосудах естественным образом развивается остаточное напряжение, обуславливающее защитные и адаптивные свойства сосудистых тканей.

При создании полноценного кровеносного сосуда также следует учитывать и особенности влияния механических стимулов на используемые клеточные типы. Для целей сосудистой тканевой инженерии могут быть использованы клетки из различных источников. К ним относятся терминально дифференцированные клетки кровеносных сосудов и их унипотентные клетки-предшественники, а также стволовые клетки, которые могут дифференцироваться в направлении специфического фенотипа под действием определенных стимулов.

Подходы к эндотелизации сосудистого графта

Создание непрерывного эндотелиального слоя на внутренней поверхности сосудистых графтов считается одной из главных задач сосудистой тканевой инженерии (Ren, 2015). Это обусловлено тем, что эндотелиальный слой обладает антитромбогенными свойствами и потенциально должен обеспечивать высокую проходимость

графтов в процессе функционирования после имплантации. Один из подходов к ускорению формирования функционального эндотелия представляет собой заселение внутренней поверхности графта клетками до имплантации в организм (Ren et al., 2015). К настоящему времени проведено множество попыток создания конфлюэнтного эндотелия в тканеинженерных графтах с использованием различных клеточных линий.

В соответствии с подходами тканевой инженерии главными кандидатами для эндотелизации сосудистых графтов являются дифференцированные ЭК, поскольку они являются основным структурным компонентом интимы нативных сосудов. Источниками аутологичных зрелых ЭК являются пупочная, яремная, сонная и лучевая вены, а также микрососудистая сеть жировой ткани (Fernandez et al., 2014). Первая попытка заселения внутренней поверхности сосудистых графтов была осуществлена в 1978 г. Авторы выделяли ЭК, соскабливая интиму сегментов подкожной вены собак, заселяли ими внутреннюю поверхность сосудистых протезов Dacron и имплантировали в инфраренальную часть аорты (Herring et al., 1978). Результаты эксперимента показали улучшение заживления после имплантации, а также 76%-ную проходимость графтов с клетками и 22%-ную проходимость в контрольной группе без клеток. В последующих экспериментах были испытаны различные матриксы с эндотелиальными клетками.

Этот подход показал свою эффективность в ряде доклинических и клинических испытаний, однако он основан на использовании недеградируемых синтетических протезов и заселении их клетками в статичных условиях (Gabbieri et al., 2007; Laube et al., 2000). В свою очередь условия культивирования критичны для формирования кровеносного сосуда *in vitro* за счет взаимодействия между поверхностью искусственного матрикса и клеток. Так, показано, что физиологический пульсирующий ток играет важную роль в формировании функционального эндотелия (Gong et al., 2014). ЭК аорты крыс культивировали в биореакторе на поверхности матриксов из фиброина шелка, изготовленных методом электроспиннинга, в условиях устойчивого ламинарного потока, синусоидального потока или физиологического потока, представляющего собой типичную пульсовую волну в дистальной части бедренной артерии. Для каждого условия потока среднее напряжение сдвига, которому подвергались клетки, составляло 10 дин/см², что является типичным средним напряжением сдвига, которое развивается в проксимальном анастомозе при бедренно-дистальном шунтировании. Для синусоидальных и физиологических пульсирующих потоков частота пульсаций составляла 1.25 Гц, а среднее давление — 100 мм рт. ст. Исследование показало, что пульсирующий поток приводил к лучшей адгезии ЭК на матриксах из фиброина шелка, способствовал ориентации клеток в направлении потока жидкости с образованием в них микрофиламентов F-актина и фибронектина с однонаправленной ориентацией, а также ингибировал апоптоз. (Gong et al., 2014).

В качестве зрелых ЭК для изучения эндотелизации сосудистых графтов в условиях биореактора широко используют ЭК из вены пуповины человека (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC). Так, полная эндотелизация графтов диаметром 4.7 мм с применением HUVEC показана авторами, целью которых была разработка сосудистых графтов методом самосборки ВКМ с помощью дермальных фибробластов с их последующей децеллюля-

ризацией и созданием эндотелия на внутренней поверхности (Tondreau et al., 2015). Формирование эндотелиального слоя происходило в течение 1 нед в условиях перфузии культуральной среды через графт с использованием перистальтического насоса со скоростью 40 мл/мин и напряжением сдвига 0.65 дин/см^2 . Кроме того, на модели HUVES продемонстрировано влияние изменения уровня напряжения сдвига на удержание ЭК на поверхности графта (Liu et al., 2017). При постепенном увеличении напряжения сдвига в определенные временные интервалы возможно усиление адгезии ЭК с формированием и сохранением эндотелиального слоя. Показано, что механизм этого улучшения опосредован, по крайней мере частично, путем регуляции сборки фибронектина, а также экспрессии интегрин- $\beta 1$ и киназы фокальной адгезии (FAK) в ответ на механотрансдукцию, вызванную напряжением сдвига (Liu et al., 2017).

Для создания непрерывного монослоя с высокой устойчивостью к воздействию напряжения сдвига HUVES культивировали на матриксах из фиброина шелка, изготовленных методом электроспиннинга, и подвергали воздействию напряжения сдвига различной силы в определенные промежутки времени. Результаты показали, что адгезия клеток при напряжении сдвига тока жидкости в физиологических диапазонах составляла $45.82 \pm 5.98 \%$ для образцов с медленным увеличением значения напряжения сдвига (10% за 1 ч) до 10.7 дин/см^2 за 24 ч, $38.58 \pm 7.55 \%$ для образцов, культивированных при увеличении напряжения сдвига на 4 дин/см^2 каждые 8 ч до 8 дин/см^2 за 24 ч, а также $2.04 \pm 0.22 \%$ при повышении напряжения на 15% каждый час до 9.8 дин/см^2 за 16 ч. Образцы, культивированные при умеренном увеличении напряжения сдвига (10% за 1 ч), лучше удерживали клетки на поверхности по сравнению с клетками при резком увеличении напряжения сдвига до высоких значений (4 дин/см^2 за 8 ч или 15% за 1 ч). Кроме того, значение показателя клеточной адгезии значительно снижалось при увеличении напряжения сдвига на 10% за 1 ч в результате резкого изменения воздействующей силы тока жидкости (от 5 до 10 дин/см^2). На основе полученных данных условия культивирования оптимизировали и в модифицированном протоколе использовали увеличение напряжения сдвига на 10% каждые 2 ч. Эти условия способствовали адгезии клеток на уровне $99.31 \pm 4.97 \%$ через 32 ч культивирования (почти полный монослой HUVES, покрывающий всю внутреннюю поверхность графта). Такой подход к эндотелизации графта *in vitro* позволил ЭК приспособиться к изменению среды и выдерживать физиологические уровни напряжения сдвига, что способствовало превосходной адгезии клеток. Кроме того, было показано, что с помощью поэтапного увеличения напряжения сдвига можно регулировать толерантность ЭК к воздействию напряжения сдвига и антитромбогенность сосудистых графтов посредством специфичного для ВКМ механочувствительного сигнального пути, в который вовлечены фибронектин, интегрин- $\beta 1$ и киназа FAK (Liu et al., 2017).

