

На правах рукописи

НАСРЕДИНОВ АРТЁМ СЕРГЕЕВИЧ

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО КАЛИБРА
НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ АРТЕРИИ ПУПОВИНЫ
ЧЕЛОВЕКА

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Вавилов Валерий Николаевич**,

доктор медицинских наук **Анисимов Сергей Владимирович**.

Официальные оппоненты:

Хубулава Геннадий Григорьевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России, 1 кафедра и клиника хирургии (усовершенствования врачей) им. П. А. Куприянова, начальник кафедры,

Майбородин Игорь Валентинович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, лаборатория стволовой клетки, главный научный сотрудник

Ведущая организация - ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»

Защита состоится " _____ " _____ 2016 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 на базе ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2) и на сайте www.almazovcentre.ru.

Автореферат разослан " _____ " _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 208.054.04

доктор медицинских наук, профессор

Недошивин Александр Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Быстрое развитие сердечно-сосудистой хирургии выявило очевидный в настоящее время дефицит сосудистых кондуитов малого диаметра. Последние необходимы для таких распространенных операций как аорто-коронарное шунтирование, реваскуляризация артерий нижних конечностей, создание артериовенозных фистул для гемодиализа и других. Лучшим материалом для шунтов принято считать аутологичные вены и артерии. Однако они не всегда доступны из-за различного ряда наблюдаемых в них изменений или из-за того, что они уже были использованы во время предыдущих операций. Синтетические протезы с успехом применяются при шунтировании сосудов с диаметром более 6 мм, но при меньшем размере они быстро тромбируются. Это обуславливает высокую потребность в получении сосудистых протезов малого диаметра, которые по основным характеристикам не отличались бы от аутошунтов (Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Seifu D.G. et al., 2013).

Создание искусственного сосудистого кондуита с проходимостью, подобной той, что наблюдается при использовании нативных вен или артерий, по мнению некоторых авторов - утопия (Conte M.S., 1998; Kakisis J.D. et al., 2005; Naito Y. et al, 2011, 2014).

Однако, тканевая инженерия - новая междисциплинарная область науки, занимающаяся разработкой биологических заменителей, для восстановления, сохранения и улучшения функции тканей или целого органа - уже сегодня опровергает эту точку зрения (McIntire L.V., 2003; Peck M. et al., 2011; Seifu D.G. et al., 2013). Благодаря исследованиям в этом направлении, к настоящему времени предложены варианты «изготовления» сосудов, которые приближаются по своим характеристикам к естественным их заменителям (Nerem R.M., Seliktar D., 2001; Baguneid M.S., 2006; Quint C. et al., 2011).

Во многих странах мира активно ведутся поиски оптимального материала для создания основы тканеинженерного кровеносного сосуда (ТИКС), выбор оптимального клеточного материала и способа его доставки на носитель. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие отечественных работ, посвященных данной тематике.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования, используя методы тканевой инженерии, разработать способ создания кровеносного сосуда диаметром 3-4 мм из децеллюляризованной артерии пуповины человека, который по своим морфологическим и механическим свойствам был бы идентичен нативной артерии. Оценить эти свойства на экспериментальной модели.

В задачи исследования входило:

1. Разработка эффективной методики децеллюляризации артерий пуповины человека, оценка структуры, антигенного потенциала и механических свойств внеклеточного

матрикса децеллюляризованных артерий пуповины.

2. Определение возможности длительного хранения децеллюляризованных артерий пуповины для создания «банка» сосудистых заменителей с целью сокращения временных и финансовых затрат на получение готового к использованию тканеинженерного кровеносного сосуда.
3. Разработка технологии заселения децеллюляризованных артерий пуповины жизнеспособными стволовыми клетками *in vitro*, оценка их пролиферативной активности.
4. Оценка морфофункциональных свойств полученных тканеинженерных кровеносных сосудов *in vivo* в эксперименте на мелких лабораторных животных.

Научная новизна

Разработан оригинальный способ децеллюляризации артерий пуповины человека комбинированным детергентно-ферментным способом, патент РФ на изобретение №2504334.

Впервые проведена комплексная оценка морфологических и механических свойств артерий пуповины, децеллюляризация которых проведена оригинальным способом.

Определена оптимальная плотность посева на децеллюляризованные артерии пуповины мезенхимных стволовых клеток (МСК) и необходимая длительность их культивирования *in vitro* в проточном биореакторе оригинальной конструкции.

Показана возможность создания тканеинженерного кровеносного сосуда на основе децеллюляризованной артерии пуповины, заселенных МСК.

Оценена проходимость полученных тканеинженерных кровеносных сосудов в экспериментах *in vivo*. Получены сведения о появлении в тканеинженерном сосуде *in vivo* дифференцированных клеток нормальной сосудистой стенки: эндотелиоцитов и миоцитов.

