

РАЗРАБОТКА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ СМЕСИ ХИТОЗАНА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ

И.С. Захарова^{1,2,3}, А.М. Смирнова^{1,3,4}, М.К. Живень^{1,2,3}, Ш.Б. Саая³, А.И. Шевченко^{1,2,3,4}, С.М. Закиян^{1,2,3,4}, Л.Н. Иванова^{1,4}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Development of tissue-engineered chitosan-polycaprolactone blends for vascular surgery

I.S. Zakharova^{1,2,3}, A.M. Smirnova^{1,3,4}, M.K. Zhiven^{1,2,3}, Sh.B. Saaya³, A.I. Shevchenko^{1,2,3,4}, S.M. Zakian^{1,2,3,4}, L.N. Ivanova^{1,4}

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

³ E.N. Meshalkin Siberian Federal Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Благодаря развитию тканевой инженерии в сосудистой хирургии появилась возможность минимизировать отдаленные негативные последствия, возникающие при замещении дефектов синтетическими протезами. Выбор оптимального матрикса-носителя и источника клеток для его заселения — ключевое условие, необходимое для того, чтобы функциональные свойства такой конструкции были максимально приближены к физиологическим. В ряде работ показано, что смесь поликапролактона с хитозаном является подходящим биodeградируемым материалом для тканевой инженерии.

В данной работе предложен эффективный способ получения тканеинженерных конструкций на основе мембран из поликапролактона и хитозана, заселенных эндотелиальными клетками кардиальных эксплантов человека. Проведены исследования динамики пролиферации, жизнеспособности эндотелиальных клеток в составе полученных конструкций, анализ специфических антигенов, оценка способности синтезировать компоненты межклеточного матрикса и формировать капилляроподобные структуры. Полученные результаты свидетельствуют, что эндотелиальные клетки кардиальных эксплантов человека в составе тканеинженерных конструкций на основе смеси поликапролактона и хитозана сохраняют свои функциональные свойства. Использование таких тканеинженерных конструкций при разработке заменителей сосудов малого диаметра позволит максимально приблизить свойства трансплантата к физиологическим.

Ключевые слова: тканевая инженерия, эндотелиальные клетки, поликапролактон, хитозан, сосудистая хирургия.

Введение

В настоящее время в мире ведутся разработки тканеинженерных сосудов на основе биологических тканей и синтетических материалов. Лечение ряда патологий кровеносных сосудов предусматривает замену на ауто-, аллотрансплантаты и синтетические протезы. Существуют ограничения и противопоказания для использования ауто- и аллотрансплантатов, проблемы выбора донора и отторжения аллотрансплантатов. Несмотря на ряд положительных свойств синтетических материалов (биосовместимость, контролируемость морфологических и механических свойств), часто наблюдаются неудовлетворительные отдаленные результаты при использовании синте-

e-mail: zakharova@bionet.nsc.ru

Tissue engineering provides the opportunity to minimize some possible negative results of the synthetic vascular grafts in long-term follow-up. The choice of the optimal scaffold and cell source for seeding are key conditions to bring properties of vessel substitute to physiological. In some works it is shown that a chitosan-polycaprolactone blend is a suitable biodegradable material for tissue engineering. In this paper we suggest an efficient method to generate of tissue-engineered chitosan-polycaprolactone blends, cellularized by endothelial cells of human cardiac explants. The cells cultured on the blended membranes retain their functional properties: viability and proliferative properties; maintain specific endothelial antigens and synthesis of extracellular matrix. These results suggested that tissue-engineered chitosan-polycaprolactone blends seeded by endothelial cells of human cardiac explants may be potential to development of substitutes for small diameter blood vessels.

Keywords: tissue engineering, endothelial cells, polycaprolactone, chitosan, vascular surgery.

тических протезов, в особенности малого диаметра (менее 6 мм): стенозы, тромбозы, гиперплазия неointимы, невозможность роста трансплантата, воспалительные реакции, вызванные продуктами распада полимеров, потеря структурной целостности из-за быстрой деградации полимеров.

При разработке тканеинженерного сосуда в качестве матрикса-носителя для заселения клеток используют разнообразные синтетические и натуральные материалы [1, 2]. Не все материалы, используемые в сосудистой хирургии, применимы для создания протезов сосудов малого диаметра: политетрафторэтилен (PTFE), полиэтилентерефталат (PET), полиуретаны — демонстрируют неудовлетво-

рительные отдаленные показатели в силу тромбоза и стеноза [2]. В этой связи, в настоящее время в задачи тканевой инженерии сосудов, особенно малого диаметра, входит подбор подходящих для заселения материалов.