Однако сложности использования ЭК в клинике связаны с тем, что от пациента можно получить ограниченное количество ЭК и их пролиферативный потенциал мал (поскольку ЭК зрелые) (Hofmann et al., 2009). Поэтому многообещающими в сосудистой тканевой инженерии являются эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК), так как они участвуют в восстановлении и функционировании эндотелия, а их получение менее инвазивно по

сравнению с ЭК (Glynn, Hinds, 2014). ЭПК могут быть получены из периферической и пуповинной крови, костного мозга и резидентных стволовых клеток тканей (Kirton, Xu, 2010). Подход с предварительным заселением сосудистых графтов ЭПК до имплантации широко распространен в сосудистой тканевой инженерии для ингибирования тромбообразования и улучшения проходимости имплантатов. Впервые клетки с маркером ЭПК (CD34) из костного мозга были использованы для улучшения эндотелизации сосудистых графтов из политетрафторэтилена (ПТФЭ) (Bhattacharya et al., 2000). Заселение графтов ЭПК из костного мозга непосредственно перед имплантацией в грудную аорту собак способствовало значительной эндотелизации протезов через 4 нед имплантации по сравнению с бесклеточными графтами. Введение поздних ЭПК человека в стенку графтов из ПТФЭ с внутренним диаметром 1 мм показало улучшение проходимости протезов до 88% через 28 сут после имплантации в бедренную артерию бестимусных крыс (Stroncek et al., 2012). Однако в более позднем исследовании показано усиление пролиферации и дифференцировки ранних ЭПК человека с образованием монослоя эндотелиоподобных клеток (CD31) на внутренней поверхности сосудистых графтов на основе полиэфиров при использовании биореактора и создании динамической среды культивирования (Melchiorri et al., 2016). Ток жидкости в процессе перфузии графтов в биореакторе оказывал на клетки напряжение сдвига 0.6 дин/см^2 , что соответствовало физиологическому значению напряжения сдвига в сосудах венозного русла. Однако известно, что ЭПК способны дифференцироваться в зрелые ЭК в условиях физиологического напряжения сдвига (Ankeny et al., 2012; Egorova et al., 2012).

Еще одним источником клеток для тканевой инженерии являются стволовые клетки благодаря их способности к неограниченной пролиферации и дифференцировке в любые типы клеток при соответствующих условиях. Эти клетки способны дифференцироваться и в клетки кровеносных сосудов *in vitro* при специфических биомеханических и биохимических воздействиях. В этой области наибольший интерес представляют стволовые клетки — эмбриональные и индуцированные плюрипотентные, а также мультипотентные мезенхимные стромальные клетки.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) получают из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранней стадии развития эмбриона (Thomson et al., 1998). Известно, что на стадии формирования мезодермы переходная коэкспрессия факторов ER71/ETV2, GATA2 и SCL усиливает генерацию гемангиобластов путем активации сигналов костного морфогенетического белка BMP и FLK-1, одновременно ингибируя фосфатидилинозитол-3-киназу и сигнальный путь WNT. В свою очередь гемангиобласты FLK-1⁺ эффективно продуцируют гемопоэтические, ЭК и ГМК как в культуре, так и *in vivo* (Liu et al., 2013). ЭК, дифференцированные из ЭСК мыши, были успешно использованы для эндотелизации сосудистых графтов малого диаметра на основе полигликолиевой кислоты (Shen et al., 2003). Другие авторы показали возможность применения физических стимулов, а именно напряжения сдвига, для дифференцировки ЭСК в клетки с эндотелиальным фенотипом (Ahsan, Nereem, 2010). Так, ЭСК мышей, которые подвергались в течение первых 2 сут дифференцировки напряжению сдвига, создаваемого током жидкости, увеличивали пролиферацию

и экспрессию маркеров ЭК (FLK1, VECAD и PECAM). Кроме того, воздействие напряжения сдвига приводило к увеличению доли клеток FLK1⁺ от 1 до 40 %, которые способны были образовывать сосудоподобные структуры *in vitro*. При этом напряжение сдвига соответствовало значению, характерному для крупных сосудов (15 дин/см²).

Несмотря на привлекательность ЭСК для сосудистой тканевой инженерии благодаря плюрипотентности и неограниченной пролиферации, их применение имеет ряд ограничений, связанных как со сложностью переноса экспериментальной ситуации в клинические условия (из-за возможного формирования тератом и изменения дифференцировки *in vivo*), так и с этическими проблемами.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). В отличие от ЭСК их можно получить из соматических клеток путем репрограммирования, что позволяет избежать этических проблем их применения (Zhao et al., 2009). При этом иПСК демонстрируют плюрипотентность, близкую к ЭСК, они способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков. Исследования показывают, что иПСК могут дифференцироваться в такие клетки кровеносных сосудов, как ЭК и ГМК (Rufaihah et al., 2011; Kim et al., 2013). По сравнению со зрелыми ЭК ЭК, полученные из иПСК (иПСК-ЭК), имеют такие же функции, но при этом обладают большей пластичностью для регенерации сосудов (Adams et al., 2013). В ряде исследований были сделаны попытки использования иПСК-ЭК для создания интимы тканеинженерных кровеносных сосудов (Nakayama et al., 2015). Пласт этих клеток нанесли на внутреннюю поверхность сосудистых биодеградируемых полимерных графтов и имплантировали полученные конструкции в нижнюю полую вену иммунодефицитных мышей. Результаты показали наличие эндотелиального слоя на внутренней поверхности графтов через 10 нед после имплантации (Hibino et al., 2012). Немаловажным в образовании зрелых ЭК из иПСК-ЭК является и воздействие на клетки напряжения сдвига. Так, иПСК-ЭК человека культивировали на ПТФЭ-мембране в условиях пульсирующего тока жидкости в течение 1 сут с постепенным увеличением напряжения сдвига от 5 до 10 дин/см² и оценивали регуляцию экспрессии маркеров фенотипа артериальных ЭК (экспрессию эфрина В2 и сигнальный путь Notch) (Sivararatna et al., 2015). Авторы показали, что напряжение сдвига активировало сигнальный путь Notch, что в свою очередь приводило к увеличению экспрессии эфрина В2 и других артериальных маркеров, включая CXCR4 и коннексин 40, но заметно не влияло на экспрессию венозных маркеров COUP-TFII и EphB4. Кроме того, под действием напряжения сдвига значительно усиливается экспрессия транскрипционных факторов KLF2 и KLF4 — маркеров антитромботической и противовоспалительной функций эндотелия (Atkins, Jain, 2007).

Таким образом, иПСК являются многообещающим источником клеток для тканевой инженерии, однако в настоящее время их применение ограничено из-за необходимости исследований их онкогенности и иммуногенности в силу существующей вероятности экспрессии аномальных генов, которые могут вызывать иммунный ответ (Zhao et al., 2011).

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК). Среди различных стволовых клеток, которые подходят для применения в ткане-

вой инженерии, ММСК являются наиболее доступными, удобными и изученными к настоящему времени. Они представляют собой клеточную популяцию стволовых клеток, которую можно выделить из различных тканей взрослого организма (костного мозга, жировой ткани и мышц), а также пуповины и пуповинной крови (El Omar et al., 2014). Однако у ММСК из различных источников разнятся пролиферативный потенциал, способность к дифференцировке и регенеративные функции (Krawiec, Vogt, 2012). Было показано, что большинство ММСК могут дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, кардиомиоциты и сосудистые клетки.

Для запуска *in vitro* дифференцировки ММСК в сосудистые клетки требуются биохимические и механические стимулы. Так, для дифференцировки ММСК в ЭК широко используется фактор VEGF (Oswald et al., 2004). ММСК костного мозга могут также дифференцироваться в ЭК под действием напряжения сдвига в физиологических значениях (Maul et al., 2011). Подобный эффект (но при высоких значениях напряжения сдвига) показан и для ММСК из амниотической жидкости и плаценты человека (Wu et al., 2008; Zhang et al., 2009). Вероятный механизм перехода МСК в ЭК заключается в стимуляции дифференцировки клеток в эндотелиальном направлении при одновременном снижении дифференцировки в сторону фенотипа ГМК.

