

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова

« _____ » _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Разработка перфузионной культивационной системы для получения
ткане-инженерных сосудов.

Научный руководитель _____ д.б.н., профессор Е.И. Шишацкая
Выпускник _____ Д.Д. Николаев

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме: «Разработка перфузионной культивационной системы для получения ткане-инженерных сосудов» содержит 71 страницу текстового материала, 41 иллюстрацию, 4 таблицы, 40 использованных источников.

Целью моей бакалаврской работы стало — разработка необходимых условий для получения ткане-инженерных сосудов на основе ПГА *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи: сконструировать перфузионную культивационную систему (биореактор), проверить биореактор на герметичность, асептичность и возможность поддерживать клетки в жизнеспособном состоянии, далее создать полимерные трубчатые имплантаты, а также полимерные пленки, с использованием технологии электростатического формования ПГА полимеров, затем проанализировать адгезионные свойства изделий по отношению к фибробластам в статической культуре и в условиях биореактора.

В ходе работы сконструирован биореактор для длительного перфузирования каркаса сосуда в культуре клеток. Выявлено, что биореактор герметичен, и создает стерильные условия для клеток. Так же получены ПГА ЭСФ - трубчатые и пленочные изделия. Проведено культивирование фибробластов на ЭСФ - изделиях в статических и динамических условиях.

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ СОСУДОВ, БИОРЕАКТОР, ИМПЛАНТАТЫ МАЛОГО ДИАМЕТРА, АДГЕЗИЯ КЛЕТОК, ПОЛИМЕР, ПЗГБ, ПЗГБ/В (10, 15%).

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	8
1.1 Актуальность тканевой инженерии	8
1.2 Методы реваскуляризации миокарда.....	9
1.2.1 Шунтирование коронарных сосудов	9
1.2.2 Стентирование коронарных сосудов	11
1.3 Строение нативной артерии и свойства клеток в ее построении.....	14
1.3.1 Строение артериального сосуда	14
1.3.2 Эндотелий	16
1.3.2.1 Роль эндотелиальных факторов	17
1.3.3 Гладкомышечные клетки	18
1.4 Альтернатива пересадке сердца и основным методам реваскуляризации миокарда.....	20
1.4.1 Сосуды, выращенные на децеллюляризованном матриксе....	20
1.4.2 Сосуды, выращенные на биоразрушаемых полимерах	22
1.4.2.1 Сосуды выращиваемые на PGA	24
1.4.2.2 Сосуды выращиваемые на Poly (ϵ -caprolactone) (PCL)	25
1.4.2.3 Сосуды выращиваемые на Polyhydroxyalkanoates (PHA) and polyhydroxybutyrate (PHB).....	28
1.5 Биореакторы, необходимые для выращивания сосудов	29
1.5.1 Статическая система.....	30
1.5.2 Динамическая система	30
1.5.2.1 Влияние механических воздействий на развитие сосудистых имплантатов	30
1.5.2.2 Реакция эндотелиальных клеток на механическое напряжение	32
1.5.2.3 Реакция сосудистых гладких мышечных клеток на механическое напряжение.....	33
1.5.2.4 Особенности транспорта в биореакторе.....	35

1.6 Создание полимерных сосудистых имплантатов	37
1.6.1 Создание сосудистых полимерных имплантатов, используя технологию электростатического формования.....	37
1.6.2 Свойства внутренней структуры полимерной трубы, получаемые при формировании	38
1.6.3 Принцип работы метода.....	38
1.6.4 Параметры, от которых зависит внутренняя структура полимерного имплантата.....	40
1.6.4.1 Свойства полимера	40
1.6.4.2 Концентрация полимера	41
1.6.4.3 Электрическое поле	41
1.6.4.4 Скорость подачи раствора	42
1.6.4.5 Диаметр диафрагмы сопла.....	42
2 Материалы и методы	44
2.1 Материалы для перфузионной системы:	44
2.2 Протокол создания биореактора:	45
2.2.1 Нестерильная стадия создания системы.....	45
2.2.2 Стерилизация и сборка биореактора в асептических условиях	48
2.2.3 Высев клеток линии человеческих фибробластов (Ihf), полученных из жировой ткани. Проверка системы на асептичность, герметичность и отсутствие какого-либо токсичного действия биореактора на клетки	49
2.2.4 Проверка биореактора на поддержание асептических условий с помощью микробиологических тестов	51
2.3 Создание полимерных трубчатых каркасов из полигидроксиалканоатов.....	51
2.4 Культивирование клеток на полимерных трубчатых каркасах в статических и динамических условиях. Проверка на адгезию и клеточную пролиферацию	53
2.4.1 Нарезка полимерных трубчатых оснований и высев клеток для проверки их адгезии и пролиферации на полимере	53

2.4.2 Приготовление питательной среды.....	54
2.4.3 Предварительное культивирование клеток во флаконе	54
2.4.4 Приготовление клеточной супензии	55
2.4.5 Высев клеток на полимерные основания в статических условиях в чашках Петри и динамических условиях в биореакторе	56
2.5 Проверка каркасов на адгезию и клеточную пролиферативность.....	56
3 Результаты и обсуждения.....	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	57
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	58
Список используемых источников.....	59

ВВЕДЕНИЕ

По данным всемирной организации здравоохранения (The World Health Organisation), ишемическая болезнь сердца (стенокардия) является основной причиной смерти у мужчин и женщин во всем мире [1] и эта тенденция, как ожидается, сохранится в обозримом будущем. Общие расстройства сосудов, связанны со стенозом (состоянием, приводящим к сужению артерий (сосудов)), а также окклюзией (состоянием, при котором просвет стабильно закрыт на каком-либо участке). При этом самыми опасными являются расстройства коронарных артерий сердца [5]. Уровень сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается по мере увеличения числа факторов риска [2].

На сегодняшний день предпочтительным лечением для долгосрочной реваскуляризации окклюдированных сосудов являются операции, использующие сосудистые трансплантаты, такие как шунтирование коронарной артерии и шунтирование с периферической артерией. В настоящее время аутологичные сосуды, такие как подкожная вена и внутренняя грудная артерия, представляют собой золотой стандарт трансплантатов для сосудов малого диаметра (< 6 мм) [5]. Однако эти сосуды имеют ограниченную доступность, требуют инвазивного сбора и часто непригодны для использования, вследствие зараженности аутологического трансплантата, либо тканевой несовместимости [3, 5].

Синтетические, тканевые сосудистые заменители были разработаны для облегчения этой нехватки, предлагая перспективу функционального трансплантата и сосуда как чередующиеся с родной веной или артерией для регенерации сосудов, но этот подход также имеет свои недостатки [3]. Поскольку искусственные сосудистые трансплантаты признаны чужеродными организмом человека, они могут вызывать активацию систем свертывания крови и воспалительных реакций. Эти реакции крови вызваны естественной реакцией механизма защиты хозяина на внешнюю поверхность искусственных сосудистых трансплантатов [4, 13].

Все написанное выше означает, что в настоящее время существует острыя потребность в сосудистых протезах, идентичных по свойствам нативным артериям человека разного калибра. Тканевая инженерия, быстро развивающаяся в последние десятилетия, способна предложить способ создания сосудов, альтернативных использующимся в настоящее время синтетическим протезам и аутовенозным шунтам [6, 7, 8]. Искусственно выращенные артерии, созданные при помощи методов тканевой инженерии, должны отвечать всем требованиям, предъявляемым к сосудистым заменителям сегодня, а именно: биосовместимость и биостабильность; тромборезистентность; устойчивость к инфекции; нулевая хирургическая порозность; оптимальные механические свойства, такие как прочность, эластичность, гибкость; вазоактивность.

К настоящему времени ни один из разработанных заменителей сосудов не обладает этими качествами в полной мере.

Поэтому целью моей бакалаврской работы — разработка необходимых условий для получения ткане-инженерных сосудов на основе ПГА *in vitro*.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи: сконструировать перфузационную культивационную систему (биореактор), проверить биореактор на герметичность, асептичность и возможность поддерживать клетки в жизнеспособном состоянии, далее создать полимерные трубчатые имплантаты, а также полимерные пленки, с использованием технологии электростатического формования ПГА полимеров, затем проанализировать адгезионные свойства изделий по отношению к фибробластам в статической культуре и в условиях биореактора.

В ходе работы сконструирован биореактор для длительного перфузирования каркаса сосуда в культуре клеток. Выявлено, что биореактор герметичен, и создает стерильные условия для клеток. Так же получены ПГА ЭСФ - трубчатые и пленочные изделия. Проведено культивирование фибробластов на ЭСФ - изделиях в статических и динамических условиях.

1 Обзор литературы.

1.1 Актуальность тканевой инженерии

Принципиально новый подход — клеточная и тканевая инженерия — является последним достижением в области регенеративной медицины. Этот подход открыл широкие перспективы для создания эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным восстановление поврежденных тканей и органов человека.

Цель тканевой инженерии — конструирование и выращивание вне организма человека живых, функциональных тканей или органов для последующей имплантации пациенту с целью замены или стимуляции регенерации поврежденных органа или ткани. Иными словами, на месте дефекта должна быть восстановлена трехмерная структура ткани.

Важно отметить, что обычные имплантаты из инертных материалов могут устраниить только физические и механические недостатки поврежденных тканей, — в отличие от тканей, полученных методом инженерии, которые восстанавливают, в том числе, и биологические (метаболические) функции. То есть, происходит регенерация ткани, а не простое замещение ее синтетическим материалом.

Однако для развития и совершенствования методов реконструктивной медицины на базе тканевой инженерии необходимо освоение новых высокофункциональных материалов. Эти материалы, применяемые для создания биоимплантатов, должны быть полностью ткане- и гемосовместимы и что важно биоразрушаемы.

На сегодняшний день одна из стратегий тканевой инженерии такова:

- Отбор и культивирование собственных или донорских стволовых клеток.
- Разработка специального носителя для клеток (матрицы) на основе биосовместимых материалов.

- Нанесение культуры клеток на матрицу и размножение клеток в биореакторе со специальными условиями культивирования.
- Непосредственное внедрение тканеинженерной конструкции в область пораженного органа или предварительное размещение в области, хорошо снабжаемой кровью, для дозревания и формирования микроциркуляции внутри конструкции (префабрикация).

Матриксы через некоторое время после имплантации в организм хозяина полностью исчезают (в зависимости от скорости роста ткани), а в месте дефекта останется только новая ткань. Также возможно внедрение матрикса с уже частично сформированной новой тканью («биокомпозит»). Безусловно, после имплантации тканеинженерная конструкция должна сохранить свои структуру и функции в течение периода времени, достаточного для восстановления нормально функционирующей ткани в месте дефекта, и интегрироваться с окружающими тканями.

1.2 Методы реваскуляризации миокарда

1.2.1 Шунтирование коронарных сосудов

Коронарное шунтирование – рутинная операция во многих центрах, занимающихся сердечно-сосудистой хирургией. Однако, несмотря на то, что за рубежом активное развитие технологии чрезкожных коронарных вмешательств (ЧКВ) ограничило проведение КШ, данная закономерность не характерна для России [10]. В настоящее время число проводимых вмешательств по реваскуляризации миокарда у пациентов с ишемической болезнью сердца, в том числе коронарного шунтирования продолжает неуклонно расти [9].

Результаты многочисленных исследований доказывают, что КШ является приоритетным при поражении ствола левой коронарной артерии, при наличии у больного сахарного диабета (СД) и при поражении трех и более коронарных артерий. Клинический эффект прямой реваскуляризации миокарда определяется степенью уменьшения проявлений коронарной и

миокардиальной недостаточности. Доказано, что КШ, восстанавливая адекватный кровоток в пораженных артериях, ликвидирует или уменьшает гипоксию миокарда, вызывающую коронарную недостаточность, предупреждает возникновение ИМ, улучшает сократительную функцию миокарда, повышает качество и продолжительность жизни больных после операции [10].

Техника операции реваскуляризации миокарда методом шунтирования.

Операция АКШ заключается в создании обходного пути для крови минуя пораженный (стенозированный или окклюзированный) проксимальный сегмент коронарной артерии.

Существует два основных метода создания обходного пути:

Маммарокоронарный анастомоз.

Обходное аортокоронарное шунтирование аутовенозным (собственной веной) или аутоартериальным (собственной артерией) трансплантатом (кондуктом).

Маммарокоронарное шунтирование.

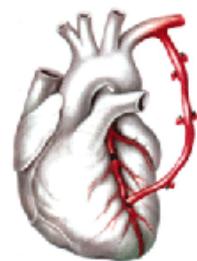


Рисунок 1 — Схематическое изображение наложения маммарно-коронарного анастомоза (шунта между внутренней грудной артерией и коронарной артерией).

При маммарокоронарном шунтировании используют внутреннюю грудную артерию (ВГА), ее обычно «переключают» на коронарное русло путем анастомозирования с коронарной артерией ниже стеноза последней. ВГА заполняется естественным путем из левой подключичной артерии, от которой она отходит.

Аортокоронарное шунтирование.

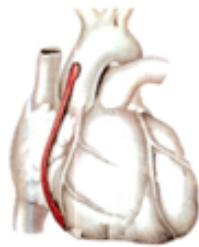


Рисунок 2 — Схематическое изображение наложения аортокоронарного анастомоза (шунта между аортой и коронарной артерией).

При аортокоронарном шунтировании используют так называемые «свободные» кондуиты (из большой подкожной вены, лучевой артерии или ВГА) дистальный конец анастомозируют с коронарной артерией ниже стеноза, а проксимальный – с восходящей аортой.

Прежде всего, важно подчеркнуть, что АКШ – это микрохирургическая операция, поскольку хирург работает на артериях диаметром 1,5-2,5 мм.[15]. Высокий уровень безопасности и клиническая эффективность традиционного аортокоронарного шунтирования (АКШ) не вызывают никаких сомнений, однако поиск резервов улучшения его результатов все же продолжается [11].

1.2.2 Стентирование коронарных сосудов

Долгое время основным методом реваскуляризации миокарда при стволовой локализации атеросклеротического поражения коронарного русла была операция КШ. В последние годы эндоваскулярные коронарные вмешательства продемонстрировали сопоставимые с операцией КШ эффективность и безопасность в лечении данной группы больных. Во многом это связано с внедрением в широкую клиническую практику стентов с антипролиферативным покрытием, препятствующих развитию повторного сужения (рестеноза), совершенствованию техники стентирования, а также

развитию внутрисосудистых методов визуализации, таких как внутрисосудистое ультразвуковое исследование и (или) оптическая когерентная томография, дополняющих ангиографию [12].

Техника операции реваскуляризации миокарда методом внутрисосудистого протезирования (коронарное стентирование).

Коронарное стентирование — метод внутрисосудистого протезирования артерий сердца при различных патологических изменениях структуры их стенки. Для реконструкции коронарных артерий применяются стенты.

Стент это металлический каркас, представляющий собой маленькую металлическую трубочку из проволочных ячеек. Стент вводят в артерию после ее расширения и устанавливают в месте поражения артерии. Стент поддерживает стенки артерии.