Теоретическое и практическое значение работы

Доказана возможность эффективной децеллюляризации артерий пуповины человека. Разработана новая методика децеллюляризации артерий пуповины. Создан оригинальный биореактор для успешного посева МСК на матрицу децеллюляризованной артерии пуповины. Получен сосуд, который может быть использован в продолжении экспериментальной работы в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» и других лабораториях. Можно и необходимо исследовать возможность использования изготовленного сосуда в клинической практике.

Положения, выносимые на защиту

1. Артерии пуповины могут быть использованы в качестве основы для создания тканеинженерного кровеносного сосуда.
2. Разработанный способ децеллюляризации артерий пуповины эффективно удаляет клетки и клеточный дебрис, оставляя внеклеточный матрикс артерии интактным.

3. Механические свойства нативных артерий сохраняются после децеллюляризации. Децеллюляризованные артерии пуповины могут длительное время (до 10 мес.) храниться без изменения своих механических свойств.
4. Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации артерий пуповины, лишенных клеточного состава.
5. Рецеллюляризация артерий пуповины по разработанной методике позволяет получить кровеносный сосуд, свойства которого близки естественному.
6. Высокая проходимость этих сосудов подтверждена в эксперименте.

Личное участие автора в проведении исследования

Тема и план диссертации, её основные идеи и содержание разработаны совместно с научными руководителями. Автором изучена литература в данной области науки, в том числе на иностранном языке. Самостоятельно обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель, задачи и этапы научного исследования и проведения экспериментов.

Диссертант самостоятельно выделял артерии из пуповин, лично отработывал различные способы децеллюляризации, проводил их сравнительный анализ. Оригинальный способ децеллюляризации артерий пуповины разработан автором. Механические испытания нативных и децеллюляризованных артерий пуповины проводились автором совместно с сотрудником СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) Лебедевой Е.А. Диссертант получал и культивировал МСК, проводил эксперименты по их заселению на децеллюляризованные артерии пуповины.

Автором разработана конструкция биореактора и способ рецеллюляризации.

Автор проводил эксперименты по имплантации исследуемых сосудов лабораторным животным. Наблюдение и уход за животными осуществлялся совместно с сотрудниками вивария. Выведение животных из эксперимента и забор сосуда проводился автором.

Гистологические препараты изготавливались лаборантами отделения патоморфологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова» Минздрава России. Иммуногистохимические препараты изготавливала научный сотрудник НИЛ патоморфологии Бещук О.В. Анализ препаратов проводил диссертант совместно с заведующей НИЛ патоморфологии д.м.н. Митрофановой Л.Б. Сбор, обобщение, анализ, обработка результатов и написание диссертации выполнены автором.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертаций, и 6 тезисов докладов. Получен 1 патент РФ на изобретение. Материалы диссертации были представлены на XIX Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2013), на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013), на VII

Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2014) и на собраниях проблемных комиссий института сердечно-сосудистой хирургии и института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрированного 44 рисунками и 3 таблицами, содержит введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, выводы, список литературы, который включает 13 отечественных источника и 171 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В качестве основы тканеинженерного сосуда малого калибра использовали артерию пуповины (АП) человека. Препарирование артерий не сложно, несмотря на «нежность» их стенки и малый диаметр сосуда. С использованием стандартного хирургического инструментария - пинцета и ножниц - возможно выделение большого количества материала в течение короткого периода времени. АП разделяли на участки длиной 5 см. Всего в ходе работы исследовано более 200 фрагментов АП.

На основании анализа литературы были выбраны и апробированы 6 различных способов децеллюляризации кровеносных сосудов, которые описаны авторами как эффективные (Daniel J. et al., 2005; Amiel G.E. et al., 2006; Liu G.F. et al., 2008; Егорова М.В. с соавт., 2011; Böer U. et al., 2011; Smith A.N., 2011). По каждому протоколу было обработано 3 фрагмента АП (всего было изготовлено и изучено 18 фрагментов АП, 48 гистологических препаратов). Однако ни один из этих вариантов не привел к полной элиминации клеточного дебриса из стенки сосуда. Анализ изученных вариантов децеллюляризации позволил сформировать собственную методику. Разработанный способ удаления клеток из стенки кровеносных сосудов состоит из нескольких этапов со сменой децеллюляризирующих растворов, в составе которых используются детергенты и ферменты, так поступали и другие исследователи, однако разработанный способ отличается составом, последовательностью и длительностью применения децеллюляризирующих агентов, их более низкой концентрацией и использованием дополнительного физического воздействия – вибрации. В таком сочетании методы, ведущие к удалению клеток из ткани, ранее никем не были использованы. В то же время именно это по нашему мнению определило результат.