В частности, мышинные ММСК, подвергнутые напряжению сдвига 15 дин/см², экспрессировали VEGF, но в значительной степени уменьшали экспрессию таких ростовых факторов, как TGF- β 1, PDGF и его рецептора, которые, как известно, направляют дифференцировку в ГМК (Wang et al., 2008). Кроме того, показано, что влияние напряжения сдвига на дифференцировку меняется в зависимости от его интенсивности. Так, ММСК, подвергшиеся воздействию как низкого (2.5 дин/см²), так и высокого (10 дин/см²) напряжения сдвига, экспрессировали эндотелиальные маркеры CD31, vWF и VEGFR2 (Kim et al., 2011). При этом экспрессия CD31 при низком напряжении сдвига значительно превышала экспрессию при высоких значениях напряжения сдвига, а экспрессия клетками vWF и VEGFR2 при низком напряжении сдвига немного превышала эти показатели клеток при высоком напряжении сдвига; экспрессия маркеров ГМК (миокардина, SMMHC и SM22 α) была значительно выше при больших значениях напряжения сдвига (Kim et al., 2011). Напротив, другие исследования показали, что напряжение сдвига увеличивает экспрессию TGF- β 1 и маркеров ГМК (Kobayashi et al., 2004; Park et al., 2007). Такие несоответствия могут быть обусловлены различными источниками ММСК и условиями их культивирования.

Влияние механических стимулов на дифференцировку ММСК зависит и от того, как прикладывается сила к клеткам (непрерывно или циклически), а также от ее интенсивности. Кроме того, влияние на клетки может также оказывать жесткость субстрата, на котором они культивируются (Dan et al., 2015). В связи с этим использование ММСК в качестве источника ЭК для формирования интимы тканеинженерных кровеносных сосудов требует индивидуального подбора условий культивирования в биореакторе с учетом вида графта и материала, из которого он изготовлен. Ким с соавторами определили возможные условия культивирования ММСК с целью эндотелизации сосудистого графта на основе сополимера полимолочной кислоты и поликапролактона, изготовленного методом электроспиннинга (Kim et al., 2016). Графты, заселенные

ММСК человека, подвергали напряжению сдвига 2.5 дин/см² в течение 4 сут, что увеличивало уровни мРНК маркеров ЭК (vWF, CD31, VE-кадгерина и E-селектина). В свою очередь при культивировании графтов в тех же условиях, но с добавлением 3%-ного циркулярного растяжения стенки в течение 3 сут и последующего 5%-ного растяжения в течение 4 сут клетки демонстрировали еще большее увеличение экспрессии маркеров ЭК при отсутствии маркеров ГМК.

Было показано, что после воздействия напряжения сдвига 15 дин/см² в течение 2 сут на ММСК из костного мозга собак, посаженных на трубчатые графты из сополимера молочной кислоты и поликапролактона, экспрессия эндотелиальных маркеров увеличивалась, тогда как маркеров ГМК (α -актина и кальпонинов) — снижалась (Dong et al., 2009).

Хотя в ряде исследований было показано, что ЭК на внутренней поверхности сосудистых графтов предотвращали тромбообразование и гиперплазию неоинтимы при имплантации в кровеносное русло, эти трансплантаты были мало схожи с нативными сосудами из-за отсутствия гладкомышечного слоя и адвентиции.

Подходы к созданию гладкомышечного слоя сосудистого графта

Для создания тканеинженерного кровеносного сосуда, способного к констрикции и дилатации, необходимо сформировать средний слой, состоящий из функционально активных ГМК. Как и для эндотелия, для создания слоя из правильно ориентированных ГМК требуется поиск оптимальных источников клеток, а также способов и условий их иммобилизации на сосудистых графтах.

Показано, что в графтах малого диаметра из сегментов децеллюляризированной свиной артерии, заселенных ЭК и ГМК овец, улучшалась созревание стенки *in vivo* и формирование сократительной функции, чего не было в графтах, содержащих только ЭК (Neff et al., 2011). Для того чтобы ГМК проникли и накопились в толще стенки, их помещали на внешнюю поверхность децеллюляризированной артерии с удаленной адвентицией и культивировали в перфузионном биореакторе с постепенным увеличением скорости тока жидкости и напряжения сдвига. Через 5 сут преколонизации условия меняли и создавали гидродинамические параметры артерии: напряжение сдвига в диастолу и систолу составляло 9.9 и 13.2 дин/см² соответственно, частота пульсации — 60 циклов/мин, время культивирования — 14 сут. Подобные условия динамического культивирования были использованы и для создания гладкомышечного слоя на биодеградируемых пористых графтах из смеси поликапролактона и коллагена I типа (Ahn et al., 2015). Для этого пласт ГМК оборачивали вокруг полимерного графта. Такой подход способствовал образованию зрелого слоя ГМК с прочными межклеточными контактами и сократительной функцией, а условия перфузионного биореактора улучшали клеточную выживаемость и проникновение клеток в стенку графта.

В то же время известно, что циклическое растяжение и сжатие стенки сосуда, а также напряжение сдвига оказывают значительное влияние на экспрессию генов ГМК. Так, оценка влияния частоты пульсации на фенотип ГМК человека, культивируемых на децеллюляризированной пупочной вене в условиях биореактора, показала, что по-

стоянное изменение частоты пульсации снижает сократительную функцию клеток и их переход в синтетический фенотип по сравнению с клетками, которые подвергались воздействию тока жидкости с постоянной физиологической частотой (Tosun, McFetridge, 2015); через 24 ч культивирования в токе жидкости с патологической частотой ГМК синтезировали в большом количестве ВКМ и коллаген при увеличении экспрессии матричных металлопротеиназ и одновременном снижении экспрессии их ингибитора (TIMP).

В экспериментах *in vitro* (с использованием циклического растяжения) ГМК крыс культивировали на трубчатых графтах из сополимера желатина и винилацетата в течение 5 сут под действием пульсирующего тока с частотой 1 Гц для достижения 10%-ного растяжения стенки тканеинженерной конструкции в окружном направлении. При этом клетки увеличивали экспрессию коллагена и эластина, а также сократительных белков (α -актина и кальпонинов) по сравнению с образцами, находившимися в статичной среде (Thomas, Nair, 2012).

В то время как большинство исследователей при разработке тканеинженерных кровеносных сосудов используют биореакторы, осуществляющие циклическое одноосное растяжение стенки графта в окружном направлении, некоторые авторы (Huang et al., 2016) полагают, что такой нагрузки недостаточно для формирования механически прочного сосуда. Дело в том, что в тканях, культивируемых при одноосном растяжении (окружном), выравнивание коллагеновых волокон происходит в направлении нагрузки. Это приводит к формированию ткани, которая механически устойчива в окружном направлении, однако является слабой при поперечном растяжении. В свою очередь нативные артерии, в том числе восходящая аорта и коронарные артерии, подвергаются сложному циклическому двухосному напряжению и имеют сложную ориентацию коллагеновых волокон. Культивирование сосудистых графтов (на основе полигликолиевой кислоты) с бычьими ГМК в биореакторе, обеспечивающем двухосное растяжение конструкции в окружном и продольном направлениях, показало ускорение созревания эластических волокон, улучшение комплаентности конструкций и прочности в двух направлениях (Huang et al., 2016).

Хотя использование зрелых ГМК для создания стенки тканеинженерного сосуда демонстрирует положительные результаты, возможность применения этого подхода в клинике крайне низка. Это связано с низкой пролиферативной активностью терминально дифференцированных клеток, а также с тем, что их источником являются аутологичные кровеносные сосуды (Zou et al., 2016).