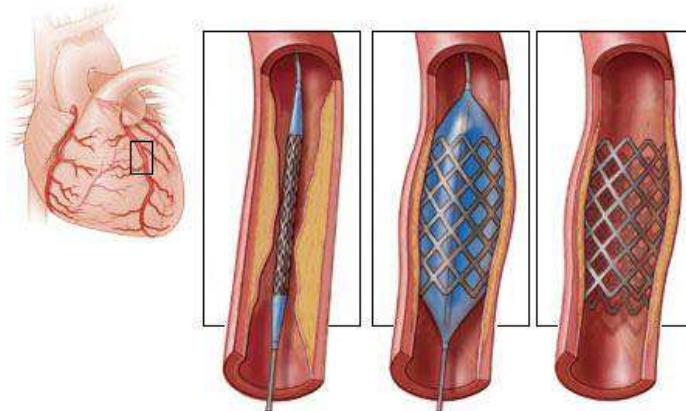


Рисунок 3 — Схема поддержание стенозированного сосуда с помощью стента.

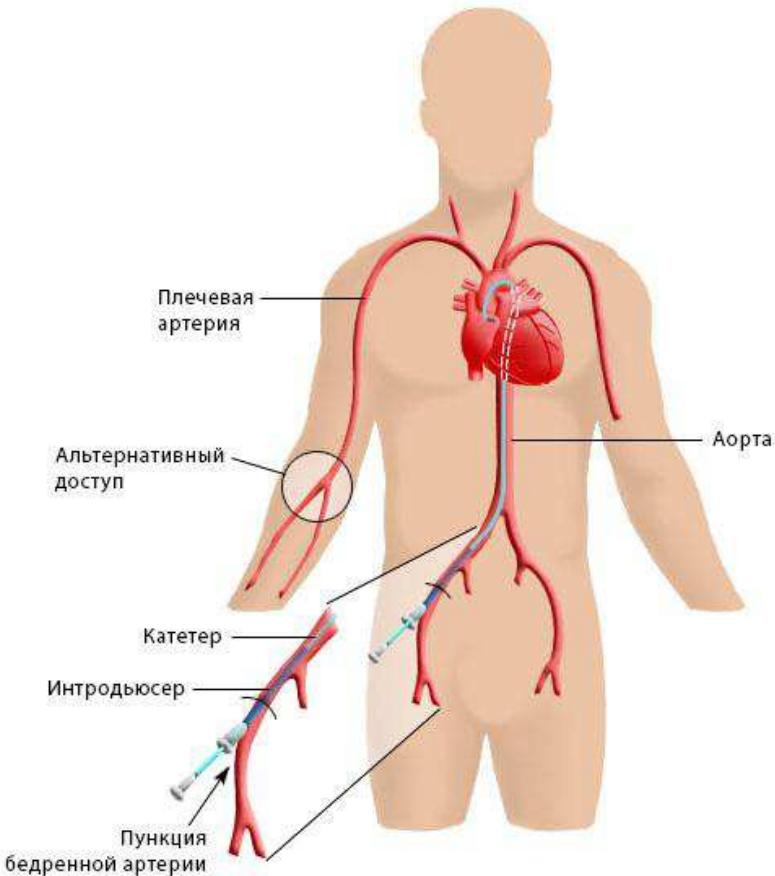


Рисунок 4 — Техника операции по установлению эндопротеза.

Операция выполняется через пункцию бедренной артерии под местным обезболиванием. Через прокол в бедренной артерии по специальному проводниковому катетеру в место сужения коронарной артерии устанавливается баллон со стентом.

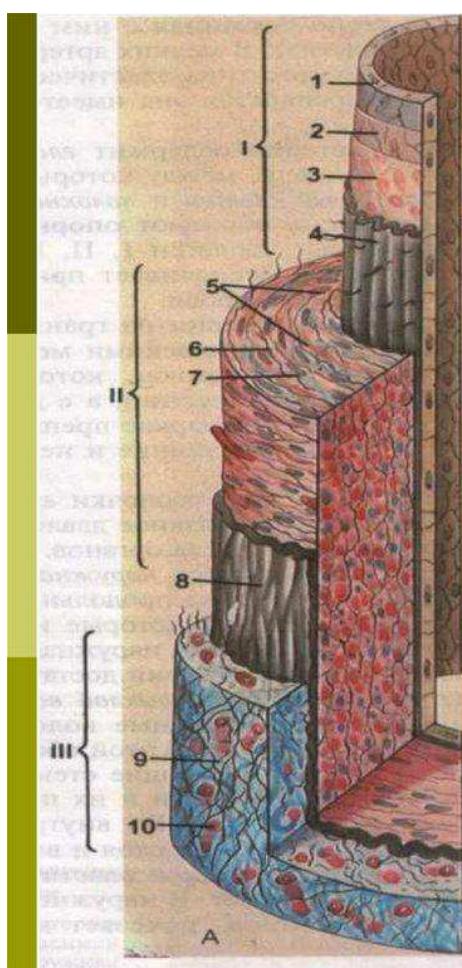
При раздувании баллона стент расправляетя и восстанавливает просвет артерии, в результате чего сердце получает требуемый объем крови по восстановленной артерии.

При всей значимости данной медицинской технологии лечения патологии сердечно-сосудистой системы, основным недостатком эндопротезирования является развитие рестенозов – повторных сужений, представляющих собой биологический ответ сосудистой стенки на имплантацию инородного тела [4, 13]. Снижение тромбогенности стентов остается главной проблемой внутрисосудистого протезирования. Возможны различные подходы для повышения биосовместимости эндопротезов – это модификация свойств поверхности собственно металлического импланта,

применение биосовместимых покрытий, разработка стентов из биорезорбируемых полимерных материалов, и самые наилучшие перспективы на сегодняшний день показывает внедрение в клиническую практику стентов с лекарственным покрытием, которые в настоящий момент являются самыми эффективными в профилактике рестеноза [13, 14]. Стенты с антитромбоцитарным покрытием снижают риск развития рестеноза более чем на 90% [13].

1.3 Строение нативной артерии и свойства клеток в ее построении

1.3.1 Строение артериального сосуда



Артерия мышечного типа

I - внутренняя оболочка
1 - эндотелий
2 - базальная мембрана;
3 - подэндотелиальный слой
4 - внутренняя эластическая мембра

II - средняя оболочка
5 – гладкие миоциты
6 – эластические волокна
7 – коллагеновые волокна

III – наружная оболочка
8 – наружная эластическая мембра
9 – волокнистая соединительная ткань
10 – сосуды сосудов

Рисунок 5 — Строение артерии мышечного типа.

В стенке как артерий, так и вен различают три оболочки: внутреннюю, среднюю и наружную (рис.5). В состав внутренней оболочки входят эндотелий, базальная мембрана и подэндотелиальный слой, состоящий из

рыхлой соединительной ткани. В артериях на границе внутренней и средней оболочках имеется **внутренняя эластическая мембрана**, построенная из эластических волокон. Эта мембрана препятствует растяжению сосуда при прохождении по нему пульсовой волны. Эндотелий отграничивает кровь от окружающих тканей.

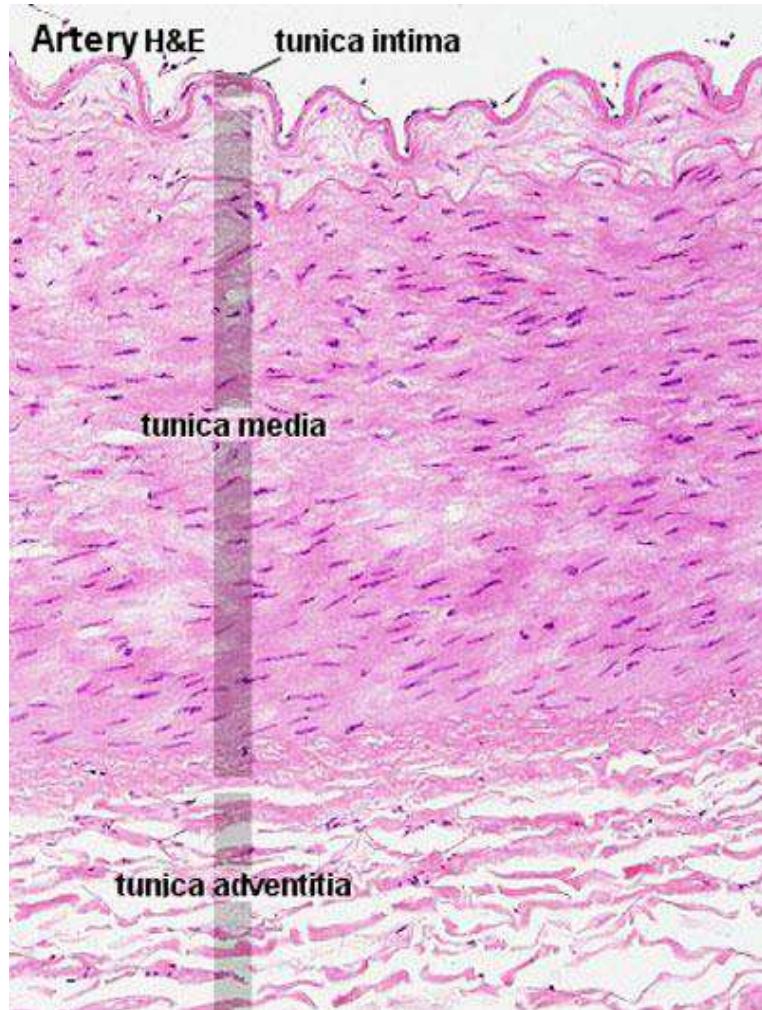


Рисунок 6 — Гистологический срез артерии мышечного типа (общий вид).

Средняя оболочка образована циркулярно расположенными *гладкими мышечными клетками*, между которыми имеется большое количество коллагеновых и эластических волокон. В артериях на границе между средней и наружной оболочками расположена *наружная эластическая мембрана*, которая выполняет такую же функцию как и внутренняя эластическая мембрана. Наружная оболочка достаточно плотная, построена из соединительной ткани. В ней проходят кровеносные сосуды, питающие

стенку самих сосудов, и нервные волокна, иннервирующие гладкие миоциты [16].

1.3.2 Эндотелий

Эндотелий является самым внутренним слоем клеток всей сосудистой сети. Эндотелий состоит из однородных повторяющихся эндотелиальных клеток (ЭК) шириной около 10-15 мкм и 25-50 мкм [17, 21].

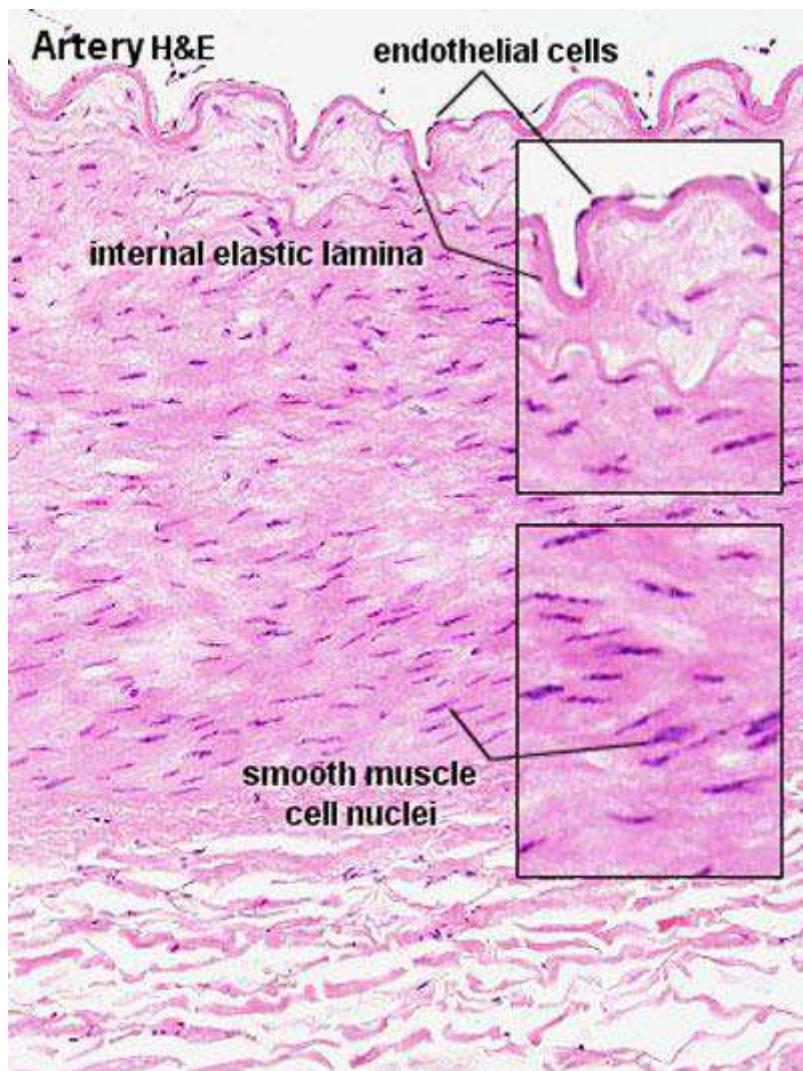


Рисунок 7 — Гистологический срез артерии мышечного типа, с указанием на эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки.

Эндотелиальные клетки играют широкий спектр критических ролей в контроле сосудистой функции. Действительно, с начала 1980-х годов накопленное знание структуры эндотелиальных клеток, а также функциональных свойств эндотелиальных клеток сменило свою роль с

пассивной мембранны или барьера на сложную ткань со сложными функциями, адаптируемыми к потребностям, специфичным во времени и местоположении [18].

В нативных сосудах эндотелиальные клетки (ЭК), выстилающие просвет кровеносных сосудов, обеспечивают не тромбогенный барьер между циркулирующей кровью и стенкой кровеносного сосуда и играют ключевую роль в регулировании динамических механизмов [20, 23]. Следовательно, они участвуют во всех аспектах сосудистого гомеостаза [22], а также в физиологических или патологических процессах, таких как тромбоз, воспаление или ремоделирование стенки сосудов [18].

1.3.2.1 Роль эндотелиальных факторов

В эндотелии вырабатываются вещества, обладающие сосудосуживающим и прокоагулянтным действием, а также вещества, оказывающие сосудорасширяющий и антикоагулянтный эффекты [22]. В норме между этими двумя группами веществ существует динамическое равновесие. Вещества прокоагулянтного действия, вырабатываемые эндотелием: тканевой тромбопластин, фактор Виллебранда, коллаген, фактор, активирующий тромбоциты. Эти биологически активные соединения способствуют агрегации тромбоцитов и повышают свертываемость крови. Кроме того, в эндотелии вырабатываются эндотелины (ЭТ).