Оригинальная технология удаления клеток из сосудистой стенки является следствием многократных экспериментов (не менее 16) со сменой параметров децеллюляризации, таких как: длительность, температура, концентрация и очередность использованных децеллюляризационных агентов. Самым сложным оказалось соблюсти баланс между

максимально полным удалением клеток и их остатков с минимальным повреждением ВКМ. Это было достигнуто следующим образом: после подбора оптимальной последовательности реагентов уменьшали их изначально высокую концентрацию и время их воздействия до минимально необходимого уровня, при котором децеллюляризация оставалась эффективной.

Децеллюляризованные артерии пуповины (ДАП) стандартно окрашивали гематоксилином и эозином для общей оценки препарата и визуализации ядер клеток. Для определения сохранности ВКМ, срезы окрашивали по Ван-Гизону с эластикой. Также проводили ИГХ анализ, используя непрямой двойной метод визуализации EnVision согласно протоколу производителя (EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB Rabbit/Mouse Kit, Dako, Дания). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к антигенам CD31 (PECAM-1) и к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA) (Dako, Дания).

Для визуального определения нуклеиновых кислот в образцах тканей использовали окраску DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), высокотропную к ДНК и РНК.

Для количественного изучения содержания ДНК и РНК в децеллюляризованных артериях исследовали 3 фрагмента ДАП, фрагмент нативной АП в качестве положительного контроля, и ФСБ в качестве отрицательного контроля. ДНК выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, США) согласно протоколу производителя. Экстракцию РНК проводили хлороформом, затем её преципитировали изопропанолом из водной фазы, отмывали 75% этанолом, сушили воздухом при комнатной температуре и растворяли в чистой воде. Количественный анализ нуклеиновых кислот проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), качественный анализ РНК - на анализаторе BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, США), с использованием системы RNA nano chip (Agilent Technologies, США).

Хранение децеллюляризованных артерий

Для определения возможности длительного хранения ДАП исследованы 2 способа. В первом случае, ДАП помещали в криовials (Nunc, США), замораживали и хранили при -80°C от 1 до 3 мес. ($n=25$). В качестве криопротектора использовали ФСБ с 10 % диметилсульфоксидом (Sigma, США). Второй способ заключался в хранении ДАП в 15 мл полипропиленовых пробирках типа Falcon (Sarsted, Германия; Orange scientific, Бельгия), в стерильном ФСБ с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США), при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Изучение механических свойств артерий пуповины человека до и после децеллюляризации

Поскольку прочность будущего тканеинженерного сосуда напрямую зависит от механических характеристик носителя клеток, эти свойства артерий пуповины после децеллюляризации и были изучены. опыты разделили на 4 группы: I группа (контроль) -

нативные АП; II группа – ДАП; III группа - ДАП, после хранения в течение 10 мес. (без замораживания); IV группа — криоконсервированные ДАП.

Определение механической прочности сосудов проводили путем заполнения их жидкостью до разрыва ($n=10$ в каждой группе), регистрировали максимальное (пиковое) давление, при котором происходило разрушение сосуда. Сравнивали результаты для четырех групп сосудистых кондуитов.

Изучение упруго-эластических свойств АП или ДАП в продольном и поперечном направлениях, их устойчивость к прорезыванию шовным материалом проводили на универсальной разрывной машине Instron 5543 (Instron, США). Результаты исследований регистрировали и обрабатывали на компьютере с помощью прилагаемого программного обеспечения Bluehill2.

Посев клеток на децеллюляризованные артерии пуповины (рецеллюляризация)

Для культивирования клеток и проведения экспериментов по рецеллюляризации, использовали питательную среду α -MEM (ПанЭко, Россия) с 10 % фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, США), 1 % глутамина (Invitrogen, США) и 1 % смесью пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США) без добавления факторов роста. Культивирование клеток и рецеллюляризацию сосудистых кондуитов проводили в лабораторном CO_2 -инкубаторе ShelLab (Sheldon Manufacturing, США) при 5 % содержании CO_2 и температуре 37 °С.

В ходе выполнения работы использованы МСК из двух источников – костного мозга и жировой ткани одной крысы. Первичную культуру МСК получали согласно традиционной методике селекции по адгезии к пластику (Dmitrieva et al., 2012). Для проведения рецеллюляризации использовали клетки 3-8 пассажей.

Перед началом экспериментов по рецеллюляризации сосудистых кондуитов предварительно рассчитывали исходное количество МСК на единицу длины ДАП, то есть определяли оптимальную плотность посева. Для этого использовали суспензию МСК в различной концентрации : 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 / 100 мкл, которой заполняли просвет ДАП (длиной 5 см, по 3 образца для каждой из 5 концентраций, всего $n=15$). Через 1 ч. инкубирования аккуратно промывали засеянные графты ФСБ, а клетки в промывном растворе осаждали центрифугированием и считали в гемоцитометре ($N_{\text{ост}}$). Эффективность клеточного использования определяли как соотношение числа клеток, адгезированных на ДАП, к исходному количеству клеток умноженному на 100%. Оптимальную плотность посева ДАП рассчитывали, исходя из оптимального исходного числа клеток на единицу длины сосуда.