Альтернативным источником ГМК могут быть ЭСК. Показано, что регулирование сигнального киназного пути PI3K/Akt и стимуляция транскрипционного фактора NF- κ B (p50) могут способствовать дифференцировке ЭСК в ГМК (Zheng et al., 2013). Такой подход позволил получить ГМК из ЭСК мышей и успешно заселить ими нановолокнистые сосудистые графты малого диаметра из полимолочной кислоты *in vitro* (Hu et al., 2012). В другой работе с воздействием механических стимулов на ЭСК продемонстрировано влияние напряжения сдвига и окружного растяжения на особенности дифференцировки ЭСК в клетки кровеносного сосуда (Huang et al., 2005). 2-суточное культивирование микропористых трубчатых графтов из полиуретана, заселенных мышинными ЭСК, при низких значениях пульсирующего тока жидко-

сти, характерного для венозной системы человека (напряжение сдвига $0.98\text{--}2.2$, окружное напряжение $(4.6\text{--}9.6) \cdot 10^4$ дин/см²), приводило к дифференцировке клеток, выстилающих внутреннюю поверхность, в ЭК, в то время как клетки, инфильтрирующие стенку графта, имели фенотип ГМК (Huang et al., 2005). Эти результаты свидетельствуют о чувствительности ЭСК к механическим стимулам и демонстрируют важность пристеночного напряжения сдвига при формировании эндотелиального слоя и окружного напряжения в образовании функционально активного мышечного слоя сосудов.

Так же как и ЭСК, большой интерес для получения ГМК вызывают иПСК. ГМК, полученные из иПСК (иПСК-ГМК), обладают сократительной функцией, аналогичной зрелым ГМК (Wang et al., 2014). Кроме того, иПСК способны дифференцироваться в мультипотентные стволовые клетки, которые тоже можно использовать для получения сосудистых клеток. Так, иПСК были получены из фибробластов аорты человека, которые стимулировали к дифференцировке в ГМК (Wang et al., 2014). После того как иПСК приобретали сократительный потенциал, их помещали на пористые матрицы из полимолочной кислоты, а через 2 нед после имплантации конструкций *in vivo* было показано, что их морфология соответствовала микроструктуре аорты по наличию и ориентации ГМК и синтезированного ВКМ (Wang et al., 2014). Похожие результаты были получены при заселении сосудистых графтов из полигликолиевой кислоты иПСК-ГМК человека в статическом биореакторе с последующей имплантацией в аорту крыс (Gui et al., 2016). Однако авторы отметили недостаточную механическую прочность имплантатов, которую связали с отсутствием механической стимуляции конструкции в период созревания *in vitro*. Впечатляющие результаты были получены при заселении полимерного высокопористого матрикса иПСК-ГМК человека в условиях перфузионного биореактора (Eoh et al., 2017). Воздействие напряжения сдвига пульсирующего тока жидкости на клеточно-полимерную конструкцию в течение 6 сут приводило к увеличению уровня экспрессии мРНК эластина, фибронектина и коллагена I. Отмечали также увеличение синтеза ВКМ, формирование зрелых эластических волокон и увеличение механической прочности по сравнению с образцами, культивированными в статических условиях. Несмотря на это, ГМК не меняли свой фенотип с сократительного на синтетический.

Исследование возможности применения иПСК в нуждах сосудистой тканевой инженерии стало популярным в последние годы, однако оно еще недостаточно активно из-за малой изученности этих клеток и необходимости улучшения протоколов работы с ними.

Лучше всего изучена возможность применения в сосудистой тканевой инженерии ММСК, в том числе и для получения ГМК. Существует несколько подходов к созданию гладкомышечного слоя тканеинженерного кровеносного сосуда из этих клеток — заселение графта недифференцированными ММСК с последующей имплантацией в кровеносное русло или созреванием графта *in vitro* под действием биохимических и биомеханических стимулов, а также дифференцировка ММСК в ГМК с последующей посадкой клеток на графт. Так, графты из сополимера полимолочной и полигликолиевой кислот, заселенные ММСК костного мозга собак, демонстрировали образование ГМК в средней части стенки и эндотелиальных клеток на внутренней поверхности графта через 24

нед после имплантации (Zhang et al., 2008). В другой работе дифференцировали ММСК человека из жировой ткани в ГМК и культивировали их на нетканых пористых матриксах из полигликолиевой кислоты в перфузионном биореакторе при пульсирующем токе жидкости в течение 8 нед: в графте, помещенном в динамические условия культивирования, формировался слой ГМК с новообразованным ВКМ (Wang et al., 2010). Однако следует заметить, что в этом случае клеточно-полимерная конструкция подвергалась только одноосному растяжению без напряжения сдвига. Культивирование сосудистых графтов из биосовместимых полимеров с недифференцированными ММСК в динамических условиях (ротационный и перфузионный биореактор) также способствовало тому, что клетки экспрессировали маркеры ГМК, формировали организованные слои и синтезировали ВКМ (Stefani et al., 2016; Lin, Mequanint, 2017).

Механическое воздействие на ММСК также позволяет регулировать их дифференцировку. Однако только воздействие циклической деформации на ММСК крысы и человека индуцирует экспрессию некоторых маркеров зрелых ГМК, например тяжелых цепей миозина (Nieronice et al., 2007; O'Searbhaill et al., 2010). Применение циклической деформации способствует повышению эффективности дифференцировки клеток, вызванной другими стимулами, например ростовыми факторами. Показано, что для поддержания фенотипа ГМК, полученных из ММСК с помощью факторов роста TGF- β 1 и BMP-4, и предотвращения потери маркеров ГМК требуется последующее циклическое напряжение (Wang et al., 2010). В другой работе продемонстрировано, что добавление TGF- β 1 и одновременное приложение напряжения оказывали положительный синергетический эффект на дифференцировку ММСК в ГМК (Kurpinski et al., 2009).

Создание эндотелиального и гладкомышечного слоев является основной целью при разработке функциональных тканеинженерных графтов. Хотя с другой стороны, формирование внешнего слоя большинством авторов считается необязательным, так как выраженная адвентиция присутствует только в крупных сосудах (Elliott, Geerecht, 2016). Потенциально возможен подход, при котором полимерные трубчатые матрицы из полимолочной кислоты заселяли фибробластами кроликов и культивировали в пульсирующем токе жидкости при физиологических условиях (Jang et al., 2017). Результаты показали значительную инфильтрацию стенки графта клетками с формированием естественного ВКМ благодаря перфузии конструкции с доставкой необходимых питательных веществ и кислорода.