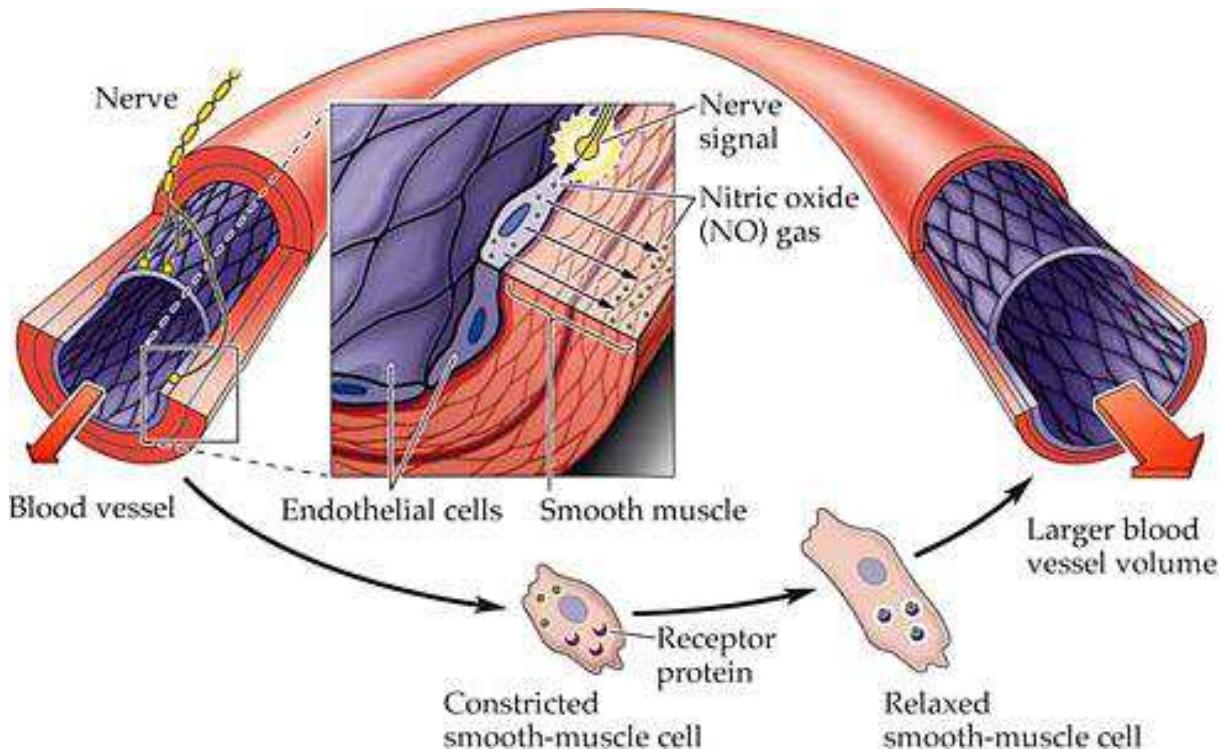


Рисунок 8 — Химическое воздействие эндотелиальных клеток на гладкомышечные клетки.

Эндотелины – это семейство сосудосуживающих факторов (ЭТ-1, ЭТ-2, ЭТ 3), кодируемых тремя различными генами. Эндотелин стимулирует также агрегацию тромбоцитов. Эндотелий вырабатывает также сосудорасширяющие вещества: простагландин, простациклин и эндотелиальный расслабляющий фактор [19].

Выше сказанное означает, что сохранность эндотелия является непременным условием нормального физиологического состояния сосудов. Повреждение эндотелия ведет к различным расстройствам в функционировании сосудов и локальной блокаде кровотока [16, 22].

1.3.3 Гладкомышечные клетки

Сосудистые гладкие мышечные клетки (СГМК) являются основным структурным компонентом артерий, вен и микроциркуляции и играют ключевую роль не только в поддержании сосудистой стенки, но также выполняют различные функции [24].

Они участвуют во всех физиологических функциях и патологических изменениях, происходящих в сосудистой стенке. СГМК производят внеклеточный матрикс (ВКМ) во время развития, обеспечивая артериальную стенку способностью выдерживать высокое давление в циркулирующем кровяном русле, и также участвуют в восстановлении артерий после травмы во взрослой жизни [25].

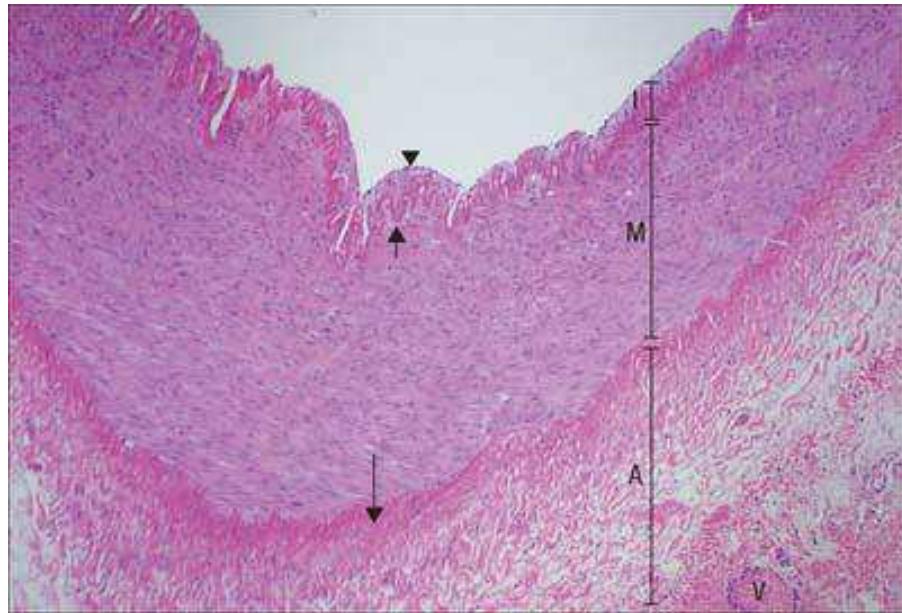


Рисунок 9 — Стенка человеческой артерии мышечного типа. Интима (I) образует самый внутренний слой, выстланный эндотелием (наконечник стрелы) и отделенный от среднего мышечного слоя, средой (M) внутренней эластичной пластинкой (короткая стрелка). Более диффузная внешняя эластичная пластинка (длинная стрелка) делит среду с самой внешней коллагеновой адвентицией (A), внутри которой лежат сосудистые капилляры (V).

Главная функция гладкомышечных клеток заключается в поддержании тонуса сосудов посредством координированной вазоконстрикции и вазодилатации, тем самым регулируя кровяное давление и течение. Помимо этого они обеспечивают гладкую, не тромбогенную поверхность и действует как барьер проницаемости для клеток и макромолекул [26].

1.4 Альтернатива пересадке сердца и основным методам реваскуляризации миокарда.

Целью тканевой инженерии является создание имплантируемой конструкции, которая в конечном итоге превращается в аутологичную ткань, неотличимую по форме и функции от ее родной копии. Сердечно-сосудистая система была определена как цель для тканевой инженерии с момента создания данной области, и потенциал тканевой инженерии в интересах пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями еще более актуален в настоящее время. Не смотря на то, что значительные успехи были сделаны в медицинском управлении, хирургическом вмешательстве с применением протезных имплантатов, по-прежнему в подобных ситуациях решающее значение для многих взрослых пациентов *трансплантация сердца остается единственным окончательным лечением сердечной недостаточности на конечной стадии*. Кроме того, в настоящее время используются протезные материалы, которые подвержены кальцифицированной деградации, инфекции, отторжению, плохой долговечности и соматическому разрастанию (процессу, с помощью которого ребенок перерастает свой трансплантат, что часто требует проведения повторных операций) [31].

В ответ на это биоинженерия обещает неограниченный источник неиммуногенной функциональной ткани с наращающей способностью и возможностью ремоделирования в течение жизни пациента с помощью создания и имплантации уже готового аутологичного сосуда, выращенного индивидуально для каждого пациента и обладающего всеми необходимыми свойствами.

1.4.1 Сосуды, выращенные на децеллюляризованном матриксе

Использование децеллюлярных естественных матриц в тканевой инженерии использует структуру и механические характеристики естественных тканей, избегая при этом любых неблагоприятных иммунологических реакций из-за его происхождения. Процесс

децеллюляризации относится к удалению из ткани антигенного клеточного материала.

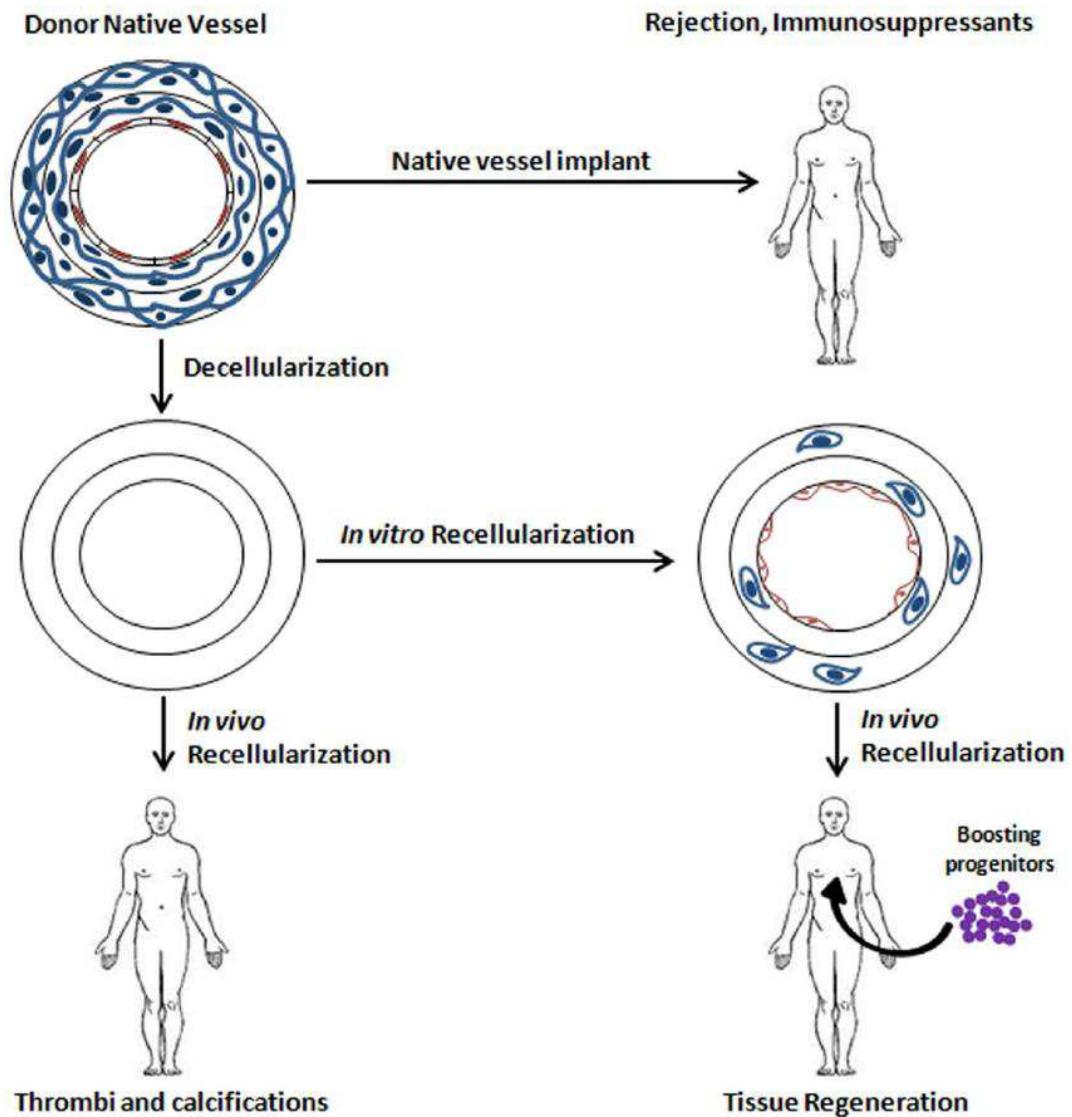


Рисунок 10 — Схема различных подходов к трансплантации (TXP) сосудов. Децеллюлирование сосуда снижает риск иммунного отторжения. Посев клеток *in vitro* деселлюлярного сосуда перед имплантацией снижает риск образования тромбов и кальцификации и индуцирует вербовку и регенерацию предшественников *in vivo*.

Децеллюляризация может включать в себя множество химических агентов, таких как кислоты и основания, гипо / гипертонические растворы, детергенты и растворители; биологические агенты, такие как ферменты и хелатирующие агенты; и физические методы, такие как перемешивание, давление и истирание [29]. Сохранение ВКМ предназначено для поддержания механических свойств ткани. Деселлюлярные сосудистые трансплантаты были впервые разработаны в 1960-х годах с использованием

животной ткани. В последующие годы ряд этих трансплантатов был коммерчески доступен. К ним относятся Artegraft, Solcograft и ProCol, которые были основаны на децеллюлярных кровеносных сосудах крупного рогатого скота, и модель 100 SynerGraft, которая была получена из децеллюлярного бычьего мочеточника. Хотя эти трансплантаты использовались в сосудистой шунтирующей хирургии и в качестве сосудистых каналов доступа, их широкомасштабного производства не было. В ряде исследований, включая проспективные рандомизированные исследования, сделан вывод о том, что эти децеллюлярные ксеногенные трансплантаты не дают явного преимущества по сравнению с альтернативными синтетическими трубками. Пациенты в лучшем случае были сопоставимы и вероятность спасения трансплантата в случае осложнений, таких как инфекция или псевдоаневризм, была ниже. Децеллюлярные ксеногенные трансплантаты также стоят значительно больше, чем синтетические трансплантаты. Децеллюлярные сосуды человека оказались более устойчивыми к инфекции по сравнению с синтетическими альтернативами, но были более восприимчивы к аневризмам. Кроме того, наличие судов-доноров для человека, необходимых для производства этого продукта, является непредсказуемым, и существуют сложные этические и регуляторные проблемы, связанные с коммерциализацией такой ткани. Предполагалось, что ограниченная работоспособность коммерчески доступных децеллюлярных сосудистых трансплантатов обусловлена их отсутствием клеточности при имплантации. Основными причинами отказа являются тромбоз, инфекция и аневризмы, связанные с трансплантатом [30].

1.4.2 Сосуды, выращенные на биоразрушаемых полимерах

Сосудистая тканевая инженерия потенциально помогает заменить сосуды у пациентов, нуждающихся в сосудистом шунтировании. Разрушаемые тканевые сосудистые трансплантаты на основе полимерных каркасов (TEVG) отвечают растущему спросу на сосуды малого диаметра.