В результате многочисленных экспериментов по повышению эффективности рецеллюляризации сосудистых кондуитов мы использовали комбинацию статичного метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе. 1×10^6

меченых прижизненным флюоресцентным красителем *PKH26* МСК ресуспендировали в 100 мкл культуральной среды и с помощью пипетки вводили в просвет сосуда. Затем засеянный сосудистый кондуит культивировали в оригинальном собственной конструкции биореакторе в течение 5 сут. Биореактор состоит из камеры и перистальтического насоса, соединенных полихлорвиниловыми трубками, и позволяет проводить постоянную перфузию питательной среды через просвет рецеллюляризируемого сосуда с заданным уровнем давления. Основными отличиями от аналогов, описанных в литературе (Lyons E., Pandit A., 2005), являются наружное расположение насоса и компактные размеры камеры биореактора, которая одновременно является также резервуаром питательной среды, что позволяет культивировать ТИКС внутри любого СО₂-инкубатора.

Для оценки жизнеспособности клеток мы использовали флюоресцентный краситель, а именно *CFSE* (сукцинилимидный эфир карбоксифлюоресцеина). Его особенностью является то, что он свободно проникает в цитоплазму всех клеток, но начинает флюоресцировать 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, что это простой, наглядный и информативный метод оценки жизнеспособности клеток. Количество клеток, меченых *PKH26* и видимых в красном диапазоне спектра соответствовало общему количеству клеток на матриксе. Визуализировавшиеся в желто-зеленом свете клетки, чья цитоплазма окрасилась красителем *CFSE*, считались живыми.

Полученные в результате этапа *in vitro* оптимистичные данные позволили нам перейти к исследованию получившихся ТИКС в экспериментах *in vivo*.

Изучение тканеинженерных сосудов в экспериментах in vivo

Эксперименты проведены на самцах крыс породы Вистар массой 200–300 г (питомник «Рапполово» РАМН, г. Санкт-Петербург). Животных содержали в отдельных клетках, со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Содержание и работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями приказа Минздрава РФ «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова».

В качестве протеза брюшного отдела аорты крысам имплантировали либо свежевыделенную аорту другой крысы (группа 1, контроль, n=5), либо ДАП (группа 2, n=10), либо ТИКС (группа 3, n=10). Всего поставлено 25 опытов.

В связи с очевидной разницей диаметра нормальной аорты крысы (1-1,2 мм) и артерий пуповины (их диаметр при физиологическом давлении около 4 мм), последние перед имплантацией в брюшную аорту «ушивали» до необходимого размера.

Крыс наркотизировали однократным внутрибрюшинным введением хлоралгидрата

(Sigma, США) из расчета 425 мг/кг массы тела животного. Операцию проводили с использованием операционного стереоскопического микроскопа МБС-10 (ОАО «ЛЗЭС», Россия). Выделяли брюшной отдел аорты, после пережатия иссекали её участок и в образовавшийся дефект вшивали подготовленный конduit: нативная аорта крысы-реципиента (группа 1, контроль), ДАП (группа 2) или ТИКС (группа 3). После запуска кровотока проводили гемостаз, контролировали проходимость шунта, послойно ушивали рану брюшной стенки. В послеоперационном периоде за животным наблюдали до пробуждения, после чего содержали в стандартных условиях. Антикоагулянты и дезагреганты не назначали.

Крыс выводили из эксперимента на 30-е сут. после операции. При наличии проявлений тромбоза шунта (задний парапарез) крыс умерщвляли раньше планируемого срока наблюдения. Одно животное из 3-й группы без признаков тромбоза аорты выведено из эксперимента на 2-е сут. после операции для оценки динамики клеточного состава сосудистой стенки в раннем послеоперационном периоде. Это животное не учитывали при расчете степени проходимости изучаемых сосудов.

Перед умерщвлением крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением хлоралгидрата. Выполняли срединную лапоротомию и оценивали состояние тканей вокруг протеза, сращения, вид зоны протезирования, наличие расширения и т.п. Далее выделяли участок протезированного брюшного отдела аорты и визуально оценивали его проходимость. Затем животных умерщвляли введением летальной дозы хлоралгидрата. Имплантаты иссекали вместе с участком аорты проксимальнее зоны протезирования и с частью подвздошных артерий дистальнее графта. Изготавливали гистологические препараты, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону с эластикой, выполняли ИГХ анализ с антителами к антигенам CD-31 и α -SMA. Кроме этого изготавливали неокрашенные срезы, которые анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа в красном спектре для оценки наличия и распределения клеток, меченых до имплантации прижизненным флуоресцентным красителем PKH26 (Sigma, США).