Условия культивирования клеточных графтов в биореакторе

Большое количество исследований с использованием перфузионных пульсирующих биореакторов для создания тканеинженерных сосудов демонстрирует важность создания определенной динамической среды для успешного формирования артериоподобной структуры. В настоящее время не существует универсальных параметров для культивирования клеточных графтов в биореакторе, так как условия должны подбираться в зависимости от используемых клеточных линий, вида искусственного матрикса и материала, из которого он изготовлен, а также конструкции и возможностей биореактора. В качестве ис-

Биомеханические условия культивирования тканеинженерных сосудистых графтов из клеток человека в биореакторе

Матрикс	Клетки	Условия клеточной адгезии	Условия перфузии	Литературный источник
Трубчатый, получен самосборкой ВКМ из фибробластов, диаметр (D) 4.7 мм Из фиброина шелка, изготовлен электроспиннингом	HUVES, 3 млн кл./графт HUVES, 2.5 · 10 ⁵ кл./матрикс	Эндотелиальный слой Суспензия клеток на внутреннем слое графта, культивирование во вращающейся камере биореактора при 1 грм 4 ч Клетки культивировали на матриксе до образования конфлоэнтного слоя в статических условиях	Пульсирующий ток жидкости. Скорость потока 40 мл/мин, напряжение сдвига 0.65 дин/см ² , давление 25—40 мм рт. ст., время 1 нед Адаптационная нагрузка с напряжением сдвига на дин/см ² . Увеличение напряжения сдвига на 10 % каждые 2 ч до 11.8 дин/см ² , время 32 ч Ламинарный ток жидкости, скорость потока 2 мл/мин, напряжение сдвига 0.62 дин/см ² , время 14 сут	Tondreau et al., 2015 Liu et al., 2017 Melchiorri et al., 2016
Трубчатый, из ПГК, покрыт сополимером ПКЛ и ПМК, изготовлен с помощью формирования окунанием в раствор, D 1.4 мм Трубка, свернутая из пористой ПТФЭ-мембраны, D 08 мм	ЭПК, 5.0 · 10 ⁵ кл./графт ИПСК-ЭК, 7 · 10 ⁴ кл./см ²	Клетки на внутренней поверхности графта культивировали 30 мин в статических условиях Клетки на внутренней поверхности культивировали 4 ч в статических условиях	Пульсирующий ток, адаптационная нагрузка со скоростью потока 10 мл/мин, постепенное увеличение напряжения сдвига от 5 до 10 дин/см ² за 24 ч, время 24 ч	Sivagaratna et al., 2015
Трубчатый, из сополимера ПКЛ и ПМК, изготовлен электроспиннингом, D 5 мм	МСК, 5 · 10 ⁵ кл./см ²	Клетки на внутренней поверхности графта культивировали в системе горизонтального вращения при 1 об/мин 24 ч далее прекультивирование в статических условиях 2 сут	Перфузия с напряжением сдвига 2.5 дин/см ² , циклическое растяжение в окружном направлении 3 % (2 Гц, 250 мл/мин, 50.01 мм рт. ст.), 3 сут с последующим увеличением до 5 % (2 Гц, 400 мл/мин, 83.34 мм рт. ст.) в течение 4 сут	Kim et al., 2016
Децеллюляризованная пульпозная вена человека	ГМК пульпозной артерии 8 · 10 ⁶ кл./графт	Смесь клеток с гидрогелем на внешней поверхности графта полимеризовали	Пульсирующий ток, адаптационная нагрузка со скоростью потока 10 мл/мин, давление 10 мм рт.ст. в течение 24 ч. Со 2-х по 7-е сут скорость потока постепенно увеличивали до 120 мл/мин. Частота пульса 78 уд./мин (1.3 Гц), время: 6 нед	Tosun, McFetridge, 2015
Матрикс, получены электроспиннингом из смеси ПЭГД и ПМК, покрытые ГК	ИПСК-ГМК 1.5 · 10 ⁶ кл./матрикс	Клетки наносили на матрикс и культивировали 24 ч в статических условиях	Пульсирующий ток, адаптационная нагрузка со скоростью потока 0.37 мл/мин 1 сут. Далее скорость потока повышали до 0.74 мл/мин, время 17 сут	Eoh et al., 2017
Из нетканых волокон ПГК	МСК, жировой ткани, дифференцированные в ГМК, 5 · 10 ⁷ кл./матрикс	Клетки на матриксе культивировали 4 ч в небольшом количестве среды, далее добавляли среду и культивировали 7 сут в статических условиях. Клеточно-полимерную конструкцию оборачивали вокруг силиконовой трубки	Пульсирующий ток 78 уд./мин, скорость тока 70—80 мл/мин с постепенным увеличением до 100—120 мл/мин для достижения окружного растяжения стенки 5 %, время 8 нед	Wang et al., 2010
Трубчатые, из ПКЛ и сополимера лактида и триметилкарбоната, изготовлены электроспиннингом, D 4 мм	МСК, 2 · 10 ⁶ кл./см ²	Клетки на внешней поверхности графта помещали в ротационный биореактор для адгезии; 2 об/мин 3.5 ч	Ротационный биореактор с миогенной средой. Горизонтальное вращение (3 грм), время 14 сут	Stefani et al., 2016

Примечание. ПГК — полигликолиевая кислота, ПКЛ — поликапролактон, ПМК — полимолочная кислота, ПТФЭ — политетрафторэтилен, ПЭГД — полиэтиленгликоль диметакрилат.

ходных условий для работ с перфузионным биореактором могут быть использованы показатели, характерные для бедренной артерии человека. В бедренной артерии систолическое и диастолическое давление составляет соответственно 140 и 80 мм рт. ст., частота — 1 Гц, ток крови — 200 мл/мин, напряжение сдвига — около 10 дин/см², аксиальное удлинение — от 25 до 45 %, аксиальное напряжение — 65 кПа (Bilodeau et al., 2005).

В связи с тем что многие исследования, упомянутые в настоящем обзоре, использовали клетки животного происхождения, а условия работы с ними редко можно в полной мере использовать для клеток человека, мы приводим таблицу, в которой показаны параметры культивирования клеток человека на различных матриксах в динамических условиях.

Заключение

Процесс регенерации тканей обусловлен клеточным микроокружением, в котором клетки непрерывно подвергаются воздействию биохимических и динамических факторов (Van Naaften et al., 2017). Поэтому для того чтобы лучше контролировать формирование тканей *in vitro*, необходимо учитывать особенности используемых клеток, их способности к пролиферации, дифференцировке, формированию межклеточных контактов и ВКМ, ориентации в тканях и влияние различных стимулов на эти процессы. Исследование последних лет показали, что для успешной разработки функциональных тканеинженерных сосудистых графтов необходимо обеспечить правильную среду не только с оптимальной температурой, pH и биохимическими стимулами, но и механической нагрузкой для эффективного созревания клеточной конструкции *in vitro*. Обзор исследований показывает, что подход к созданию сосудистых графтов с воздействием напряжения сдвига и циклической деформации на ЭК, ГМК и фибробласты или их предшественники достаточно эффективен для формирования структурных слоев кровеносного сосуда и их поддержания. Однако требуются дальнейшие работы по поиску оптимального источника клеток и механических условий для создания *in vitro* полноценного кровеносного сосуда для клинического применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-20004).

Список литературы

Антонова Л. В., Кудрявцева Ю. А. 2016. Разработка тканеинженерного сосудистого графта малого диаметра для нужд сердечно-сосудистой хирургии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 5 (3) : 6—9. (Antonova L. V., Kudryavtseva Y. A. 2016. Development of tissue engineered small diameter vascular graft for the cardiovascular surgery needs. Complex Issues Cardiovas. Diseases. 5 (3) : 6—9.)
 Матвеева В. Г., Антонова Л. В., Севостьянова В. В., Великанова Е. А., Кривкина Е. О., Глушкова Т. В., Ходыревская Ю. И., Барбараш О. Л., Барбараш Л. С. 2017. Модификация RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона: результаты экспериментального исследования. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 16 (3) : 10—19. (Matveeva V. G., Antonova L. V., Sevostyanova V. V., Velikanova E. A., Krivkina E. O., Glushkova T. V., Khodyrevskaya Y. I., Barbarash O. L., Barbarash L. S. 2017. The

importance of herpesviruses in the etiology of a number of infectious and somatic diseases of children. Complex Issues Cardiovas. Diseases. 16 (3) : 10—19.)

Adams W. J., Zhang Y., Cloutier J., Kuchimanchi P., Newton G., Sehrawat S., Aird W. C., Mayadas T. N., Luscinikas F. W., Garcia-Cardena G. 2013. Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. Stem Cell Rep. 1 : 105—113.