Basic Concept of Tissue Engineering

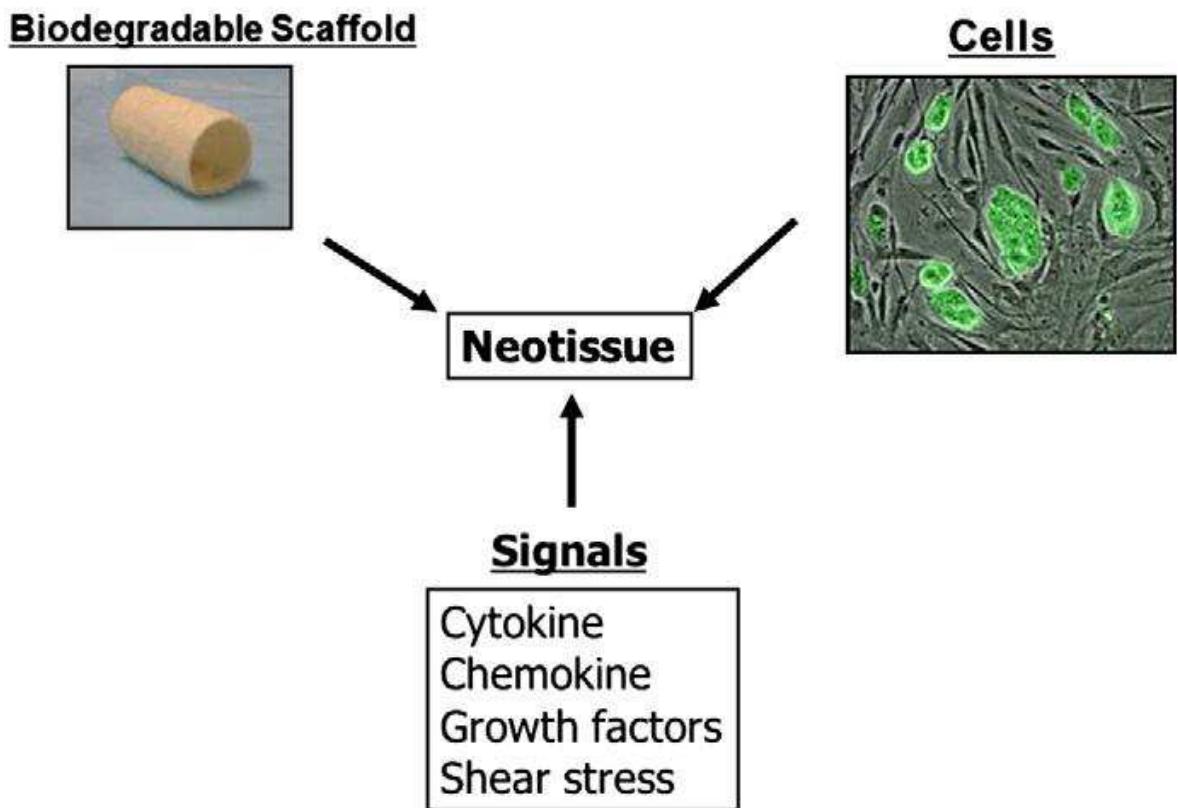


Рисунок 11 — Основные концепты тканевой инженерии.

Синтетические и природные полимеры могут использоваться для создания скаффолов в качестве сосудистых имплантатов. Разработка ткане-инженерных продуктов создала широкий спектр биоразлагаемых полимеров для клинического использования. Чтобы выбрать подходящие полимеры для TEVG, необходимо понять взаимодействие клеток с полимером. Каждый полимер может иметь как полезные, так и деформирующие клеточные ответы, однако до настоящего времени не был разработан идеальный полимер для сосудистой тканевой инженерии [6].

В сравнении с естественными протезами, создание биоразрушаемых синтетических полимеров проще и дешевле. Модифицируя структуру, состав и способ получения, можно изменять скорость деградации, биосовместимость, эластичность и другие параметры полимера. Для синтеза каркаса испытаны многие материалы и среди них такие, как полилактид (PLLA), сополимер молочной и гликолевой кислот (D, L-lactic-co-glycolic

acid) (PLGA), полигидроксибутират (P4HB), сополимер полигликолевой кислоты и полигидроксиалканоата (PHA), полигалактин, полидиоксанон и др. [32].

1.4.2.1 Сосуды выращиваемые на PGA

PGA и PLA, и их сополимеры являются наиболее широко используемыми синтетическими разлагаемыми полимерами в медицине. Хирургические швы, изготовленные из PGA, как правило, теряют свою механическую прочность в течение 2-4 недель после имплантации, тогда как швы PLA требуют более чем один год, чтобы потерять прочность на растяжение. Скорость разложения этих полимеров определяется начальной молекулярной массой, открытой площадью поверхности, кристалличностью и соотношением мономеров. Следует отметить, что нет линейной зависимости между отношением PGA к PLA и физико-механическими свойствами их сополимеров. Из-за изменения кристалличности сополимеры имеют тенденцию к быстрому измельчению при сравнении только с PGA или PLA [6].

PGA, образованный посредством полимеризации с гликоловым покрытием, является одним из первых биодеградируемых полимеров, которые должны использоваться для изготовления скаффолдов. Это сложный полиэфир, который деградирует посредством гидролиза сложноэфирной связи, оставляя за собой гликоловую кислоту, которая далее кatabолизируется в воду и углекислый газ. Механические свойства и профиль деградации PGA делают его привлекательным кандидатом для развития сосудистой ткани. Имплантация конструкций PGA, засеянных клетками артерий овец в легочных артериях ягнят, привела к получению 73% содержания коллагена после полной деградации PGA в течение 11 недель. Клетки показали лучшую способность к пролиферации на PGA и ЭКМ, секретируемые клетками, состоящими из коллагена I типа и эластина. Показано, что динамическое культивирование каркасов PGA с деформацией 1 Гц и 7% привело к увеличению прочности на растяжение и модуля в девять

раз. Было показано, что давление разрыва увеличивается до 2150 ± 700 мм рт. Ст. Для PGA-Дакрона сетчатый каркас при посеве бычьих ГМК и ЭК культивировали в течение 8 недель. Тем не менее, ГМК показали недифференцированный фенотип, а содержание эластина было незначительным. PGA трубчатые леса, модифицированные гидроксидом натрия для улучшения гидрофильности, и засеяли ГМК бычьей аортой в пульсирующей биореакторной нише, когда интерполяционно имплантировали в правую подкожную артерию миниатюрной модели свиней сроком на 4 недели. PGA при имплантации в крысу привел к образованию фиброзной капсулы на интерфейсе имплантата через 7 дней. Это непосредственно свидетельствует о несоответствующих структурных и химических характеристиках скаффолдов, сделанных только из PGA, особенно для долгосрочных применений [29].

1.4.2.2 Сосуды выращиваемые на Poly (ϵ -caprolactone) (PCL)

PCL - это универсальный биоматериал, который был интенсивно исследован в течение длительного периода. Он медленно деградирует при гидролизе сложноэфирных связей, с последующим удалением полученных фрагментов макрофагами и гигантскими клетками. В отличие от PGA или PLA, разрушение PCL происходит значительно медленнее, поэтому он наиболее подходит для разработки долговременных имплантируемых систем. PCL также обладает необычными свойствами, которые не обнаружены в PGA или PLA. Из-за низкой температуры стеклования около -60°C PCL всегда находится в резиновом состоянии при комнатной температуре [6].

Полимеризация с раскрытием кольца ϵ -капролактона приводит к полукристаллическому полиэфирному PCL. Это гидрофобный полимер с температурой плавления в диапазоне $54^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$, что делает полимер легко формируемым при низкой температуре. PCL медленно деградирует путем гидролиза сложноэфирной связи и образует ϵ -гидроксикапроновую кислоту. Продукты деградации в конечном счете удаляются гигантскими клетками. Первоначальная попытка состояла в том, чтобы сделать основанный на PCL

заменитель везины. Эластичность PCL близка к родным значениям и имеет высокую частоту растяжения до разрушения, но прочность на растяжение PCL менее заметна. Электростатический трубчатый каркас PCL показал разрывное давление 4000 мм рт. Ст., Значение, очень близкое к натуральной ткани. Сообщалось, что сосудистые конструкции малого диаметра на основе PCL имеют хорошую удерживающую способность и соблюдение швов, чтобы выдерживать физиологические условия кровеносных сосудов. Морфология субстрата влияла на активность клеток в инженерия сосудистой ткани хорошо продемонстрирована с помощью слоистых лесов PCL. Плунжер PCL размером 4,5 мм с различной ориентацией волокон в каждом слое был электрическим путем, регулируя электрические и врачающиеся параметры коллектора. Самый внутренний слой нановолокон PCL был выровнен вдоль осевого направления трубчатого каркаса и наружного слоя с ориентированными по окружности волокнами. Это имитировало слоистое расположение кровеносных сосудов и дальнейшее поддерживаемое прикрепление эндотелиальных клеток. Исцеление и деградация трансплантов PCL небольшого диаметра (ID: 2 мм) после имплантации в кровеносную артериальную циркуляцию крысы на срок до 6 месяцев, по сравнению с обычными сосудистыми трансплантатами ePTFE показали заметную эндотелизацию и однородное образование неоинтимы, которое постепенно выравнивалось на 18-й неделе после имплантации. Однако основным недостатком этих трансплантов PCL было наличие тяжелой хондроидной метаплазии в неоинтиме при 6, 12, и 18 недель, заменили кальцификацией через 24 недели. Местная гипоксия, сопровождающаяся продуктами кислотной деградации, вызвала некоторые пути локального ответа и стимулировала экспрессию факторов роста, таких как трансформация фактора роста $\beta 1$, что привело к метапластической дегенерации хондроида. Electrospun PCL с дифференциальной пористостью в двух слоях (внутренняя менее пористая, чем внешняя), когда крыса, показала полную эндотелизацию и идеальную проходимость без тромбоза. В другом исследовании электроспининговый PCL-трубчатый каркас,

имплантированный в проксимальную нативную артерию крысы, показал очень интересные результаты с патентным каналом без аневризматической дилатации и ограниченной гиперплазией интимы.

Педиатрическая кардиоваскулярная реконструкция системы низкого давления (вен) была достигнута сополимерами PCL. PCL-PLA с массовым соотношением 1:1, высаженным с клетками вены, а затем с клетками, полученными из костного мозга, эффективно использовалась для замены периферической легочной артерии у 4-летней девочки. Poly (лактид-кокапролактон) (PLCL) показали очень хорошее присоединение ГМК и poly (гликолид-кокапрокатон) 1:1 (PGCL) имеет высокое квазиупругое восстановление. Пористость каркаса PLCL точно контролируема. Пластины PLCL, засеянные с нисходящими кроличьими аортальными ГМК, культивированными в биореакторе с параметрами 130 мл / мин, 25 мм рт. ст., 1 Гц, 5% радиальное растяжение, увеличивало образование коллагена и пролиферацию ГМК-слоя. Этот каркас был сконструирован методом экструзии и выщелачивания твердых частиц. Отсутствие токсичности и привлекательный профиль деградации poly (L-лактид-ко-ε-капролактон) P (LLA-CL) приводили к дальнейшим исследованиям в отношении конструкций из этого сополимера. Растительные каркасы P(LLA-CL) с артериальной клеткой имели продольную ориентацию и пролиферацию этих клеток. 90,91 Механические свойства электропневматических трубок P(LLA-CL) (ID: 2,3-2,5 мм) показали, что соблюдение обратно пропорционально толщине стенки, в диапазоне 45-336 мм. Увеличение толщины стенки быстро уменьшало компрессию, но величина жесткости каждой трубы электрошока P (LLA-CL) была все еще намного меньше, чем у трансплантата ePTFE. Трубка P (LLA-CL) с меньшей толщиной стенки лучше смоделировала механические свойства нативной артерии. Долгосрочная жизнеспособность (105 дней) ГМК свиной коронарной артерии, культивируемой на нановолоконном каркасе P(LLA-CL), показала, что после 2 месяцев культивирования на матрице образовывались множественные клеточные слои с десятикратным осаждением ЭКМ через 3 месяца культуры по

сравнению с 50-м днем культуры. Было также отмечено, что ГМК, культивируемые на каркасе, не значительно увеличивают скорость деградации полимерного основания и матрица все еще поддерживает рост клеток при деградации. Однако конструкции ячеистых скаффолов не обеспечивали удовлетворительной механической прочности и структурной целостности. P(LLA-CL) нановолокна способствовали долгосрочному (1-3 месяца) росту ГМК по сравнению с каркасами PGA и PLGA, демонстрируя самую низкую скорость деградации. P (LLA-CL) нановолокон, а также PLGA показали линейное снижение молекулярной массы во время деградации независимо от того, были ли они культивированы с клетками. Жизнеспособность клеток на P (LLA-CL) была выше, чем у нановолокон PLGA, и сопоставима с таковой на полистирольном субстрате ткани после 40 дней. Уменьшение механической прочности нановолокон P(LLA-CL) с клеточной культурой больше, чем без клеток в первые 80 дней. Симуляционные нетканые войлоки PGA или PLLA с раствором герметика PCL / PLA, имплантированный на мышах в течение 6 недель, привели к интегрированному образованию неотитов сосудов без тромботических осложнений. Однако наблюдалась реакция инородных тел с гигантской клеточной формой. Экспериментальные данные *in vivo* в венозной модели кролика P(LLA-CL) (70:30), покрытые коллагеном, не показали тромбоза, но не имели интактного ЭК-слоя. Коаксиальная электроспининговая P(LLA-CL) с несвязанной сердцевиной гепарина, засеянной ЭК, имплантированной в бедренные артерии собак, показала степень проходимости 25% (1 месяц), 85% (3 месяца) и 75% (3 месяца) в трех соответствующие исследования [29].

1.4.2.3 Сосуды выращиваемые на Polyhydroxylcanoates (PHA) and polyhydroxybutyrate (PHB)

Полигидроксиалканоаты (PHA) являются разлагаемыми, биосовместимыми материалами, изготовленными несколькими различными микроорганизмами. Они, как правило, являются термообработкой, что делает

их привлекательными в качестве биоматериалов для применения как в обычных медицинских устройствах, так и в тканевой инженерии [6].

RHA может быть изменен, чтобы показать широкий диапазон механических свойств и скоростей деградации. RHA представляет собой сложный полиэфир, продуцируемый микробами, такими как бактерии, в условиях ограниченных питательных веществ с избыточным содержанием углерода. RHA также показывает хорошую биосовместимость, что делает ее привлекательной для сосудистых имплантатов. Он поддерживает клеточную привязанность и пролиферацию, но, как было показано, вызывает длительный острый воспалительный ответ. 7-миллиметровый трубчатый каркас RHA-PGA, засеянный клетками сонной артерии овечьей артерии, имплантированный в аорту ягненка, показал проходимость в течение 5 месяцев и поведение стресс-деформации, сходное с нативным сосудом. Нетканая сетка PGA, покрытая P4HB, содержала коллагена типа I и типа II. Конструкцию выдерживали при механическом рассмотрении в биореакторе и достигали прочности на разрыв 300 мм рт. Ст. В течение 21 дня. Влияние сигналов аскорбиновой кислоты при использовании вместе с основным фактором роста фибробластов на конструкцию PGA / P4HB стимулировали клетки для получения больших количеств из коллагена, что, в свою очередь, привело к созреванию сосуда [29].

С учетом данных последних исследований, образцы полигидроксиалканоатов, имеющие в своем составе 4-гидроксибутират, обладают наилучшими биологическими свойствами для тканеинженерных сосудистых имплантатов, что делает его наиболее привлекательным для дальнейших исследований [33].

1.5 Биореакторы, необходимые для выращивания сосудов

Многие исследования показали, что рост клеток и тканей усиливается в ответ на механические напряжения в потоке жидкости по сравнению с таковыми в условиях статической инкубации. Одним из подходов, который использует использование динамической механической среды, является

биореактор. *Биореактор* может быть определен как система, которая имитирует физиологические среды для создания, физического кондиционирования и тестирования клеток, тканей, предшественников, опорных структур и органов *in vitro* [34].