Статистический анализ

Результаты приводятся как среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение. Степень достоверности межгрупповых различий средних значений оценивали с помощью парного t-теста Стьюдента с двухсторонним распределением.

Результаты исследования

АП представляли собой мышечного типа артерии диаметром 2-3 мм в состоянии спазма. При заполнении жидкостью, наружный диаметр сосуда увеличивался до 4 мм. Спиралевидный ход артерий связан с характерным закрученным их положением в пуповине.

ДАП сохраняли свою исходную форму и размеры, теряя естественный цвет и

становясь белесыми, что характерно для всех децеллюляризованных тканей (Gilbert T.W. et al., 2006; Срапо P.M. et al., 2011). Если исходно АП спазмированы, то после проведения децеллюляризации они становятся дилатированными, возможно из-за отсутствия ГМК.

Для гистологического и ИГХ исследования использовали 2 фрагмента необработанной артерии и 20 фрагментов ДАП, каждый длиной 5 см. После децеллюляризации сосуда клетки отсутствуют, просвет артерии дилатирован, а толщина её стенки несколько уменьшается. При окраске по Ван-Гизону, тропной к соединительно-тканым волокнам, видно, что ВКМ, состоящий преимущественно из коллагена остается неизменным. Отсутствие ИГХ реакции к антигену CD31, характерному для эндотелиоцитов, и к альфа-гладкомышечному актину, характерному для миоцитов, косвенно подтверждает не только лизис этих клеток, но и удаление клеточного дебриса из всей толщи сосудистой стенки.

Для визуального определения нуклеиновых кислот использовали окраску DAPI, которая была негативной после децеллюляризации. Отсутствие ДНК и РНК подтверждено также спектрофотометрическим методом.

Серии их 30 последовательных экспериментов подтверждают воспроизводимость результатов. На разработанный способ децеллюляризации был получен патент РФ на изобретение №2504334, который гарантирует приоритет разработки данной методики.

Таким образом, было достигнуто эффективное удаление клеток, клеточного дебриса и нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), что исключает возможный иммунный ответ после трансплантации тканеинженерного сосуда реципиенту. ВКМ, состоящий преимущественно из соединительно-тканых белков, таких как коллаген и эластин, сохраняет свою естественную структуру, и предполагалось, что в связи с этим он окажется максимально благоприятной базой для последующей колонизации клетками реципиента. Дополнительным подтверждением сохранности ВКМ стали результаты механических испытаний ДАП.

Результаты исследования механической прочности испытываемых сосудов

В ходе настоящего диссертационного исследования впервые определены механические свойства АП до и после децеллюляризации. Полученные результаты представляют большой интерес, так как механические свойства будущего тканеинженерного сосуда, которые влияют на его проходимость, подверженность аневризмообразованию при последующей трансплантации в кровеносное русло в экспериментах *in vivo*, и зависят от характеристик ВКМ ДАП. Всего при изучении механической прочности испытываемых сосудов выполнено 109 экспериментов.

В течение испытаний на прочность, обнаружено, что ДАП не подвергаются разрушению при давлении внутри сосуда значительно выше физиологического. Разрушение нативных АП (I группа, контроль) происходило при давлении внутри сосуда 951 ± 161 мм рт. ст. Максимальное давление, которое выдерживали ДАП II и III групп, было несколько ниже,

но достоверно не отличалось от показателя нативных АП, и составило 933 ± 124 мм рт. ст. во II группе и 915 ± 131 мм рт. ст. в III группе. Механическая прочность криоконсервированных ДАП (IV группа) была значительно ниже, они разрушались при давлении 456 ± 123 мм рт. ст.

В серии опытов по изучению упруго-эластических свойств испытуемых сосудов, проводили медленное растяжение образцов нативной АП, ДАП, ДАП после 10-месячного хранения в ФСБ. Исследовано по 10 образцов артерий пуповины в каждой группе. При растяжении в продольном направлении максимум нагрузки, при котором происходило разрушение испытуемых образцов, для нативных АП составил $0,96 \pm 0,15$ Н, для артерий II и III групп – $0,92 \pm 0,11$ Н и $0,85 \pm 0,13$ Н, соответственно. Межгрупповые различия статистически не значимы. При растяжении артерий в поперечной плоскости (также по 10 образцов в каждой группе) максимум нагрузки – $2,5 \pm 1,2$ Н, $3,0 \pm 1,4$ Н и $3,0 \pm 1,1$ Н, а среднее изменение длины (ΔL) до разрушения образцов – $252 \pm 58\%$, $318 \pm 31\%$ и $270 \pm 32\%$ для I, II и III групп, соответственно. Межгрупповые различия были не значимы.