Хитозан и поликапролактон (PCL) — биodeградируемые материалы, применяемые в биомедицине в силу ряда положительных свойств [3]. Использование смеси натуральных и синтетических полимеров позволяет разработать материал с более ценными свойствами, чем те, которыми обладает каждый из компонентов по отдельности [4]. Метод получения смеси более дешевый и менее ресурсозатратный по сравнению с разработкой способов синтеза новых мономеров или протоколов полимеризации. В ряде работ показано, что смесь PCL с хитозаном имеет более благоприятные свойства, чем имеющиеся у каждого материала в отдельности [5, 6]. Подобраны оптимальные соотношения компонентов смеси для формирования мембраны, пригодной для заселения фибробластами мыши [5], корнеальным эндотелием быка [3, 6], а также дермальным микроваскулярным эндотелием человека [7]. В экспериментах на модельных животных показана возможность использования материала, состоящего из смеси PCL и хитозана, для создания сосуда малого диаметра, заселенного мононуклеарными клетками крови собаки [8].

Другая важная задача при создании тканеинженерного протеза сосуда — выбор подходящего источника клеток для заселения, что имеет принципиальное значение для последующей правильной интеграции трансплантата в окружающие ткани. Монослой эндотелиоцитов значительно повышает тромборезистентность протеза сосуда и предотвращает развитие гиперплазии неоинтимы [2, 9]. Эндотелиальные клетки имеют высокую степень гетерогенности по функциям и структуре в разных типах сосудов и тканей, что необходимо учитывать при выборе источника клеток.

Ранее мы разработали способ получения и обогащения популяции эндотелиальных и гладкомышечных клеток из доступного послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека — миокарда выходного отдела правого желудочка [10].

В данном исследовании мы разработали эффективный метод получения тканеинженерных конструкций на основе мембран из PCL и хитозана, заселенных эндотелиальными клетками кардиальных эксплантов человека.

Материал и методы

Получение эндотелиальных клеток

Эндотелиальные клетки получали из послеоперационного материала миокарда выходного отдела правого желудочка человека с последующим культивированием и характеристикой *in vitro* и *in vivo* в соответствии с ранее разработанным нами протоколом [10]. Все пациенты перед операцией подписывали добровольное информированное согласие.

Получение мембран из смеси полимеров

Подготовка мембран из смеси хитозана и PCL для заселения клетками проводилась с использованием протоколов, ранее описанных в литературе [5–7], с модификациями. Готовили стоковые растворы 1 wt.% хитозана (Sigma-Aldrich, Исландия, степень

деацетилирования — 85%) в 0,5 М растворе уксусной кислоты и 10 wt.% PCL в ледяной уксусной кислоте; дальнейшие разведения PCL — также в ледяной уксусной кислоте. Смеси хитозана и PCL нужных соотношений готовили по следующей схеме:

PCL25 (PCL: хитозан 1:3) = 10 мл 0,1% PCL + 3 мл 1% хитозана

PCL50 (PCL: хитозан 1:1) = 10 мл 0,3% PCL + 3 мл 1% хитозана

PCL75 (PCL: хитозан 3:1) = 10 мл 0,9% PCL + 3 мл 1% хитозана.

Полученные смеси хитозана/PCL25, 50, 75 (PCL25, PCL50, PCL75) заливали на культуральные поверхности, выпаривали в конвекционной печи или термостате без конвекции при температуре 55–57°C в течение 24 ч. до образования пленки. Нейтрализацию мембран проводили двумя способами: 1) щелочью — 0,5 М NaOH (2% w/v) 30 мин.; 2) смесью щелочи и этанола — 0,5 М NaOH в 80% этаноле 30 мин., далее — 3 раза в 80% этаноле. Промывали мембраны в фосфатно-солевом буфере (PBS), оставляли под ультрафиолетом в течение 40 мин., помещали в CO₂-инкубатор при 5% CO₂.

Заселение и культивирование клеток на подложках

Количество заселяемых эндотелиальных клеток составляло $1 \times 10^5/4 \text{ см}^2$ в экспериментах по анализу пролиферации методом подсчета числа клеток и ХТТ; для анализа методом FACS — $1 \times 10^6/10 \text{ см}^2$. Клетки культивировали на подложках в среде EGM-2 (Lonza, США). Пассирование проводили с помощью трипсина или TrypLE Express (Life Technologies, Великобритания).