1.5.1 Статическая система

Статическая система колб является простейшим типом биореактора и состоит из колбы с тканевыми конструкциями, закрепленных на месте в культуральной среде. В этих системах тканевые конструкции могут выращиваться в статической среде или в смешанной среде с использованием использования магнитного мешалка. Для роста ткани эффективный газообмен и массоперенос чрезвычайно важны. В статической системе аэрация газа обеспечивается аэрацией поверхности культуральной среды, а массоперенос происходит за счет молекулярной диффузии, поскольку на поверхности тканевых конструкций нет потока жидкости. В смешанной системе массоперенос происходит за счет турбулентной конвекции, и ткани испытывают турбулентный поток на поверхности, что может привести к структурно неадекватным неравномерным тканевым конструкциям. Для разработки конструкций с функциональной тканевой конструкцией, обеспечивающих эффективный массоперенос от среды до поверхность ткани, среда с низким напряжением сдвига и подвержение развивающейся ткани физическим стимулам являются критическими. Поскольку показано, что физические стимулы модулируют развитие ткани, дизайн биореакторов был сконструирован так, чтобы подвергать растущие ткани механическим воздействиям.

1.5.2 Динамическая система

1.5.2.1 Влияние механических воздействий на развитие сосудистых имплантатов

Важность механических воздействий на развитие тканевых сосудистых имплантатов не может быть занижена. Физическая среда, в которой

сохраняется клетка, оказывает глубокое влияние на поведение остальных клеток и, следовательно, функцию сосуда. Большинство клеток сохраняются в состоянии динамического потока, где газы и диффузные молекулы могут взаимодействовать либо косвенно, либо непосредственно в виде лигандов путем связывания специфических рецепторов на поверхности клетки и, таким образом, модулировать клеточный фенотип. Кроме того, клеточные и клеточно-матричные взаимодействия также играют важную роль в модулировании экспрессии генов, когда матрица и / или жидкости, окружающие клетки, перемещаются, расширяются или сжимаются по поверхности клетки. Силы сдвига действуют по-разному, воздействуя на ЭКМ, тем самым косвенно влияя на клетку, воздействуя непосредственно на клетку в целом или усиливая определенные молекулы, интегрированные в клеточную мембрану, и передают непосредственно через трансмембранные белки, соединяющиеся с клеточных внутренних органелл или косвенно через клеточные сигнальные каскады, которые приводят к изменению экспрессии генов.

Клеточные культуральные среды обычно дополняются фетальной телячьей сывороткой и / или множественными факторами роста для поддержания жизнеспособности клеток и сохранения экспрессированного фенотипа клеток, чтобы предотвратить их дедифференцирование в менее специализированное состояние. Даже при использовании этих сложных сред, терминально дифференцированные первичные человеческие клетки постепенно теряют свой специфический фенотип после длительного поддержания в статической тканевой культуре. Использование принципов динамической тканевой инженерии, при которых механические силы применяются к развивающейся конструкции, может быть спроектировано для усиления удержания фенотипа или содействия дифференциации клеток. Поэтому необходимо максимально точно подражать химическим, биологическим и физическим условиям, при которых трансплантат будет помещен в предварительное условие трансплантата в его предполагаемую среду [36].

1.5.2.2 Реакция эндотелиальных клеток на механическое напряжение

Эндотелий, выстилающий просветную поверхность кровеносных сосудов, когда-то считался простым, пассивным, не тромбогенным барьером. В настоящее время он широко признан динамичным участником активной физиологии сосудистой сети, контролируя тонус сосудов и гемостаз. Гемодинамические силы, действующие на эндотелий, включают в себя: растягивающее напряжение, действующее вдоль стенки сосуда из-за круговых деформаций, напряжение гидростатического давления (циклическая деформация) и напряжение сдвига, действующее вдоль длины сосуда из-за кровотока. Все это генерируется пульсирующим действием сердечного цикла и полученным кровотоком через артериальную систему. Результатом этих сил, оказываемых на эндотелий, является ряд различных ответов, которые варьируются от морфологических изменений до секреции биоактивных соединений. В исследовании (Ives et al., 1986) была отмечена прямая связь между белками цитоскелета (*factin*, *vimentin* и *vinculin*) с изменением морфологии клеток. Интересно, что еще четыре условия также вызывали удлинение клеток, включая: изменение концентраций Ca^{2+} , культуру на коллагеновых гелях, плавающие монослои и культивирование клеток на узорчатых поверхностях. Следовательно, изменение морфологии не обязательно является результатом одного условия, а процесса, в котором клетки адаптируются к каждой уникальной среде. Результаты (Kaiser et al., 1997) указывают на связь между механическим сдвигом и апоптозом сосудов эндотелиальных клеток, показывающим, что пролиферация клеток уменьшается с увеличением напряжения сдвига, а отсутствие какого-либо стресса, которое возникает в нормальных условиях статической культуры, может увеличить базальный уровень клетки апоптоз. Кроме того, существует сильное влияние на секрецию активных молекул, в некоторых случаях регулируемых, в других - регулируемых, а другие вообще не показывают изменений. Важно отметить, что применение конкретного режима сдвига может определять специфическое поведение клеток. Nerem и др. (Nerem et al., 1998) показали экспрессию HUVEC VCAM-1, молекулу адгезии,

измененную дифференциально между условиями культивирования от статического до устойчивого и импульсного течения [35].

1.5.2.3 Реакция сосудистых гладких мышечных клеток на механическое напряжение

Сосудистые гладкие мышечные клетки являются критическим компонентом сосудистой сети, находящейся в медиальном слое стенки сосуда и как таковые непосредственно подвергаются воздействию механической динамической среды.

Если экологические сигналы теряются, например, когда эксплантированная сосудистая ткань культивируется статически, клетки, в частности hVSMC, возвращаются к более упрощенному фенотипу. Как и эндотелий, клетки гладкой мускулатуры выполняют определенную функцию, не в последнюю очередь для сокращения сосудов, что обеспечивает контроль над периферическим кровотоком. Потеря фенотипа *in vivo* часто связана с увеличением пролиферации и потерей специализированной генной экспрессии, связанной с дифференцированным состоянием. Сильным показателем дедифференциации hVSMC является потеря способности к сокращению. Потеря сократительной способности может быть идентифицирована с использованием гистологических или цитологических методов путем локализации белков, связанных с сократительной аппаратурой клетки, такой как α -актин, в цитоплазме клеток. Широко признано, что механические и биохимические силы, сходные с окружающей средой *in vivo*, могут помочь сохранить маркеры клеточной дифференциации в культуре *in vitro* путем модуляции профилей экспрессии генов. Фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF), является мощным митогенным стимулом для пролиферации VSMC и, вероятно, будет опосредовать ответ VSMC на циклическую нагрузку. Ма и др. (Ma et al., 1999) продемонстрировали экспрессию тромбоцитарного фактора роста -B (PDGF-B) и его рецептора PDGF β (PDGF β) на поверхности клетки в ответ на воздействие циклического напряжения. Однако увеличение пролиферации

клеток часто происходит за счет сохранения фенотипа дифференцированных клеток, Stegemann and Nerem (2003) показали взаимодействия PDGF, трансформируя фактор роста бета (TGF- β) и 10% нагрузки в качестве механической стимуляции при развитии трансплантата. В этих исследованиях PDGF увеличивала пролиферацию клеток и уменьшала экспрессию α -актина в трехмерных коллагеновых гелях, одновременно уменьшая эффект уплотнения механической стимуляции, создавая более открытую матрицу по сравнению с механической стимуляцией. Напротив, экзогенное применение ингибираванной TGF- β клеточной пролиферации увеличивало экспрессию α -актина, что приводило к компактной или плотной матрице. Бирюков и др. (Byrakov et al., 1995) показали, что применение циклической нагрузки на VSMC избирательно индуцирует экспрессию фенотипического маркера h-caldesmon, тогда как снижение стресса снижает экспрессию. Интересно, что Ким и др. (Kim et al., 1999) показали, что клетки крысы, культивированные на фибронектине или витронектине, реагируют на механическую стимуляцию (блок Flexercell) путем увеличения пролиферации, однако те же клетки, культивируемые на ламинине или коллагене (подвергаются тем же условиям в бессывороточных средах) не было, но пролиферация индуцировалась при замене на сывороточные среды. Это объяснялось адсорбцией фибронектина и витронектина из 10% сыворотки, содержащей среду, на поверхность, на которой культивировали клетки. Ким и др. (Kim et al., 1999) также цитировали увеличение синтеза эластина и коллагена на покрытых фибронектином склеенных PGA каркасах, но не на коллагеновых губках I типа, когда клетки культивировали в бессывороточной среде. При культивировании в 10% сывороточных средах и подвергании воздействию клеток циклического штамма на коллагеновой губкерабатываются повышенные уровни эластина. В обоих случаях анализ вестерн-блоттинга показал, что фибронектин адсорбирован в матрице, и завершение адсорбированных белков отвечает за положительный ответ ГМК при воздействии циклического напряжения. Коста и др. (Costa et al.,

1991) также сообщали об увеличении синтеза эластина с помощью ГМК бычьей аорты при периодической циклической нагрузке.

Механическая деформация такого характера может рассматриваться как косвенная сила, прикладываемая к артериальной стенке вследствие сердечно-сосудистого выхода. Гиперплазия кишечника и медиальное утолщение являются критическим фактором, особенно в венозных трансплантатах, где VSMC мигрирует и размножается в просвет сосуда, эффективно ограничивая кровоток. Сообщалось, что значимые гистологические изменения, протекающие в этом процессе, являются ответом на механические раздражители, и было показано, что при уменьшении скорости кровотока происходит увеличение гиперплазии интимы. Важность характеристик кровотока и структуры стенки и механики не следует недооценивать в развитии тканевого сосудистого трансплантата. Силы, упомянутые выше, действуя на ЭК и VSMC, критически модулируют клеточную функцию. Клетки, которые заполняют кровеносные сосуды (преимущественно эндотелиальные, гладкие мышечные и линии фибробластов), поддерживают специфический фенотип в значительной степени из-за прямого воздействия химических и физических факторов в местной среде, например, матричной структуры, механических свойств и режима потока жидкости. Структурные и динамические эффекты на популяции клеток *in vivo* являются важным фактором в предотвращении тромбоза трансплантата, что является основной причиной отказа от сосудистого трансплантата малого диаметра [35].

1.5.2.4 Особенности транспорта в биореакторе

В рамках общих параметров проекта необходимо учитывать две области: метод применения равномерного перепада давления между трубчатой (просветом) и каркасной (над просветом) стороны реактора; и генерация и доставка полностью разработанного, пульсирующего ламинарного потока к эндотелиальным клеткам в просвете развивающейся конструкции.

Как правило, матрицы, культивируемые в статических условиях культивирования клеток, ограничены в массопереносе основных компонентов, таких как CO_2 , O_2 , факторов роста, глюкозы и т. д. в материал матрицы, ограничивая тем самым функциональное развитие тканей. Предел, с которым эти компоненты могут эффективно диффундировать в матрицу и из нее, чтобы обеспечить прилипшие клеточные популяции со средой, способствующей росту клеток и пролиферации, была приближена к 100 мкм (Vunjak-Novakovic 2002). Биореакторы должны быть спроектированы так, чтобы уменьшить эти ограничения массопереноса, применяя равномерный перепад давления в матрице для получения однородного питательного вещества, отходов, газовой среды по всей стенке матрицы (рис. 12). Кроме того, приложение конвективного потока может увеличить способность клеточных популяций мигрировать в матрицу [35].

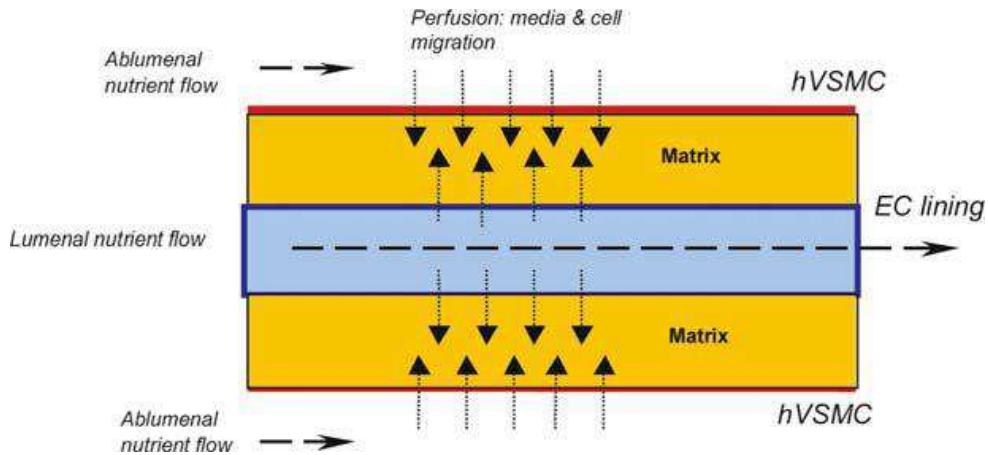


Рисунок 12 — Иллюстрация условий перфузии в биореакторе сосудистого трансплантата указывает на миграцию клеток в сосуд, перфузию среды и трансмембранные давление; указывает направление потока питательных веществ.

Важно учитывать, что диффузационные характеристики пористого каркаса будет меняться со временем (и положении в конструкции) по мере роста клеток, размножения и депонирования матричных компонентов, в следствии чего в каркасе изменится перепад давления. Поры матрицы постепенно уменьшаются в размерах, что приводит к увеличению падения давления по всей матрице, это обусловлено увеличением скорости сдвига с

уменьшением размера окружности пор. Этот процесс опосредован как клеточной пролиферацией, так и неспецифическим связыванием компонентов среды. Тем не менее пористость матрицы и давление на нее будет определять, будет ли поток через матрицу полностью заблокирован или повышенные скорости сдвига будут препятствовать клеточная адгезия или адсорбция белка. Последний сценарий более вероятен в биореакторной системе, не имеющей механизма поддержания равномерного давления по всей матрице, в отличии от сосудистого перфузационного контур, который имеет два отдельных контура потока. Поскольку конструкция становится более подобной ткани, способность биореактора в снабжении всей популяции клеток свежей насыщенной кислородом средой уменьшается.

Вторым важным параметром конструкции является обеспечение того, чтобы биореактор мог имитировать физическая среду, в которой обитает развивающийся организм. В случае сосудистых биореакторов, среда протекает через просвет конструкции в пульсирующем модуле, которая митирирует давление *in vivo* и характеристики кровотока. Реактор и поддерживающая инфраструктура должны передать матрице физиологически подобную среду, способствующую длительной культивации первичных клеточных культур человека [35].