В экспериментах по определению устойчивости к прорезыванию шовным материалом испытуемых сосудов прошивали край исследуемой артерии нитью, которую затем вытягивали сквозь стенку сосуда. Нагрузка, которую необходимо было приложить, характеризовала устойчивость АП к прорезыванию шовным материалом. Сравнивали данные, полученные при тестировании 10 артерий каждой из трех групп. Во всех случаях происходило разрушение образца в месте шва (то есть прорезывание ткани артерии нитью). У нативных АП нагрузка при этом составила $0,54 \pm 0,14$ Н, у ДАП $0,53 \pm 0,12$ Н, ДАП после хранения $0,53 \pm 0,15$ Н. Межгрупповые различия статистически не значимы.

Таким образом, испытания на разрывной машине показали, что децеллюляризация не меняет значимо упруго-эластические свойства ДАП и устойчивость к прорезыванию шовным материалом, в том числе после длительного хранения в охлажденном ФСБ (группа III).

Сохранение механических свойств децеллюляризованных сосудов в ходе их хранения важно с точки зрения удобства работы и уменьшения времени на получение готового тканеинженерного графта. Методика криоконсервирования децеллюляризованных артерий привела к значимому снижению прочности сосуда после размораживания, возможно из-за повреждения структуры ВКМ кристаллами льда. В итоге мы от неё отказались и использовали способ, ранее предложенный Dahl S.L.M. et al. (2011), которые описали хранение децеллюляризованных сосудов в стерильном ФСБ при температуре $+4^\circ\text{C}$ до 12 мес. без видимого разрушения ВКМ и, соответственно, сохранением прочности. Наши результаты также позволяют утверждать, что децеллюляризованные сосуды могут храниться таким образом достаточно долгое время (не менее 10 мес.) без изменения механических свойств.

Результаты испытаний различных способов доставки клеток на носитель

При рецеллюляризации ДАП объем вводимой в просвет сосуда клеточной суспензии

был постоянен и равнялся 100 мкл. Количество МСК различалось от 1×10^5 до 3×10^6 . С повышением концентрации клеточной суспензии происходило линейное повышение количества адгезировавших на матрице клеток, но только до определенного уровня. При повышении исходного количества клеток более 1×10^6 , значимого увеличения адгезировавших клеток не происходило. Таким образом, оптимальным содержанием МСК в суспензии является 1×10^6 клеток, что составляет 2×10^5 клеток/см длины засеваемого сосуда. Эффективность засеваания при этом составила 39,5%.

В результате использования комбинации статического метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе, нам удалось улучшить результаты рецеллюляризации: повысить жизнеспособность клеток до 89.3 ± 5.9 %, сократить продолжительность культивирования до 5 сут., достигая образования нескольких слоев клеток по всей внутренней поверхности графта и инфильтрации их вглубь сосудистой стенки. В конце процедуры перфузии сосудистого кондуита в биореакторе мы получили прекондиционированный ТИКС, готовый к трансплантации в артериальную позицию лабораторного животного, где исследовалась дальнейшая его перестройка в «зрелый» кровеносный сосуд.

Результаты имплантации графтов in vivo

Однократно (в качестве отдельного эксперимента) была имплантирована ДАП, которая не была предварительно ушита. При этом стало ясно, что анастомозирование сосудов возможно, несмотря на явное несоответствие их диаметров. Но турбулентный ток крови в расширенном участке кровеносного русла создавал повышенный риск тромбоза шунта и возможно привел бы к ложным результатам. Поэтому мы использовали методику предварительного уменьшения диаметра исследуемых сосудов, что несколько увеличивало объем работы, но облегчало наложение анастомозов и исключало указанные нарушения тока крови по трансплантату.

Всего проведено 25 опытов. 5 животным имплантировали аорту другой крысы (группа 1, контроль), 10 животным - децеллюляризованную артерию пуповины, незасеянную клетками (группа 2) и еще 10 животным имплантировали ТИКС, засеянный МСК и культивированный в проточном биореакторе в течение 5 сут. (группа 3).

Следует отметить, что в процессе имплантации артерии пуповины оказались удобны при исполнении всех необходимых манипуляций: легко захватывались и удерживались микропинцетом, игла без существенного сопротивления проходила сквозь стенку сосуда, в местах прокола кровотечение отсутствовало. Длительность операции составила 120 ± 15 мин., время пережатия аорты 55 ± 15 мин., достоверной разницы по этим показателям между использованием различных видов имплантируемых сосудов не было. На каждый анастомоз было наложено от 8 до 10 отдельных узловых шва. Непосредственно после запуска кровотока

все шунты были проходимы. Кровопотеря при запуске кровотока в области анастомозов была минимальной, останавливалась кратковременным локальным прижатием. В ряде случаев потребовалось наложение дополнительных швов. Протекания крови сквозь стенку сосудистых кондуитов не было.

При эксплантации графтов не было выявлено их аневризматического расширения, что еще раз подтверждает сохранность ВКМ после децеллюляризации. Макроскопически отмечено образование рыхлой рубцовой ткани в зоне операции во всех трех группах исследования.