Ahn H., Ju Y. M., Takahashi H., Williams D. F., Yoo J. J., Lee S. J., Okano T., Atala A. 2015. Engineered small diameter vascular grafts by combining cell sheet engineering and electrospinning technology. Acta Biomater. 16 : 14—22.

Ahsan T., Nerem R. M. 2010. Fluid shear stress promotes an endothelial-like phenotype during the early differentiation of embryonic stem cells. Tissue Engineering. 16 : 3547—3553.

Allen J. B., Khan S., Lapidus K. A., Ameer G. A. 2010. Toward engineering a human neoendothelium with circulating progenitor cells. Stem Cells. 28 : 318—328.

Ankeny R. F., Ankeny C. J., Nerem R. M., Jo H. 2012. Maturing EPCs into endothelial cells: may the force be with the EPCs. Focus on «Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells». Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 303 : C589—C591.

Argento G., Simonet M., Oomens C. W. J., Baaijens F. P. T. 2012. Multi-scale mechanical characterization of scaffolds for heart valve tissue engineering. J. Biomech. 45 : 2893—2898.

Atkins G. B., Jain M. K. 2007. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. Circ. Res. 100 : 1686—1695.

Barreto-Ortiz S. F., Fradkin J., Eoh J., Trivero J., Davenport M., Ginn B., Mao H.-Q., Gerecht S. 2015. Fabrication of 3-dimensional multicellular microvascular structures. FASEB J. 29 : 3302—3314.

Benrashed E., McCoy C. C., Youngwirth L. M., Kim J., Manson R. J., Otto J. C., Lawson J. H. 2016. Tissue engineered vascular grafts: origins, development, and current strategies for clinical application. Methods. 99 : 13—19.

Bhattacharya V., McSweeney P. A., Shi Q., Bruno B., Ishida A., Nash R., Storb R. F., Sauvage L. R., Hammond W. P., Wu M. H. 2000. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34 (1) bone marrow cells. Blood. 95 : 581—585.

Bilodeau K., Couet F., Boccafoschi F., Mantovani D. 2005. Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses. Artif. Organs. 29 : 906—912.

Buttafoco L., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A. A., Dijkstra P. J., Vermes I., Feijen J. 2006. Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor. Biomaterials. 27 : 2380—2389.

Chanet S., Martin A. C. 2014. Mechanical force sensing in tissues. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 126 : 317—352.

Cheng C., Helderma F., Tempel D., Segers D., Hierck B., Poelmann R., van Tol A., Duncker D. J., Robbers-Visser D., Ursem N. T. C., van Haperen R., Wentzel J. J., Gijzen F., van der Steen A. F., de Crom R., Krams R. 2007. Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species. Atherosclerosis. 195 : 225—235.

Chiu W. C., Chiou T. J., Chiang A. N. 2012. β_2 -Glycoprotein I inhibits endothelial cell migration through the nuclear factor κ B signalling pathway and endothelial nitric oxide synthase activation. Biochem. J. 445 : 125—133.

Couet F., Mantovani D. 2012. Perspectives on the advanced control of bioreactors for functional vascular tissue engineering *in vitro*. Expert. Rev. Med. Devices. 9 : 233—239.

Couet F., Meghezi S., Mantovani D. 2012. Fetal development, mechanobiology and optimal control processes can improve vascular tissue regeneration in bioreactors: an integrative review. Med. Eng. Phys. 34 : 269—278.

Dan P., Velot E., Decot V., Menu P. 2015. The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. J. Cell Sci. 128 : 2415—2422.