1.6 Создание полимерных сосудистых имплантатов

1.6.1 Создание сосудистых полимерных имплантатов, используя технологию электростатического формования

Электроресининг является широко распространенным методом получения сосудистого имплантата. Это широко используемый способ получения нановолоконных 3х-мерных скаффолов из разных полимеров или полимерных смесей. Сам процесс позволяет контролировать диаметр волокна и пористость желаемого сотканного материала. Различные биодеградируемые полимеры, такие как поли (лакто-когликоловая кислота) (PLGA), полилактид (PLA) или поли (глицерин себакат) (PGS), показали многообещающие результаты *in vitro*, но не отвечали требуемым

биомеханическим свойствам *in vivo*. Это дает большой толчок к исследованию PGA в данной области [37].

1.6.2 Свойства внутренней структуры полимерной трубки, получаемые при формировании

В тканевой инженерии каркас играет важную роль в управлении и поддержке клеток, чтобы они могли функционировать и расти оптимально. Нановолокнистый каркас, сделанный при помощи электротроннинга, может служить в качестве почти идеального основания для тканевой инженерии, поскольку он имеет высокую площадь поверхности, а трехмерная взаимосвязанная пористая сеть может усилить клеточную привязанность и пролиферацию [38].

Необходимо отметить, что диаметр ультратонких волокон является одним из самых важных свойств, регулируемых параметрами электростатического формования, поскольку волокна с диаметрами в нанометровом диапазоне точно имитируют структуру белков во внеклеточном матриксе. Эта характеристика имеет такое же важное значение, как и размер, масштаб и рельеф, так, как играет важную роль в клеточной пролиферации и адгезии.

Следующим важным параметром нетканого материала является пористость, характеризующая способность транспортировки питательных веществ к клеткам.

Кроме того, нетканые волокнистые маты имеют очень высокую долю площади по отношению к объёму, что при взаимодействии с клетками значительно повышает их прикрепляемость [39].

1.6.3 Принцип работы метода

Основная система электротроннинга обычно состоит из следующих четырех основных компонентов показана на рисунке 13:

- ❖ шприцевой насос, который контролирует скорость потока раствора полимера,

- ❖ источник питания напряжения, который обеспечивает силу для растягивания
- ❖ иглу, которая перемещает раствор в высокое электрическое поле,
- ❖ коллектор, такой как металлический экран, пластина или вращающаяся оправка, на которую собираются электротиннинговые нановолокна.

Когда в камере подается высокое напряжение, заряженный полимерный раствор течет через шприц и имеет тенденцию образовывать подвесные конические капли, где поверхностное натяжение капли находится в равновесии с электрическим полем. Когда приложенное электрическое поле достаточно сильное, чтобы преодолеть поверхностное натяжение, крошечная струя выбрасывается с поверхности капли и «электроотвод» в сторону коллектора. Во время струйной процедуры растворитель в струйном потоке постепенно испаряется, а нетканые волокна с большим отношением площади поверхности к объему и высокой пористостью осаждаются на коллектор [40].

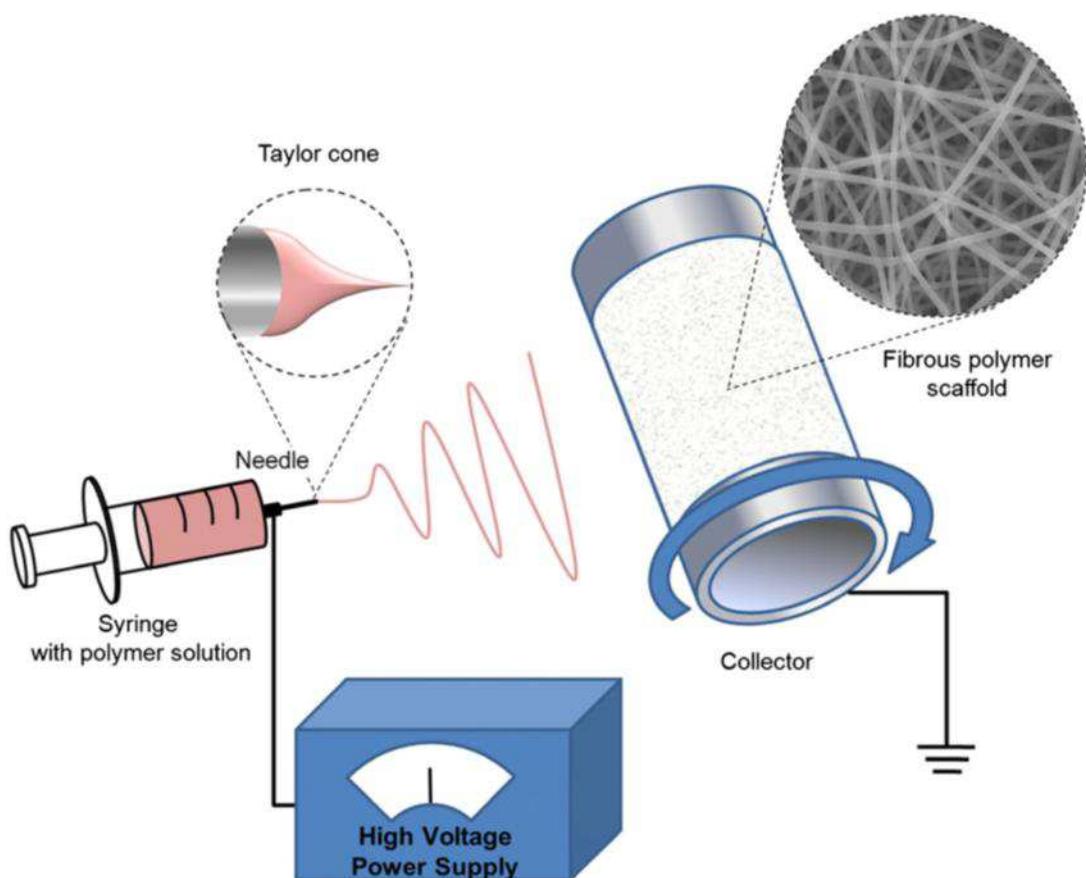


Рисунок 13 — Общая схема метода электростатического формования.

Увеличение напряжения электрического поля вызывает отталкивание между однополярными зарядами в жидкости, и силы притяжения между противоположно заряженными раствором и коллектором оказывают растягивающие усилие в жидкости, удлиняя каплю на кончике капилляра, в результате – формируется нить. Напряжение электрического поля при дальнейшем увеличении достигает той точки, при которой баланс поверхностного натяжения жидкости приводит к развитию конуса Тейлора. При дальнейшем преодолении данной величины напряжения происходит образование струи из вершины конуса, которая стремится к собирающему коллектору. В то время, как струя ускоряется в направлении к коллектору, она хаотически нестабильно изгибается, тем самым увеличивая время и длину пути к коллектору, способствуя испарению растворителя [39].

1.6.4 Параметры, от которых зависит внутренняя структура полимерного имплантата

1.6.4.1 Свойства полимера

1. «Тип»: Полимеры могут быть синтетическими или натуральными. Также может быть гомополимер, сополимер или смешанный полимер. Каждый полимер обладает уникальными свойствами, а сополимер имеет гибридные свойства их мономера.

2. «Молекулярный вес»: влияние молекулярного веса полимера на растворение и более высокая молекулярная масса увеличивает устойчивость полимера к растворению растворителя. Обычно полимер с более высокой молекулярной массой, чем с более низкой молекулярной массой, с использованием того же растворителя, занимает гораздо больше времени для растворения. Кроме того, молекулярная масса полимера оказывает прямое влияние на его вязкость. Более того, увеличение молекулярной массы может влиять на размеры пор и их форму. Например, увеличение молекулярной массы полистирола (PS) приводит к более крупным, менее однородным полым порам [37].

1.6.4.2 Концентрация полимера

Максимальная длина и диаметр волокон увеличиваются с увеличением концентрации. На (рис. 14) показаны морфологии в мембранах, полученных при различной концентрации полимера.

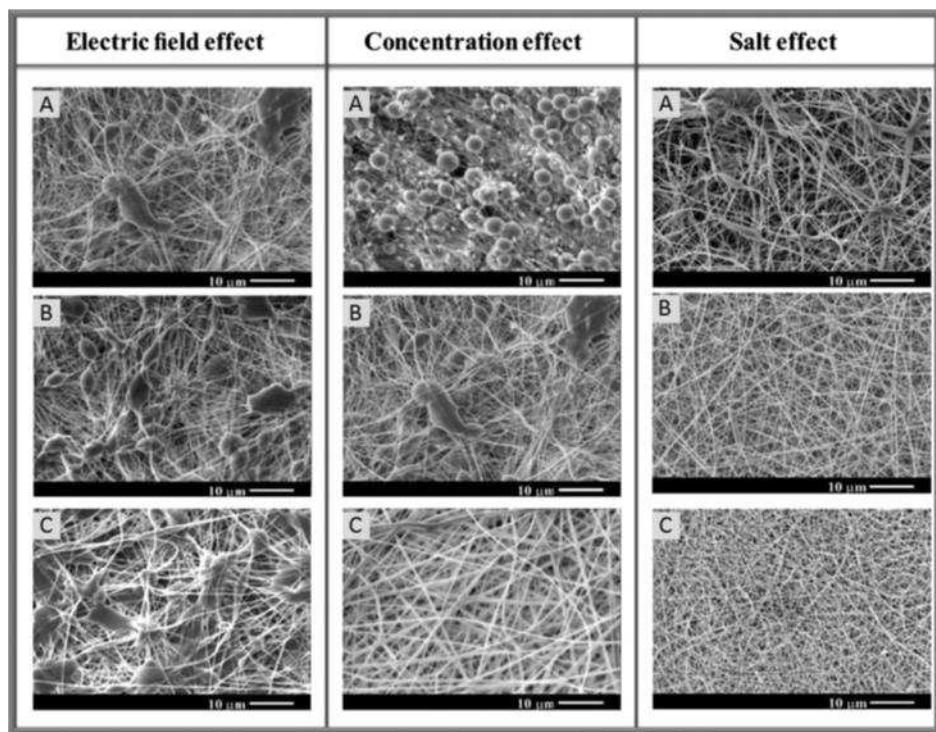


Рисунок 14 — Продемонстрировано влияние электрического поля, концентрации и аддитивной соли на микроструктуры нановолокна PDLA. Демонстрированные влияния электрического поля, концентрации и аддитивной соли на микроструктуры нановолокна PDLA. Эффект электрического поля: диаметр изменения нановолокна с электрораспределительным напряжением (A) 20 кВ (B) 25 кВ (C) 30 (концентрация при 30 мас.% Поли (молочная кислота) (PLA)/DMF и скорость подачи со скоростью 20 мл / мин). Концентрационный эффект: максимальная длина волокна и диаметр волокна увеличиваются с увеличением концентрации полимера. (A) 20 мас.%, (B) 25 мас.%, (C) 30 мас.% И (D) 35 мас.% (Напряжение 20 кВ, скорость подачи 20 мл / мин). Солевой эффект: меньший атомный радиус (такой как NaCl) показывает наименьший средний диаметр волокон, чем больший атомный радиус. (A) KH₂PO₄, (B) NaH₂PO₄ и (C) NaCl (раствор 30 мас.% при напряжении 20 кВ и скорости подачи 20 мл / мин).

1.6.4.3 Электрическое поле

1. «Сила»: увеличение напряжения электропередачи может изменить начальную форму капли. В нескольких исследованиях это что этот эффект зависит от типа полимера. Например, Thompson et al. показала длину и

диаметр волокна уменьшался с увеличением напряжения во всех точках данных, но только диаметр волокна уменьшался на значительном желаемом уровне. Katti et al. сообщалось о первоначальном уменьшении диаметра волокон поли (лактид-со-гликолид) от 900 до 450 нм с увеличением электрического потенциала от 8 до 10 кВ. Gu et al. показали, что для разных приложенных напряжений (10, 15 и 20 кВ) волокна PAN не имели существенного изменения диаметра волокна для решения. В других исследованиях Zong et al. показал, что диаметр нановолокна увеличился с помощью электроспиннинга в электропневматической поли (D-молочной кислоте) (PDLA) (рис.14).

2. «Геометрия»: Дуань и Цзян, результаты эксперимента по электроспиннингу, показывают, что ориентация и диаметр распределение волокон улучшается после оптимума электрического поля.

1.6.4.4 Скорость подачи раствора

При изменении скорости подачи в данном электрическом поле могут быть получены различные морфологии. Zong et al. обнаружили, что чем ниже скорость подачи раствора, тем меньше волокна были сформированы в виде шпиндельных гранул. В их исследовании были обнаружены относительно большие диаметры волокон и шарики в волокнах, появляющихся от более высокой скорости подачи раствора. Таким образом, диаметр нановолокна увеличился с помощью электронапряжения скорости подачи раствора. На рисунке 15 показано влияние скорости подачи раствора на диаметр нановолокна.

1.6.4.5 Диаметр диафрагмы сопла

Первоначальный радиус струи связан с размером отверстий пипетки, подающим раствор полимера в капельку Конуса Тейлора. Результаты показывают, что диаметр нановолокна уменьшался с уменьшением диаметра отверстия. На рисунке 15 показано влияние диаметра отверстия сопла на диаметр нановолокна [37].

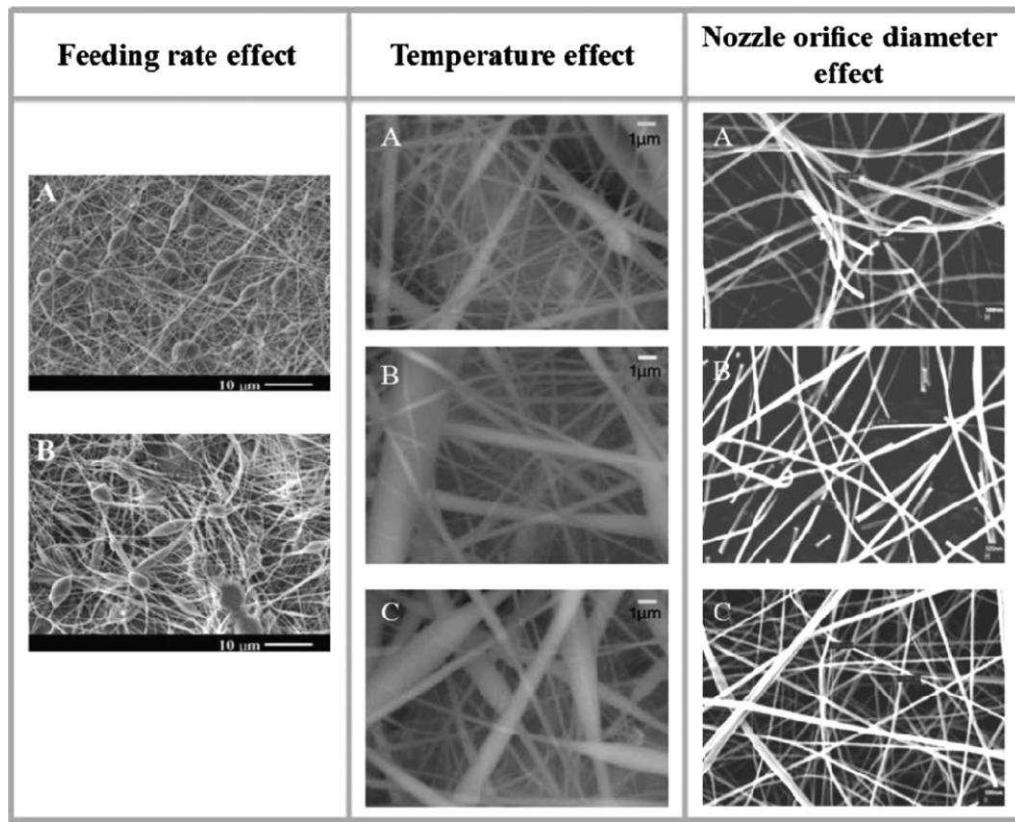


Рисунок 15 — Влияние различных параметров на структуру нановолокна.