Анализ пролиферативных способностей клеток

Динамика пролиферации эндотелиальных клеток на разных типах подложек оценивалась методом подсчета количества клеток на 1, 8 и 12 сут. после заселения. Клетки предварительно метили прижизненным митохондриальным красителем TMRM (Life Technologies, США), в некоторых случаях — витальным ядерным красителем NucBlue (Life Technologies, США). Количество клеток подсчитывали в пяти случайных полях зрения на 10-кратном увеличении с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E (Япония), используя программное обеспечение NIS Advanced Research. Эксперимент проводился в трех повторностях.

ХТТ-тест

Для оценки пролиферации эндотелиальных клеток на подложках из смеси хитозана и PCL проводили ХТТ-тест по протоколу фирмы-производителя (Roche, США) через 22 ч. после добавления реагентов. Результат оценивали с помощью сканирующего спектрофотометра Perkin Elmer (2030 Multilabel Reader Victor X3, Финляндия) при длине волны 570 нм. Полученные значения коэффициента поглощения отражали количество жизнеспособных клеток в каждой лунке.

Анализ жизнеспособности клеток с помощью йодида пропидия и аннексина V

Жизнеспособность клеток на подложках из смеси PCL и хитозана оценивали через 24 ч. и 7 сут. после заселения с помощью набора Propidium Iodide/Annexin V*FITC (BioLegend, США) по протоколу фирмы-производителя. Мембраны с различными концентрациями PCL заселяли эндотелиальными

клетками. В качестве контроля использовали клетки на культуральном пластике без подложки. В контрольных точках наблюдения клетки снимали с поверхности с помощью TrypLE Express. Доли живых, апоптотирующих и некротизировавшихся клеток подсчитывали методом цитофлуорометрии для 10^4 событий с помощью прибора FACS Canto II (FACS Diva 7.0, США).

Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки, заселенные на подложках, фиксировали вместе с подложками в 4% PFA по стандартному протоколу, описанному ранее [10]. Анализировали клетки на инвертированном флуоресцентном микроскопе Nikon Ti-E (Япония) в программе NIS Advanced Research. В работе использовали следующие антитела: первичные: anti-human CD31 (DAKO, США, M0823); anti-fibronectin (Abcam, США, ab6328); anti-von Willebrand factor (Abcam, США, ab6994); anti-collagen IV (Life Span, США, LS-C79603), вторичные (Life Technologies, США): Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11008), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11011), Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11031), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11029). Окраску изолектином (Isolectin GS-IB4 from Griffonia simplicifolia, Alexa Fluor® 594 Conjugate) и витальным ядерным красителем TMRM проводили согласно протоколам фирм-производителей (Life Technologies, США).

Тест на сохранение эндотелиальными клетками функциональной способности формировать капилляроподобные структуры в матрикеле

Предварительно окрашенные витальным митохондриальным красителем TMRM клетки культивировали на подложках. Поверх клеток заливали слой матрикеля (Corning, США), разведенного ростовой средой в 2 раза. Образование капилляроподобных структур наблюдали через 1 сут. Изображения получали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Ti-E методом Z-стеков с использованием программного модуля 6D программы Advanced Research (Nikon, Япония).

Изготовление криосрезов

Клетки, заселенные на подложку из PCL75, фиксировали 4% PFA по вышеописанному протоколу. С помощью пинцета отделяли область подложки с клетками, помещали в Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura, Нидерланды), выполнение криосрезов толщиной 10 мкм проводили по стандартной методике, описанной ранее [10], на приборе Cryostat Microm HM 550 (Microm International GmbH, Германия) в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Статистический анализ

Для выявления статистической значимости различий между группами использовали U-критерий Манна – Уитни и критерий Пирсона в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты

Пролиферация и жизнеспособность эндотелиальных клеток на подложках из смеси PCL и хитозана

Физико-химические свойства мембран, изготовленных из смесей PCL и хитозана в разных процентных соотношениях, исследованы несколькими

группами авторов [3, 5–8, 11–14]. Мы применили описанные ранее протоколы изготовления смесей с небольшими модификациями. Мембраны, полученные нами с использованием конвекционной печи, обладали неомогенной структурой. Поэтому в данной работе для получения мембран мы применяли термостат без конвекции.