- Deanfield J. E., Halcox J. P., Rabelink T. J. 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 115 : 1285—1295.
- De Jonge N., Kanters F. M. W., Baaijens F. P. T., Bouten C. V. C. 2013. Strain-induced collagen organization at the micro-level in fibrin-based engineered tissue constructs. *Ann. Biomed. Eng.* 41 : 763—774.
- Dong J.-D., Gu Y.-Q., Li C.-M., Wang C.-R., Feng Z.-G., Qiu R.-X., Chen B., Li J.-X., Zhang S.-W., Wang Z.-G., Zhang J. 2009. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol. Sin.* 30 : 530—536.
- Drews J. D., Miyachi H., Shinoka T. 2017. Tissue-engineered vascular grafts for congenital cardiac disease: clinical experience and current status. *Trends Cardiovasc. Med.* 27 : 521—531.
- Egorova A. D., DeRuiter M. C., De Boer H. C., Van De Pas S., Gittenberger-De Groot A. C., Van Zonneveld A. J., Poelmann R. E., Hierck B. P. 2012. Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *Vitr. Cell. Develop. Biol. Anim.* 48 : 21—29.
- Elliott M. B., Gerecht S. 2016. Three-dimensional culture of small-diameter vascular grafts. *J. Mater. Chem. B*. 4 : 3443—3453.
- El Omar R., Beroud J., Stoltz J.-F., Menu P., Velot E., Decot V. 2014. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng. Pt B. Rev.* 20 : 523—544.
- Eoh J. H., Shen N., Burke J. A., Hinderer S., Xia Z., Schenke-Layland K., Gerecht S. 2017. Enhanced elastin synthesis and maturation in human vascular smooth muscle tissue derived from induced-pluripotent stem cells. *Acta Biomater.* 52 : 49—59.
- Fernandez C. E., Achneck H. E., Reichert W. M., Truskey G. A. 2014. Biological and engineering design considerations for vascular tissue engineered blood vessels (TEBVs). *Curr. Opin. Chem. Eng.* 3 : 83—90.
- Fisher A. B., Chien S., Barakat A. I., Nerem R. M. 2001. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281 : L529—L533.
- Gabbieri D., Dohmen P. M., Koch C., Lembcke A., Rutsch W., Konertz W. 2007. Aortocoronary endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene graft: 9-year patency. *Ann. Thorac. Surg.* 83 : 1166—1168.
- Genet M., Rausch M., Lee L., Choy S., Zhao X., Kassab G., Kozerke S., Guccione J., Kuhl E. 2015. Heterogeneous growth-induced prestrain in the heart. *J. Biomech.* 48 : 2080—2089.
- Glynn J. J., Hinds M. T. 2014. Endothelial outgrowth cells: function and performance in vascular grafts. *Tissue Eng. Pt. B. Rev.* 20 : 294—303.
- Gong X., Liu H., Ding X., Liu M., Li X., Zheng L., Jia X., Zhou G., Zou Y., Li J., Huang X., Fan Y. 2014. Physiological pulsatile flow culture conditions to generate functional endothelium on a sulfated silk fibroin nanofibrous scaffold. *Biomaterials*. 35 : 4782—4791.
- Gui L., Dash B. C., Luo J., Qin L., Zhao L., Yamamoto K., Hashimoto T., Wu H., Dardik A., Tellides G., Niklason L. E., Qyang Y. 2016. Implantable tissue-engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 102 : 120—129.
- Hahn M. S., McHale M. K., Wang E., Schmedlen R. H., West J. L. 2007. Physiological pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts. *Ann. Biomed. Eng.* 35 : 190—200.
- Herring M., Gardner A., Glover J. 1978. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*. 84 : 498—504.
- Hibino N., Duncan D. R., Nalbandian A., Yi T., Qyang Y., Shinoka T., Breuer C. K. 2012. Evaluation of the use of an induced pluripotent stem cell sheet for the construction of tissue-engineered vascular grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 143 : 696—703.
- Hoch E., Tovar G. E., Borchers K. 2014. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 46 : 767—778.
- Hoening M. R., Campbell G. R., Rolfe B. E., Campbell J. H. 2005. Tissue-engineered blood vessels: alternative to autologous grafts? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 1128—1134.
- Hofmann N. A., Reinisch A., Strunk D. 2009. Isolation and large scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells. *J. Vis. Exp.* 32 : 1524.
- Hu J., Xie C., Ma H., Yang B., Ma P. X., Chen Y. E. 2012. Construction of vascular tissues with macro-porous nano-fibrous scaffolds and smooth muscle cells enriched from differentiated embryonic stem cells. *PLoS ONE*. 7 : e35580.
- Huang A. H., Balestrini J. L., Udelsman B. V., Zhou K. C., Zhao L., Ferruzzi J., Starcher B. C., Levene M. J., Humphrey J. D., Niklason L. E. 2016. Biaxial stretch improves elastic fiber maturation, collagen arrangement, and mechanical properties in engineered arteries. *Tissue Eng. Pt C. Methods*. 22 : 524—533.
- Huang H., Nakayama Y., Qin K., Yamamoto K., Ando J., Yamashita J., Itoh H., Kanda K., Yaku H., Okamoto Y., Nemoto Y. 2005. Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under *in vitro* pulsatile flow loading. *J. Artif. Organs*. 8 : 110—118.
- Humphrey J. D. 2008. Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels. *Cell Biochem. Biophys.* 50 : 53—78.
- Humphrey J. D., Eberth J. F., Dye W. W., Gleason R. L. 2009. Fundamental role of axial stress in compensatory adaptations by arteries. *J. Biomech.* 4 : 1—8.
- Jang B. S., Cheon J. Y., Kim S. H., Park W. H. 2017. Small diameter vascular graft with fibroblast cells and electrospun poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds: cell matrix engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23 : 1—18.
- Kim D. H., Heo S. J., Kang Y. G., Shin J. W., Park S. H., Shin J. W. 2016. Shear stress and circumferential stretch by pulsatile flow direct vascular endothelial lineage commitment of mesenchymal stem cells in engineered blood vessels. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27 : 60.
- Kim D. H., Heo S.-J., Kim S.-H., Shin J. W., Park S. H., Shin J.-W. 2011. Shear stress magnitude is critical in regulating the differentiation of mesenchymal stem cells even with endothelial growth medium. *Biotechnol. Lett.* 33 : 2351—2359.
- Kim K. L., Song S. H., Choi K. S., Suh W. 2013. Cooperation of endothelial and smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells enhances neovascularization in dermal wounds. *Tissue Eng. (A)*. 19 : 2478—2485.
- Kirton J. P., Xu Q. 2010. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc. Res.* 79 : 193—199.
- Kobayashi N., Yasu T., Ueba H., Sata M., Hashimoto S., Kuroki M., Saito M., Kawakami M. 2004. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp. Hematol.* 32 : 1238—1245.
- Kona S., Chellamuthu P., Xu H., Hills S. R., Nguyen K. T. 2009. Effects of cyclic strain and growth factors on vascular smooth muscle cell responses. *Open. Biomed. Eng. J.* 3 : 28—38.
- Kou B., Zhang J., Singer D. R. 2009. Effects of cyclic strain on endothelial cell apoptosis and tubulogenesis are dependent on ROS production via NAD(P)H subunit p22phox. *Microvasc. Res.* 77 : 125—133.
- Krawiec J. T., Vorp D. A. 2012. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: a review. *Biomaterials*. 33 : 3388—3400.
- Kurpinski K., Chu J., Wang D., Li S. 2009. Proteomic profiling of mesenchymal stem cell responses to mechanical strain and TGF-beta1. *Cell. Mol. Bioeng.* 2 : 606—614.
- Laube H. R., Duwe J., Rutsch W., Konertz W. 2000. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120 : 134—141.
- Li S., Sengupta D., Chien S. 2014. Vascular tissue engineering: from *in vitro* to *in situ*. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 6 (1) : 61—76.
- Lin S., Mequanint K. 2017. Bioreactor-induced mesenchymal progenitor cell differentiation and elastic fiber assembly in engineered vascular tissues. *Acta Biomater.* 59 : 200—209.
- Liu F., Bhang S. H., Arentson E., Sawada A., Kim C. K., Kang I., Yu J., Sakurai N., Kim S. H., Yoo J. J., Kim P., Pahng S. H., Xia Y., Solnica-Krezel L., Choi K. 2013. Enhanced hemangioblast generation and improved vascular repair and regeneration from embryonic