2 Материалы и методы

- ✓ Оборудование для электротропиннинга “NANON-01A” (MECC Inc., Япония)
- ✓ Холодильник бирюса
- ✓ Камера для заморозки
- ✓ Микроскоп инвертированный
- ✓ Полимеры ПЗГБ и ПЗГБ/В (10, 15%)
- ✓ Пипетки на 0,2 мкл, 1 мл и 5 мл
- ✓ Автоматическая пипетка
- ✓ Носики для пипеток
- ✓ Чашки Петри на 10 мл
- ✓ Стальные мишени диаметром 3,2 мм и 1 мм
- ✓ Специальный шприц для ЭСФ (5 мл) с тупоконечной иглой
- ✓ Химически чистый хлороформ
- ✓ Бюксы на 50 мл
- ✓ Колбы на 100 мл с риской
- ✓ Магнитные мешалки
- ✓ Вытяжной шкаф
- ✓ Колориметр
- ✓ Пробирки на 15 мл
- ✓ Центрифуга (SIGMA (3-15L))
- ✓ Планшеты 96 луночные
- ✓ Фольга
- ✓ Колбы на 50 мл
- ✓ Магнит для размешивания раствора
- ✓ Шпатели

2.1 Материалы для перфузионной системы:

- Пульсирующий насос “Heidolph Pumpdrive 5001”

- 5 инфузионных устройств однократного применения с пластиковой иглой производства “SF Medical Products GmbH, Germany ”
- Флаконы для ведения культур (TPP, Switzerland)
- Фильтр для газообмена между средой и инкубатором от флакона
- Среда DMEM (Gibco) - 1 литр
- Сода для среды DMEM – 3.7 грамм
- Bovine Serum Albumin, BSA (HyClone) - 50 мл
- Раствор Antibiotic-Antimycotic (penicillin 10,000 М ед/мл, streptomycin 10,000 мкг/мл, Amphotericin B 25 мкг/мл, Gibco) - 10 мл
- Полимер ПЗГБ/В (10%)
- Клеточная линия фибробластов NIH/3T3 и человеческих фибробластов из МСК

2.2 Протокол создания биореактора:

2.2.1 Нестерильная стадия создания системы

1. Для конструирования перфузионной системы использованы 5 инфузионных устройств однократного применения с пластиковой иглой производства “SF Medical Products GmbH, Germany ”, флаконы для ведения культур (TPP, Switzerland) и емкость 0,5 литра. С каждого инфузионного устройства сняли по белому переходнику (в общем 10 штук), осторожно вынули синие коннекторы (их должно быть 6 штук), отрезали трубку с одной стороны, чтобы получился один конец свободным, а другой конец остался с собственным переходником от инфузионной системы. Длина трубки подбирается индивидуально из расчета того, насколько далеко будет стоять насос, и того какое расстояние будет между двумя банками.
2. Резиновые трубы инфузионных систем с внутренним диаметром 4 мм поместили в 70% раствор этанола, чтобы они оставались стерильными.

Внимание! Снять резинки лучше в ламинаре для максимального сохранения асептических условий.

- После этого собираем две трубы так, чтобы на одном конце был белый переходник, а на втором собственный переходник от системы.

Фото автора.



Рисунок 16 – Составные части перфузионной культивационной системы.

- Также надо собрать трубы, которые будут соединять флакон и банку.
- Ниже серединного уровня емкости флакона для ведения культур просверлили два отверстия точно друг напротив друга (сверло на 3,5 мм) и еще два также чуть выше середины (эти отверстия будут служить дополнительной циркуляцией среды в основной части биореактора, чтобы избежать застоя среды вокруг полимера с клетками) .
- Края полученных отверстий отшлифовали, подгоняя отверстия под размер, под коннекторы из инфузионной системы. Важно, на коннекторы необходимо надеть резиновые прокладки (вырезать из конюль от капельниц), предварительно сделав размер равный размеру коннектора для того, чтобы коннекторы очень туго и плотно были установлены в просверленные отверстия, дабы исключить какое-либо протекание и будущей среды, тем самым исключив нарушение герметичности системы (Рис. 17).

Фото автора.



Рисунок 17 – Установленные коннекторы с резиновыми прокладками в емкости, в которой будет находиться полимер.

7. Когда установили коннекторы, проверьте насколько хорошо в них входят переходники (именно собственные переходники от систем), поскольку не исключено, что придется отверстия сделать чуть больше, для более легкого подсоединения переходников в коннекторы.
8. Следующий этап, создание крышек для 0,5 литровой емкости, где будет запас питательной среды и банки, где будет расположен сосуд. Берем крышку от фильтрационной емкости (см. рис 18) и проделываем в них отверстия также как и делали раньше. Внимание! Для того чтобы коннекторы не протекали, необходимо также надеть на них резиновые прокладки, как это было проделано ранее с флаконом.
9. Соединяем все трубы вместе со шлангом от насоса и проверяем перфузионную систему на целостность. Абсолютно все места соединений переходников с коннекторами либо со шлангом должны быть хорошо закреплены во избежании протекания биореактора.

Фото автора.



Рисунок 18 – Емкость 0,5 литра для питательной среды.

10. Включите насос на максимальных оборотах и проверяйте надежность системы в течение нескольких дней. Если все работает отлично, переходите к следующей стадии.

2.2.2 Стерилизация и сборка биореактора в асептических условиях

1. Завершающий шаг. Собираем всю систему, обрызгиваем 70% спиртом и ставим в ламинар.
2. После того как вся система будет собрана, необходимо установить полимер в биореактор, как показано на рисунке 20.
3. Основная часть биореактора (флакон) защищен крышкой с мембранным фильтром с диаметром пор 0,22 мкм.

Фото автора.



Рисунок 19 – Фильтр от культурального флакона, поры в мемране 0,22 мкм.

4. Полностью собранная перфузационная система выглядит как на рисунке. 20:

Фото автора.

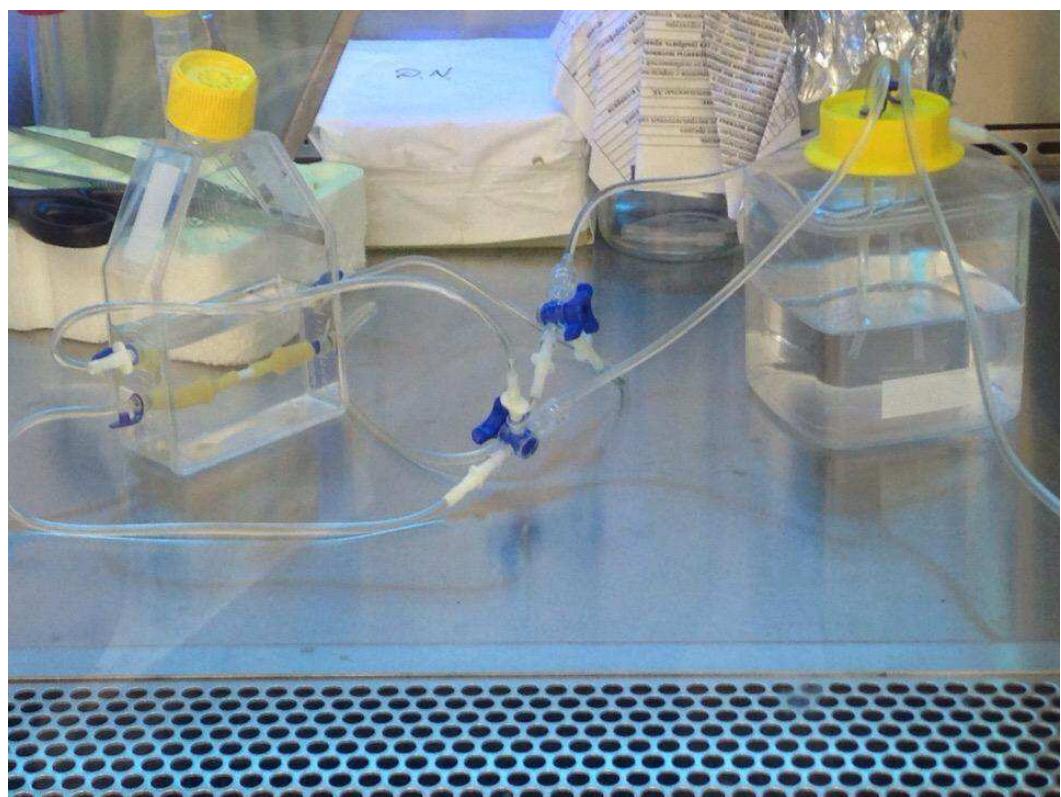


Рис. 20 – Фотографии собранной и функционирующей перфузационной культивационной системы (этап стерилизации).

5. Стерилизовать биореактор в 70% этаноле в течение 2 дней под ультрафиолетом.

6. После стерилизации промывать всю систему в течение дня стерильной водой (простериллизованную предварительно в автоклаве), чтобы полностью вымыть спирт во избежание оставления его на стенках во всей системе и исключения токсического действия спирта на будущие выращиваемые в нём клетки.

7. После этого асептично выводим воду из системы, чтобы случайно не занести заражение (не касаться концами горлышка флакона и емкости чего-либо во время выведения воды).

2.2.3 Высев клеток линии человеческих фибробластов (Ihf), полученных из жировой ткани. Проверка системы на асептичность,

герметичность и отсутствие какого-либо токсичного действия биореактора на клетки

1. Теперь, когда биореактор готов, необходимо залить в него среду DMEM сначала в емкость 0,5 литра.
2. После предварительно посчитанную суспензию клеток в камере Горяева высаживаем с помощью пипетки на полимер, а затем спустя несколько минут добавляем оставшуюся среду во флакон (основную часть биореактора), доливаем до метки 140-150 мл, чтобы все порты находились в питательной среде.
3. Культивируем клетки в статических условиях в течение 7 дней, после чего включаем перистальтический насос на отметку 40 грм и продолжаем культивацию еще пару дней.
4. Проверяем адгезию клеток на полимере на 4 и 9 сутки.
5. Рабочая перфузационная культивационная система показана на рис.

Фото автора.



Рисунок 21 – Перфузационная культивационная система с полимерной трубкой и клеточной линией NIH 3T3.

2.2.4 Проверка биореактора на поддержание асептических условий с помощью микробиологических тестов

1. Разводим питательный бульон в 120 мл воды, нагреваем для полного растворения среды и заливаем в 12 пробирок с пробками.
2. Автоклавируем их чтобы они были стерильными.
3. Берём из биореактора миллилитр среды на 1, 3, 5, 7, 9 сутки пока система находится в стадии культивирования клеток и производим высея в пробирки по 2 повторности при каждом разе взятия среды.
4. Также для большей достоверности можно проверить среду на 5 и 7 сутки методом “раздавленной капли”.

2.3 Создание полимерных трубчатых каркасов из полигидроксиалканоатов

1. Для изготовления полимерных трубок использовали метод электростатического формования на специальном оборудовании “NANON-01A”.

Фото автора.



Рисунок 22 – Оборудование для электропиннинга “NANON-01A”.

2. Стальные мишени нарезали по 20 см и устанавливали в оборудование.

Фото автора.



Рисунок 23 – Стальные мишени диаметром 2,4 и 3,2 мм.

3. Полимеры по отдельности растворяли в чистом концентрированном хлороформе в колбах на 50 мл на магнитных мешалках.

4. После отфильтровывали с помощью мельничного газа, заливали в колбы объёмом 100 мл до риски и в результате получали 4% растворы ПЗГБ и ПЗГБ/В (молярная концентрация валерата 10 и 15%) .

5. Раствор полимера набирали из 50 мл бюксов в специальный шприц с трубкой и затупленной иглой на конце, предварительно промывая её концентрированным хлороформом в вытяжном шкафу.

Фото автора.



Рисунок 24 – Заливка растворенного полимера в шприц.

6. После этого устанавливали шприц в машину и задавали необходимые параметры (см. в результатах).

Фото автора

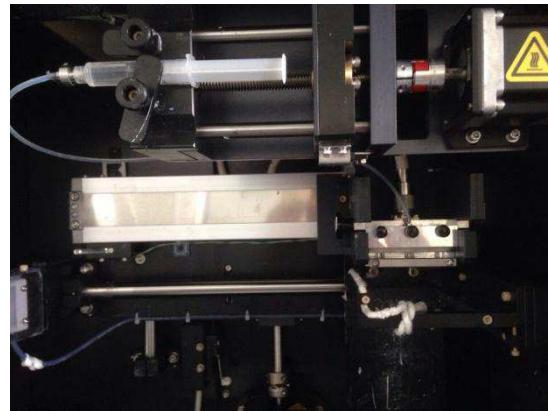


Рисунок 25 – Шприц с полимерным раствором установленный в оборудование для ЭСФ.

7. Когда полимерная трубка сформировалась, снимали ее с мишени и клали в чашки Петри для дальнейшего хранения.

Фото автора.

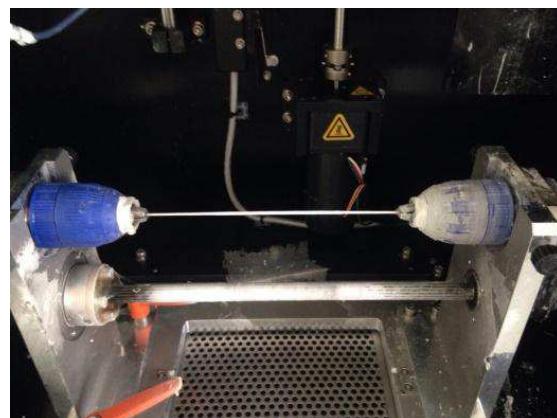


Рисунок 26 – Полимер диаметром 3,2 мм, сотканный на стальной мишени.

2.4 Культивирование клеток на полимерных трубчатых каркасах в статических и динамических условиях. Проверка на адгезию и клеточную пролиферацию

2.4.1 Нарезка полимерных трубчатых оснований и высев клеток для проверки их адгезии и пролиферации на полимере

1. Трубки нарезали необходимой длины (примерно 1 см) для посадки культуры клеток.

Фото автора.



Рисунок 27 – Культуры клеток (человеческих и мышиных фибробластов) на полимерных трубчатых основаниях.

2.4.2 Приготовление питательной среды

1. Полная питательная среда состоит из среды DMEM (1 л.), раствора антибиотиков (10 мл) и бычьей сыворотки (100 мл, 10% от общего объема).
2. Берём среду DMEM (без NaHCO_3) в порошке разводим в 1 л. ионизированной воды добавляем 3,14 г. соды, с помощью pH метра и соляной кислоты доводим значение кислотности до 7,1 – 7,4.
3. После этого фильтруем и ставим стерильную среду в ламинар, добавляем 100 мл бычей сыворотки и 10 мл антибиотика и ставим в холодильник до дальнейшего использования.