Существуют литературные данные о том, что на подложках из хитозана, нейтрализованного щелочью с этанолом, фибробласты мыши пролиферируют более эффективно, чем на подложках, нейтрализованных только щелочью [7]. Чтобы выяснить, имеют ли значение условия нейтрализации подложек из смеси PCL и хитозана для пролиферации клеток кардиальных эксплантов человека, в данной работе мы проанализировали динамику пролиферации клеток на исследуемых подложках в течение 12 сут. культивирования (рис. 1А–В). Полученные результаты показали, что нейтрализация подложек смесью щелочи и этанола дает преимущество перед обработкой только щелочью: различия в трех анализируемых временных точках для PCL25 были статистически значимы (рис. 1А). Литературные данные для хитозана были подтверждены аналогичным образом. Для PCL50 и PCL75 также прослеживалась указанная тенденция, однако достоверные различия при разных способах нейтрализации в этих случаях были зарегистрированы только на 8 и 12 сут. измерения. На подложках из PCL25 клетки пролиферировали более эффективно по сравнению с PCL50 и PCL75 при нейтрализации щелочью и этанолом. Статистическая значимость различий в данном случае подтверждалась в двух из трех выполненных экспериментальных повторениях для всех точек измерения (рис. 1Б–В). В случае нейтрализации только щелочью достоверно эффективная пролиферация на PCL25 по сравнению с PCL50 была показана только в одном повторении на 8 и 12 сут., по сравнению с PCL75 – на 1 и 8 сут. в двух и одном повторениях, соответственно. Не выявлено различий между количеством клеток в контрольных точках наблюдения на подложках PCL50 и PCL75 как при одном, так и при другом способе нейтрализации (рис. 1Б–В).

Таким образом, при формировании тканеинженерных конструкций с использованием эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека предпочтительнее применять смесь PCL25, нейтрализованную смесью щелочи и этанола. Также полученные данные свидетельствуют, что вне зависимости от способа нейтрализации подложек эндотелиальные клетки демонстрируют более эффективную пролиферацию на подложках из смеси PCL и хитозана по сравнению с подложками из 100% хитозана. При нейтрализации хитозановой подложки щелочью данный факт достоверно подтверждался на всех сроках наблюдения в двух или трех повторениях, при нейтрализации щелочью и этанолом – в двух повторениях на 1 и 8 сут. наблюдения. Таким образом, для дальнейших экспериментов мы использовали подложки, нейтрализованные щелочью и этанолом. Общая тенденция улучшения показателей пролиферации клеток на смеси PCL и хитозана по сравнению со 100% хитозаном была показана также методом ХТТ-анализа пролиферации клеток на подложках, нейтрализованных смесью щелочи и этанола, на 2, 5 и 8 сут. наблюдения (рис. 1Г). Метод основан на том, что жизнеспособные клетки посредством митохондриальных ферментов метаболизируют желтые

соли тетразолия в оранжевые соли формазана. Детектируемый коэффициент поглощения коррелирует с количеством жизнеспособных клеток. К 8 сут. наблюдения количество жизнеспособных клеток на PCL25 и PCL75 было достоверно большим по сравнению

с количеством клеток на хитозане (рис. 1Г). На подложках из смеси полимеров данный показатель был достоверно выше, чем на необработанной поверхности культурального пластика. Следует отметить, что для PCL25 такая тенденция наблюдалась уже к 6 сут.