- nic stem cells by defined transcription factors. *Stem Cell Rep.* 1 : 166—182.
- Liu H., Gong X., Jing X., Ding X., Yao Y., Huang Y., Fan Y. 2017. Shear stress with appropriate time-step and amplification enhances endothelial cell retention on vascular grafts. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 : 2965—2978.
- Maul T. M., Chew D. W., Nieponice A., Vorp D. A. 2011. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 10 : 939—953.
- Melchiorri A. J., Bracaglia L. G., Kimerer L. K., Hibino N., Fisher J. P. 2016. *In vitro* endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Eng. (Methods)*. 22 : 663—670.
- Michiels C. 2003. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196 : 430—443.
- Nakayama K. H., Joshi P. A., Lai E. S., Gujar P., Joubert L. M., Chen B., Huang N. F. 2015. Layered vascular graft derived from human induced pluripotent stem cells with biomimetic structure and function. *Regen. Med.* 10 : 745—755.
- Nayak L., Lin Z., Jain M. K. 2011. «Go with the flow»: how Kruppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress. *Antioxid. Redox Signal.* 15 : 1449—1461.
- Neff L. P., Tillman B. W., Yazdani S. K., Machingal M. A., Yoo J. J., Soker S., Bernish B. W., Geary R. L., Christ G. J. 2011. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels *in vivo*. *J. Vasc. Surg.* 53 : 426—434.
- Ngu H., Feng Y., Lu L., Oswald S. J., Longmore G. D., Yin F. C. 2010. Effect of focal adhesion proteins on endothelial cell adhesion, motility and orientation response to cyclic strain. *Ann. Biomed. Eng.* 38 : 208—222.
- Nieponice A., Maul T.M., Cumer J. M., Soletti L., Vorp D. A. 2007. Mechanical stimulation induces morphological and phenotypic changes in bone marrow-derived progenitor cells within a three-dimensional fibrin matrix. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 81 : 523—530.
- O’Cearbhaill E. D., Murphy M., Barry F., McHugh P. E., Barron V. 2010. Behavior of human mesenchymal stem cells in fibrin-based vascular tissue engineering constructs. *Ann. Biomed. Eng.* 38 : 649—657.
- Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehniger G., Bornhäuser M., Werner C. 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells.* 22 : 377—384.
- Owatverot T. B., Oswald S. J., Chen Y., Wille J. J., Yin F. C. P. 2005. Effect of combined cyclic stretch and fluid shear stress on endothelial cell morphological responses. *J. Biomech. Eng.* 127 : 374—382.
- Park J. S., Huang N. F., Kurpinski K. T., Patel S., Hsu S., Li S. 2007. Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. *Front. Biosci.* 12 : 5098—5116.
- Rausch M.K., Kuhl E. 2013. On the effect of prestrain and residual stress in thin biological membranes. *J. Mech. Phys. Solids.* 61 : 1955—1969.
- Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lv J., Ma N., Li W. 2015. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem. Soc. Rev.* 44 : 5680—5742.
- Rufaihah A. J., Huang N. F., Jame S., Lee J. C., Nguyen H. N., Byers B., De A., Okogbaa J., Rollins M., Reijo-Pera R., Gambhir S. S., Cooke J. P. 2011. Endothelial cells derived from human iPSCs increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 : e72—e79.
- Sakamoto N., Ohashi T., Sato M. 2004. Effect of shear stress on permeability of vascular endothelial monolayer cocultured with smooth muscle cells. *JSME Int. J.* 47 : 992—999.
- Shen G., Tsung H. C., Wu C. F., Liu X. Y., Wang X. Y., Liu W., Cui L., Cao Y. L. 2003. Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells. *Cell Res.* 13 : 335—341.
- Shi Z. D., Tarbell J. M. 2011. Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Ann. Biomed. Eng.* 39 : 1608—1619.
- Shyu K. G. 2009. Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes. *Clin. Sci.* 116 : 377—389.
- Sivarapatna A., Ghaedi M., Le A. V., Mendez J. J., Qyang Y., Niklason L. E. 2015. Arterial specification of endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells in a biomimetic flow bioreactor. *Biomaterials.* 53 : 621—633.
- Sobue K., Hayashi K., Nishida W. 1999. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol. Cell. Biochem.* 190 : 105—118.
- Stefani I., Asnaghi M. A., Cooper-White J. J., Mantero S. 2016. A double chamber rotating bioreactor for enhanced tubular tissue generation from human mesenchymal stem cells: a promising tool for vascular tissue regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12 : e42—e52.
- Stella J. A., Liao J., Hong Y., Merryman W. D., Wagner W. R., Sacks M. S. 2010. Tissue-to-cellular deformation coupling in cell-microintegrated elastomeric scaffolds. *Biomaterials.* 29 : 83 228—83 236.
- Stroncek J. D., Ren L. C., Klitzman B., Reichert W. M. 2012. Patient-derived endothelial progenitor cells improve vascular graft patency in a rodent model. *Acta Biomater.* 8 : 201—208.
- Talacua H., Smits A. I., Muylaert D. E., van Rijswijk J. W., Vink A., Verhaar M. C., Driessen-Mol A., van Herwerden L. A., Bouten C. V., Kluin J., Baaijens F. P. 2015. *In situ* tissue engineering of functional small-diameter blood vessels by host circulating cells only. *Tissue Eng. (A)*. 21 : 2583—2594.
- Thomas L. V., Nair P. D. 2012. Influence of mechanical stimulation in the development of a medial equivalent tissue-engineered vascular construct using a gelatin-g-vinyl acetate co-polymer scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 23 : 2069—2087.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282 : 1145—1147.
- Tondreau M. Y., Laterreur V., Gauvin R., Vallieres K., Bourget J. M., Lacroix D., Tremblay C., Germain L., Ruel J., Auger F. A. 2015. Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater.* 18 : 176—185.
- Tosun Z., McFetridge P. S. 2015. Variation in cardiac pulse frequencies modulates vSMC phenotype switching during vascular remodeling. *Cardiovasc. Eng. Technol.* 6 (1) : 59—70.
- Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W. B., Dejana E., Schultz D. A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M. A. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 437 : 426—431.
- Van Haften E. E., Bouten C. V. C., Kurniawan N. A. 2017. Vascular mechanobiology: towards control of *in situ* regeneration. *Cells.* 6 : E19.
- Van Thienen J. V., Fledderus J. O., Dekker R. J., Rohlena J., van Ijzendoorn G. A., Kootstra N. A., Pannekoek H., Horrevorts A. J. 2006. Shear stress sustains atheroprotective endothelial KLF2 expression more potently than statins through mRNA stabilization. *Cardiovasc. Res.* 72 : 231—240.
- Wang C., Baker B. M., Chen C. S., Schwartz M. A. 2013. Endothelial cell sensing of flow direction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 : 2130—2136.
- Wang C., Cen L., Yin S., Liu Q., Liu W., Cao Y., Cui L. 2010. 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.* 31 : 621—630.
- Wang D. M., Tarbell J. M. 1995. Modeling interstitial flow in an artery wall allows estimation of wall shear stress on smooth muscle cells. *J. Biomech. Eng.* 117 : 358—363.
- Wang H., Li M., Lin P. H., Yao Q., Chen C. 2008. Fluid shear stress regulates the expression of TGF-beta1 and its signaling molecules in mouse embryo mesenchymal progenitor cells. *J. Surg. Res.* 150 : 266—270.

- Wang Y., Hu J., Jiao J., Liu Z., Zhou Z., Zhao C., Chang L. J., Chen Y. E., Ma P. X., Yang B. 2014. Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 35 : 8960—8969.
- Wu C.-C., Chao Y.-C., Chen C.-N., Chien S., Chen Y.-C., Chien C.-C., Chiu J.-J., Linju Yen B. 2008. Synergism of biochemical and mechanical stimuli in the differentiation of human placenta-derived multipotent cells into endothelial cells. *J. Biomech*. 41 : 813—821.
- Yamamoto K., Takahashi T., Asahara T., Ohura N., Sokabe T., Kamiya A., Ando J. 2003. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J. Appl. Physiol*. 95 : 2081—2088.
- Zhang L., Zhou J., Lu Q., Wei Y., Hu S. 2008. A novel small-diameter vascular graft: *in vivo* behavior of biodegradable three-layered tubular scaffolds. *Biotechnol. Bioeng*. 99 : 1007—1015.
- Zhang P., Baxter J., Vinod K., Tulenko T. N., Di Muzio P. J. 2009. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Develop*. 18 : 1299—1308.
- Zhao J., Griffin M., Cai J., Li S., Bulter P. E. M., Kalaskar D. M. 2016. Bioreactors for tissue engineering: an update. *Biochem. Eng. J*. 109 : 268—281.
- Zhao S., Suciu A., Ziegler T., Moore J. E. jr., Bürki E., Meister J. J., Brunner H. R. 1995. Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 15 : 1781—1786.
- Zhao T., Zhang Z. N., Rong Z., Xu Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 474 : 212—215.
- Zhao X. Y., Li W., Lv Z., Liu L., Tong M., Hai T., Hao J., Guo C. L., Ma Q. W., Wang L., Zeng F., Zhou Q. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 461 : 86—90.
- Zheng X., Wu Y., Zhu L., Chen Q., Zhou Y., Yan H., Chen T., Xiao Q., Zhu J., Zhang L. 2013. Angiotensin II promotes differentiation of mouse embryonic stem cells to smooth muscle cells through PI3-kinase signaling pathway and NF- κ B. *Differentiation*. 85 : 41—54.
- Zou T., Fan J., Fartash A., Liu H., Fan Y. 2016. Cell-based strategies for vascular regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 104 : 1297—1314.

Поступила 19 II 2018

THE BIOMECHANICAL STIMULI FOR REGULATION OF VASCULAR TISSUE FORMATION *IN VITRO*

V. V. Sevostyanova,* E. A. Velikanova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, 650002;
* e-mail: sevostyanova.victoria@gmail.com

The achievements of regenerative medicine in the field of cardiovascular diseases promote success in the development of tissue engineering of blood vessels. Construction of artificial blood vessels requires a deep understanding of the basic mechanisms of functioning and remodeling of the native organ. In addition, the creation of critical parameters and environmental conditions is significant for formation of structured tissues and functional organs. The main problems of vascular tissue engineering include providing required signals and conditions in the microenvironment of cells to stimulate effective growth of tissues with a proper hierarchical organization. These signals are biologically active molecules, for example, growth factors, and mechanical cues that affect cells and regulate their functions. In this article, we considered the main mechanical stimuli affecting the vascular cells *in vivo*, as well as the possibility of applying them to create a dynamic environment *in vitro* for development of tissue-engineering blood vessels using various types of cells.

Key words: blood vessels, tissue engineering, endothelial cells, smooth muscle cells, stem cells, shear stress, cyclic strain, bioreactor.