В группе 1 (контроль) все 5 крыс оставались живы до 30 сут. после операции. Имплантированные сосуды этой группы были проходимы, несмотря на их аллогенное происхождение.

В группе 2 (незасеянные ДАП) 3 крысы погибли в первые 3 сут. после операции, во всех случаях в просвете имплантированного сосуда обнаружен тромб. Одна погибла на 7-е сутки от инфекционных осложнений (нагноение послеоперационной раны), исключена из исследования и при анализе проходимости не учитывается. У 4 из 6 оставшихся животных этой группы сосудистые кондуиты тромбировались в различные сроки в течение месяца после имплантации. При этом проявления тромбоза шунта (задний парапарез) развились лишь у двух крыс (50%).

В группе 3 (ТИКС, предварительно засеянные МСК и прекультивированные в биореакторе) одно животное без признаков тромбоза ТИКС выведено из эксперимента на 2-е сут. после операции для изучения клеточного состава сосудистой стенки в раннем послеоперационном периоде. Это животное не учитывали при расчете показателя проходимости графтов. Остальные 9 крыс оставались живы до 30 сут. после операции, парапарезов не было. При выведении отмечен тромбоз 1 из 9 имплантированных ТИКС.

Таким образом, ТИКС (группа 3), показали значительно более высокий уровень проходимости (8 из 9 графтов проходимы) по сравнению с незасеянными сосудистыми кондуитами (группа 2), где только 2 из 9 сосудов оставались проходимы в течение 30 сут., что очевидно связано с ключевой ролью МСК, адгезированными на внутренней поверхности ТИКС, несмотря на их аллогенное происхождение. Тем не менее роль этих клеток в ремоделировании ТИКС до конца не понятна. В препарате ТИКС через 2 суток после имплантации продолжали визуализироваться аллогенные МСК, предварительно меченные *RKN26* и засеянные на графт до имплантации. Следует отметить значительное уменьшение их количества и яркости свечения красителя по сравнению с препаратом ТИКС до имплантации. В препаратах ТИКС, эксплантированных через 30 сут. после операции, меченых клеток не обнаружено. Возможно, МСК обеспечивают лишь кратковременную антитромбогенность графта, привлекая и замещаясь зрелыми и прогениторными клетками

реципиента (например, из зоны анастомозов или из циркулирующей крови). Возможно, хотя и маловероятно, что отсутствие меченых клеток в стенке ТИКС к 30-м сут. вызвано активной пролиферацией МСК и соответственно разведением красителя до визуально неопределяемого уровня.

При морфологическом исследовании сосудов группы 2 и 3 отмечена богатая инфильтрация стенки графтов клетками. Судя по их морфологии и расположению, можно предположить, что это – фибробласты или миофибробласты.

В просвете 7 графтов группы 2 отмечено наличие окклюзирующего тромба, в большинстве случаев сочетающегося с утолщением сосудистой стенки и сужением просвета. Остальные 2 из 9 сосудистых кондуитов этой группы, были проходимы, но также отмечено увеличение толщины их стенки.

На препаратах ТИКС, эксплантированного на 2-е сутки после операции обнаружено большое количество клеток, привлеченных в зону графта с его наружной стороны. Отсутствие ИГХ реакции на α -SMA позволяет считать, что это - фибробласты или прогениторные клетки. Такая быстрая реакция организма, вероятно, обусловлено особенностями крысы как экспериментальной модели, известной своей способностью к быстрой регенерации.

Гистологическая картина всех 8 проходимых к 30-м сут. ТИКС в группе 3 одинаковая. Клетки реципиента инфильтрировали стенку ТИКС, формируя ткань, напоминающую адвентицию и средний слой нормального сосуда. На препаратах, окрашенных по Ван-Гизону, отмечено сохранение богатого коллагеном ВКМ. Клетки, выстилающие внутреннюю поверхность ТИКС, имели положительную ИГХ-окраску на антиген CD-31, характерный для эндотелия. Средняя часть сосудистой стенки была богато инфильтрирована клетками, часть которых экспрессировала α -SMA, характерный для ГМК. Перестройка прогениторных клеток в дифференцированные миоциты обусловлена, возможно, двумя причинами: наличием МСК в сосудистой стенке и действием микроокружения. Таким образом, можно говорить о ремоделировании ТИКС в зрелую нативную артерию в организме реципиента, который выступает в этом случае в роли идеального (с точки зрения воссоздания физиологических условий) биореактора.

Таким образом, результаты данного диссертационного исследования показывают, что создание искусственных сосудов с заданными биологическими и механическими свойствами – выполнимо. ТИКС на основе ДАП, заселённые мезенхимными стволовыми клетками, пригодны для решения как экспериментальных задач, так, возможно, и для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. Дальнейшие исследования могут быть направлены на трансляцию методов тканевой инженерии кровеносных сосудов в клиническую практику.