2.4.3 Предварительное культивирование клеток во флаконе

1. Размораживали клеточные линии мышиных фибробластов (3T3) и линии человеческих фибробластов, полученных из мезенхемальных стволовых клеток (Ihf).
2. Из пробирок для заморозки делали высев клеток во флаконы в ламинаре и культивировали в инкубаторе при 37°C и в атмосфере 5% CO_2 .

Фото автора.



Рисунок 28 – Приготовление клеточной среды и дальнейшее культивирование фибробластов во флаконах.

2.4.4 Приготовление клеточной сусpenзии

1. Питательную среду убирали, добавляли 1-2 мл трипсина (Trypsin-EDTA (0.25%, Gibco) и инкубировали в течение 5 минут при 37 °C. После диссоциации клеток трипсин ингибирировали равным количеством питательной среды, клетки смывали с поверхности в центрифужную пробирку.
2. Центрифугировали при 3000 об./мин в течение 5 минут.
3. Надосадочную жидкость убирали, осадок ресуспендировали в свежей среде и подсчитывали клетки с помощью камеры Горяева предварительно окрасив триптофановым синим.

Фото автора.

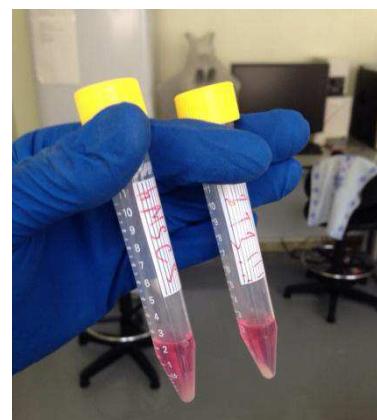


Рисунок 29 – Клеточный осадок после центрифугирования.

2.4.5 Высев клеток на полимерные основания в статических условиях в чашках Петри и динамических условиях в биореакторе

1. Культуру линейных фибробластов мыши NIH 3T3 высаживали на полимер ПЗГБ и ПЗГБ/В (10%) в Чашках Петри для пробного выращивания в статических условиях и дальнейшей проверки системы.
2. Рассев в чашки Петри проводили из рассчета тыс.клеток/мл.
3. Рассев клеток в биореактор проводили из рассчета

2.5 Проверка каркасов на адгезию и клеточную пролиферативность

1. Полимерные каркасы вытаскивали из чашек Петри и биореактора, снимали клетки трипсином (Trypsin-EDTA (0.25%), Gibco) в течение 15 минут и считали клеточную суспензию в камере Горяева предварительно окрасив триптофановым синим.
2. Рассчитывали клетки, в статических условиях на 5 сутки и в динамических условиях на 9 сутки (динамика в течение 3 суток).
3. Прикрепляемость и количество выросших клеток оценивали после окрашивания флуоресцентным зондом DAPI. Для этого образцы с клетками фиксировали раствором формальдегида в течение 5 минут, после отмычки фиксатора фосфатно-солевым буфером клетки окрашивали DAPI в течение 5 минут и затем трижды промывали фосфатно-солевым буфером. Морфологию клеток, распределение на носителях и формирование межклеточного матрикса (МКМ) изучали с помощью растровой электронной микроскопии (TM-3000, Hitachi HT Corporation, Япония). Для этого клетки предварительно фиксировали раствором формальдегида, затем трижды отмывали абсолютизированным этанолом и лиофильно высушивали.

3 Результаты и обсуждения

Изъято 6 страниц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сконструирован биореактор для длительного перфузирования каркаса сосуда в культуре клеток
2. Биореактор герметичен, и создает стерильные условия для клеток
3. Получены ПГА ЭСФ - трубчатые и пленочные изделия
4. Проведено культивирование фибробластов на ЭСФ - изделиях в статических и динамических условиях

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЧКВ - чрезкожные коронарные вмешательства
КШ - коронарное шунтирование
СД - сахарный диабет
ИМ - инфаркт миокарда
АКШ - аортокоронарное шунтирование
ВГА - внутренняя грудная артерия
ЭК - эндотелиальные клетки
ЭТ - эндотелины
СГМК - сосудистые гладкие мышечные клетки
ВКМ - внеклеточный матрикс
TEVG - тканно-инженерные сосуды малого диаметра
PLLA - полилактид
PLGA - сополимер молочной и гликолевой кислот
P4HB/ PHB - полигидроксибутират (polyhydroxybutyrate)
РНА - сополимер полигликолевой кислоты и полигидроксиалcanoата
(Polyhydroxyalkanoates)
PGA - гликоливая кислота
PLA - молочная кислота
ГМК - гладкие мышечные клетки
PCL - poly (ϵ -caprolactone)
ePTFE - обычные сосудистые транспланаты
PLCL - poly (лактид-кокапролактон)
PGCL - poly (гликолид-кокапрокатон)
P (LLA-CL) - poly (L-лактид-со- ϵ -капролактон)
PDGF - фактор роста, полученный из тромбоцитов
TGF- β - трансформированный бетта-фактор роста
PS - полистирола

Список используемых источников

- 1.** Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: Statistics from World Health Organisation and United Nations Judith A. Finegold, Perviz Asaria, Darrel P. Francis.
- 2.** Comparison of coronary risk factors and angiographic findings in younger and older patients with significant coronary artery disease. MOHAMMAD PARSA MAHJOOB , SOHEILA SADEGHI, HAMIDE FALAHATY KHANAMAN, MOHAMMADREZA NADERIAN, ISA KHAHESHI.
- 3.** Vascular Mechanobiology: Towards Control of In Situ Regeneration Eline E. van Haaften, Carlijn V. C. Bouten and Nicholas A. Kurniawan.
- 4.** Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. Xiangkui Ren, Yakai Feng, Jintang Guo, Haixia Wang, Qian Li, Jing Yang, Xuefang Hao, Juan Lv, Nan Ma and Wenzhong Lif.
- 5.** The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. Samand Pashneh-Tala, BEng, BSc, Sheila MacNeil, BSc, PhD, and Frederik Claeysens, Lic, PhD.
- 6.** Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. Yuji Naito, Toshiharu Shinoka, Daniel Duncan, Narutoshi Hibino, Daniel Solomon, Muriel Cleary, Animesh Rathore, Corey Fein, Spencer Church, Christopher Breuer. Advanced Drug Delivery Reviews 63 (2011) 312–323
- 7.** Tissue-Engineered Blood Vessel Graft Produced by Self-Derived Cells and Allogenic Acellular Matrix *A Functional Performance and Histologic Study Daping Yang, Tiefang Guo, Chunlei Nie, and Steven F. Morris, FRCS(C)†*
- 8.** Dynamic, Nondestructive Imaging of a Bioengineered Vascular Graft Endothelium. Bryce M. Whited, Matthias C. Hofmann, Peng Lu, Yong Xu,

Christopher G. Rylander, Ge Wang, Etaí Sapoznik, Tracy Criswell, Sang Jin Lee, Shay Soker, Marissa Nichole Rylander.

9. Y.A. Argunova, S.A. Pomeshkina, A.A. Inozemtseva. Potential benefits of exercise training as a factor of ischemic preconditioning prior to coronary artery bypass grafting. УДК: 616.12-005.4-089.163:615.825. DOI: 10.17802/2306-1278-2017-6-3-166-174. Статья поступила 06.06.17 года.

10. Bokeriya L.A., Aronov D.M. et al. Russian clinical guidelines. Coronary artery bypass grafting in patients with ischemic heart disease: rehabilitation and secondary prevention. *Cardiosomatics*. 2016; 7 (3–4): 5–71.

11. К. В. Шумков, Н. П. Лефтерова, Н. Л. Пак, Т. Т. Какучая, Ю. Ю. Смирнова, А. Г. Полунина, В. М. Воеводина, В. Ю. Мерзляков, Е. З. Голухова, Л. А. Бокерия. Аортокоронарное шунтирование в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце: сравнительный анализ ближайших и отдаленных результатов и послеоперационных осложнений (нарушения ритма сердца, когнитивные и неврологические расстройства, реологические особенности и состояние системы гемостаза). *Креативная кардиология*, № 1, 2009 год. УДК 616.132.2-089.86:616.12-089.8-78+616.12-089.168-06.

12. Chigidinova D.S., Rudenko B.A., Shanoyan A.S., Shukurov F.B. Stenting of "Unprotected" Left Main Coronary Artery with Concomitant Proximal Chronic Occlusion of the Right Coronary Artery. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2016; 12(6):698-702. (In Russ). DOI: 10.20996/1819-6446-2016-12-6-698-702.

13. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. / Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение – Красноярск, Издательство “Красноярский писатель”, 2011. – 392 с.

14. Федорченко Алексей Николаевич, “Рестеноз как основная проблема после чрескожных коронарных вмешательств”, Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Новосибирск 2009 год.

15. «Клиническая кардиология: диагностика и лечение» в 3х томах под редакцией Л.А. Бокерия, Е.З. Голуховой. Издательство НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН 2011. – 1730 с. ISBN: 978-5-7982-0277-5.

16. Анатомия сердечно-сосудистой системы: учебное пособие для студентов медицинских вузов / В.И. Козлов. - М.: Практическая медицина, 2013. — 192 с.: ил. ISBN 978-5-98811-200-6

17. Nanoarchitecture of scaffolds and endothelial cells in engineering small diameter vascular grafts. Krishna Kumar Sankaran, Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan and Swaminathan Sethuraman. Biotechnol. J. 2015, 10, 96–108. DOI 10.1002/biot.201400415.

18. Endothelial Cell Functions. CARINE MICHELS. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 196:430–443 (2003).

19. Д. В. Атрощенков. «Энциклопедия клинической кардиологии». М.: Научная книга, 2009. — 400 с.: 8 ил.

20. Whited B.M., Hofmann M.C., Lu P., Xu Y., Rylander C.G., et al. (2013) Dynamic, Nondestructive Imaging of a Bioengineered Vascular Graft Endothelium. PLoS ONE 8(4): e61275. doi:10.1371/journal.pone.0061275

21. Pries, A. R., Secomb, T. W., Gaehtgens P., The endothelial surface layer. Eur. J. Physiol. 2000, 440, 653–666.

22. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. D Tousoulis, M Charakida, C Stefanadis. Heart 2006;92:441–444. doi: 10.1136/hrt.2005.066936.

23. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. Victor W. M. van Hinsbergh. Semin Immunopathol (2012) 34:93–106. DOI 10.1007/s00281-011-0285-5.

24. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells Gang Wang¹, Laureen Jacquet², Eirini Karamariti² and Qingbo Xu². J Physiol 593.14 (2015) pp 3013–3030. DOI: 10.1113/JP270033.

25. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles Patrick Lacolley^{1*}, Ve'ronique Regnault¹, Antonino

Nicoletti², Zhenlin Li³, and Jean-Baptiste Michel. *Cardiovascular Research* (2012) 95, 194–204. doi:10.1093/cvr/cvs135.

26. Human Vascular Smooth Muscle Cell Culture. *Human Cell Culture Protocols*, pp 251-263. 07 October 2011. Diane Proudfoot. Catherine Shanahan.

27. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Larry L. Hench and Julian R. Jones. Woodhead Publishing Limited. 2005. 304 стр. ISBN 13: 978-1-85573-737-2.

28. Cardiovascular Tissue Engineering: Preclinical Validation to Bedside Application. Cameron Best, Ekene Onwuka, Victoria Pepper, Malik Sams, Jake Breuer, and Christopher Breuer. *PHYSIOLOGY* 31: 7–15, 2016. Published December 11, 2015; doi:10.1152/physiol.00018.2015

29. Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vascular Health and Risk Management* 2015:11 79–91

30. The Tissue-Engineered Vascular Graft— Past, Present, and Future. Samand Pashneh-Tala, BEng, BSc, Sheila MacNeil, BSc, PhD, and Frederik Claeysens, Lic, PhD. *TISSUE ENGINEERING: Part B Volume 22, Number 1*, 2016 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/ten.teb.2015.0100

31. Cardiovascular Tissue Engineering: Preclinical Validation to Bedside Application. Cameron Best, Ekene Onwuka, Victoria Pepper, Malik Sams, Jake Breuer, and Christopher Breuer. *PHYSIOLOGY* 31: 7–15, 2016. Published December 11, 2015; doi:10.1152/physiol.00018.2015.

32. Tissue engineering in vascular surgery G.I. Popov, V.N. Vavilov. Гены & Клетки Том IX, № 4, 2014.

33. Шишацкая Е.И., Жила Н.О., Николаева Е.Д., Сырвачева Д.А., Сински Э.Дж. Синтез и исследование сополимеров 3-гидроксибутират/4-гидроксибуктират // Перспективные материалы. – 2013. – Т.3. – С.20-26.

34. Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review. V. BARRON, E. LYONS, C. STENSON-COX, P. E. MCHUGH, and A. PANDIT. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 31, pp. 1017–1030, 2003.

35. DESIGN OF VASCULAR GRAFT BIOREACTORS. P.S. MCFETRIDGE AND J.B. CHAUDHURI. J.B. Chaudhuri & M. Al-Rubeai (eds.), Bioreactors for Tissue Engineering, 269 - 283.

36. Design of Bioreactors for Cardiovascular Applications. E. Lyons and A. Pandit. Topics in Tissue Engineering 2005, Volume 2. Eds. N. Ashammakhi & R.L. Reis © 2005.

37. Vascular Tissue Engineering: Effects of Integrating Collagen into a PCL Based Nanofiber Material. Ulf Bertram, Dominik Steiner, Benjamin Poppitz, Dirk Dippold, Katrin Köhn, Justus P. Beier, Rainer Detsch, Aldo R. Boccaccini, Dirk W. Schubert, Raymund E. Horch, and Andreas Arkudas. Hindawi BioMed Research International Volume 2017, Article ID 9616939, 11 pages <https://doi.org/10.1155/2017/9616939>.

38. Li, Ying, "Electrospinning of Core-shell Collagen Nanofibers" (2013). Electronic Thesis and Dissertation Repository. 1499. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/1499>.

39. Effect of Orientation on Properties of Ultrafine Fibers Produced by Electrostatic Molding from Poly-3-Hydroxybutyrate. Goncharov, Dmitriy B; Sukovatyi, Aleksey G. Journal of Siberian Federal University. Biology; Krasnoyarsk Том 7, Изд. 2, (2014): 186-194.

40. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. Nae Gyune Rim, Choongsoo S. Shin and Heungssoo Shin. Published 25 January 2013 • 2013 IOP Publishing Ltd.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
М. Волова Т.Г.Волова.
«5 » июля 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Разработка перфузионной культивационной системы для получения
ткане-инженерных сосудов.

Руководитель

Шишакова

подпись, дата

Выпускник

Николаев

подпись, дата

Д.б.н, профессор

должность, ученая степень

Е.И. Шишацкая

инициалы, фамилия

Д.Д. Николаев

инициалы, фамилия

Красноярск 2019