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный способ децеллюляризации артерий пуповины. При этом механические свойства нативных артерий после децеллюляризации сохраняются. В децеллюляризованных артериях клетки и клеточный дебрис не определяется, внеклеточный матрикс артерии остается интактным.
2. Механические свойства децеллюляризованных артерий пуповины не меняются при их длительном хранении.
3. МСК фиксируются на стенке децеллюляризованных артерий пуповины и сохраняют свою жизнеспособность. Определена оптимальная плотность и методика посева МСК на децеллюляризованные артерии пуповины. Разработан оригинальный проточный биореактор, использование которого улучшает результаты рецеллюляризации артерий пуповины, лишенных клеточного состава.
4. Через 30 сут. наблюдения проходимость децеллюляризованных артерий пуповины, засеянных МСК, значительно выше, чем незасеянных.
5. Полученные в ходе диссертационной работы результаты позволяют перейти к доклиническому исследованию полученных тканеинженерных кровеносных сосудов.
6. Рецеллюляризованные артерии пуповины показали высокую проходимость в эксперименте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке свойств новых видов децеллюляризованных сосудов предлагаем использовать тот же объем проведенного нами комплексного изучения полноты удаления клеток и клеточного дебриса из донорской ткани с обязательным определением механических характеристик.
2. Артерии пуповины подходят для изготовления тканеинженерных кровеносных сосудов диаметром 3-4 мм и длиной до 50 см. Мы рекомендуем использовать предлагаемую методику децеллюляризации для получения неиммуногенного внеклеточного матрикса сосудов с сохраненными механическими параметрами.
3. Децеллюляризованные артерии пуповины следует хранить в охлажденном фосфатно-солевом буферном растворе.
4. Перед имплантацией засеянных графтов необходимо проводить их прекультивирование в биореакторе, обеспечивающим постоянный ток питательной среды через просвет сосуда.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Насрединов А.С. Децеллюляризованные артерии пуповины человека как основа тканеинженерных кровеносных сосудов малого калибра / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. – Т. VIII. - № 1. – С. 66-71.
2. Насрединов А.С. Тканевая инженерия кровеносных сосудов: способы совмещения клеток и носителя / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - № 1. – С. 23-34.
3. Лаврешин А.В. Децеллюляризация аортальных гомографтов и их морфологическая оценка / А.В. Лаврешин, А.С. Насрединов, Д.И. Курапеев и др. // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - № 1. – С. 64-71.
4. Насрединов А.С. Артерии пуповины человека сохраняют свои механические свойства после децеллюляризации / А.С. Насрединов, Лаврешин А.В., Лебедева Е.А и др. // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). -2014. – Т. IX. - № 2. – С. 80 – 86.
5. Насрединов А.С. Рецеллюляризация тканеинженерных сосудов в проточном биореакторе / А.С. Насрединов, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов и др. // Цитология. – 2014. – Т. 56. - № 12. – С. 926-932.
6. Насрединов А.С. Способ децеллюляризации кровеносных сосудов малого калибра. Патент РФ на изобретение №2504334, приоритет изобр. 28.11.12. Зарегистрирован в гос. реестре изобр. РФ 20.01.14 г.
7. Насрединов А. С. Способ получения экстрацеллюлярных матриксов кровеносных сосудов малого калибра методом децеллюляризации и их морфологическая оценка / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2013. – Т. 14. - № 6. - Приложение «Сборник докладов и сообщений 19 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов, Москва, 24-27 ноября 2013г.». - С. 250
8. Насрединов А.С. Оценка механических свойств децеллюляризованных артерий пуповины человека / А.С. Насрединов, С.В. Анисимов, В.Н. Вавилов и др. // Материалы I

Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 181.

9. Насрединов А.С. Рецеллюляризация сосудистого кондуита мезенхимными стволовыми клетками / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 182.

10. Насрединов А.С. Способ получения внеклеточных матриксов артерий малого калибра и их морфологическая оценка / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 183.

11. Насрединов А.С. Биоинженерный кровеносный сосуд малого калибра на основе артерии пуповины человека / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 282.

12. Насрединов А.С. Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации биоинженерных сосудистых кондуитов / А.С. Насрединов, А.В. Лаврешин, С.В. Анисимов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 251.

Список сокращений

АП – артерии пуповины

ВКМ - внеклеточный матрикс

ГМК – гладкомышечные клетки

ДАП - децеллюляризованные артерии пуповины

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ - иммуногистохимия

МСК - мезенхимные стволовые клетки

РНК - рибонуклеиновая кислота

ТИКС - тканеинженерный кровеносный сосуд

ФСБ - фосфатно-солевой буферный раствор

α -SMA - альфа-гладкомышечный актин