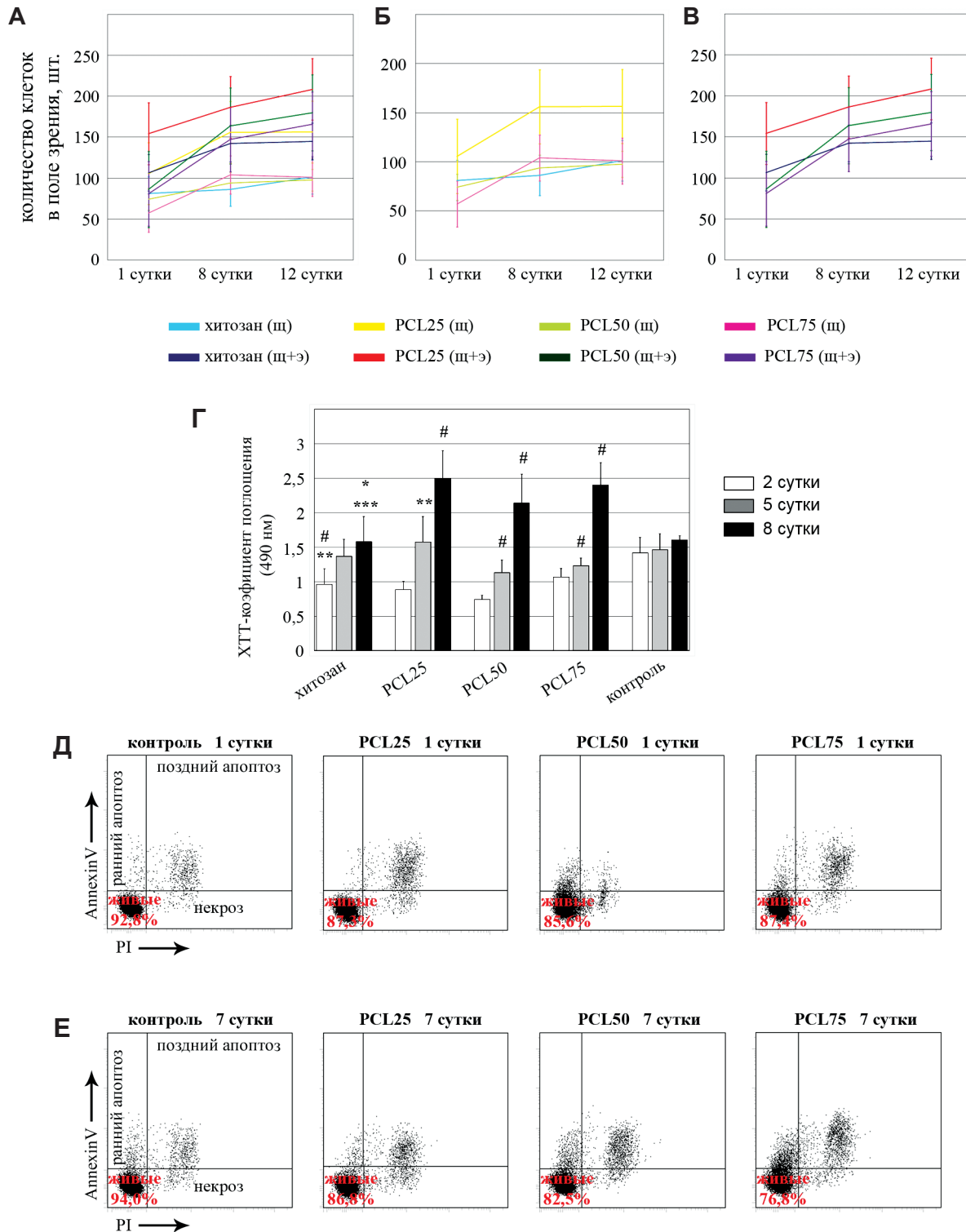


Рис. 1. Динамика пролиферации и жизнеспособность эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека на подложках с разным соотношением PCL и хитозана:

А – количество клеток в пяти случайных полях зрения на 1, 8, 12 сут. культивирования, (щ) – нейтрализация щелочью, (щ+э) – нейтрализация смесью щелочи и этанола;

Б – количество клеток в пяти случайных полях зрения на подложках, нейтрализованных щелочью;

В – количество клеток в пяти случайных полях зрения на подложках, нейтрализованных смесью щелочи и этанола;

Г – количество жизнеспособных клеток на 2, 5, 8 сут. культивирования по данным XTT-анализа;

Д, Е – доля жизнеспособных клеток, выявленная методом FACS, на 1 и 7 сут. культивирования

Таблица. Жизнеспособность эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека на подложках с разным соотношением PCL и хитозана

Тип подложки	Жизнеспособность	
	через 1 сут.	через 7 сут.
Культуральный пластик без подложки	92,8±0,3%	94,0±0,2%
PCL25	87,3±0,3%	86,8±0,3%*
PCL50	85,6±0,4%*	82,5±0,4%*
PCL75	87,4±0,3%	76,8±0,4%*#

* – различия по сравнению с культуральным пластиком без подложки статистически значимы, $p < 0,05$ относительно культурального пластика без подложки; # – различия по сравнению с PCL25 статистически значимы, $p < 0,025$.

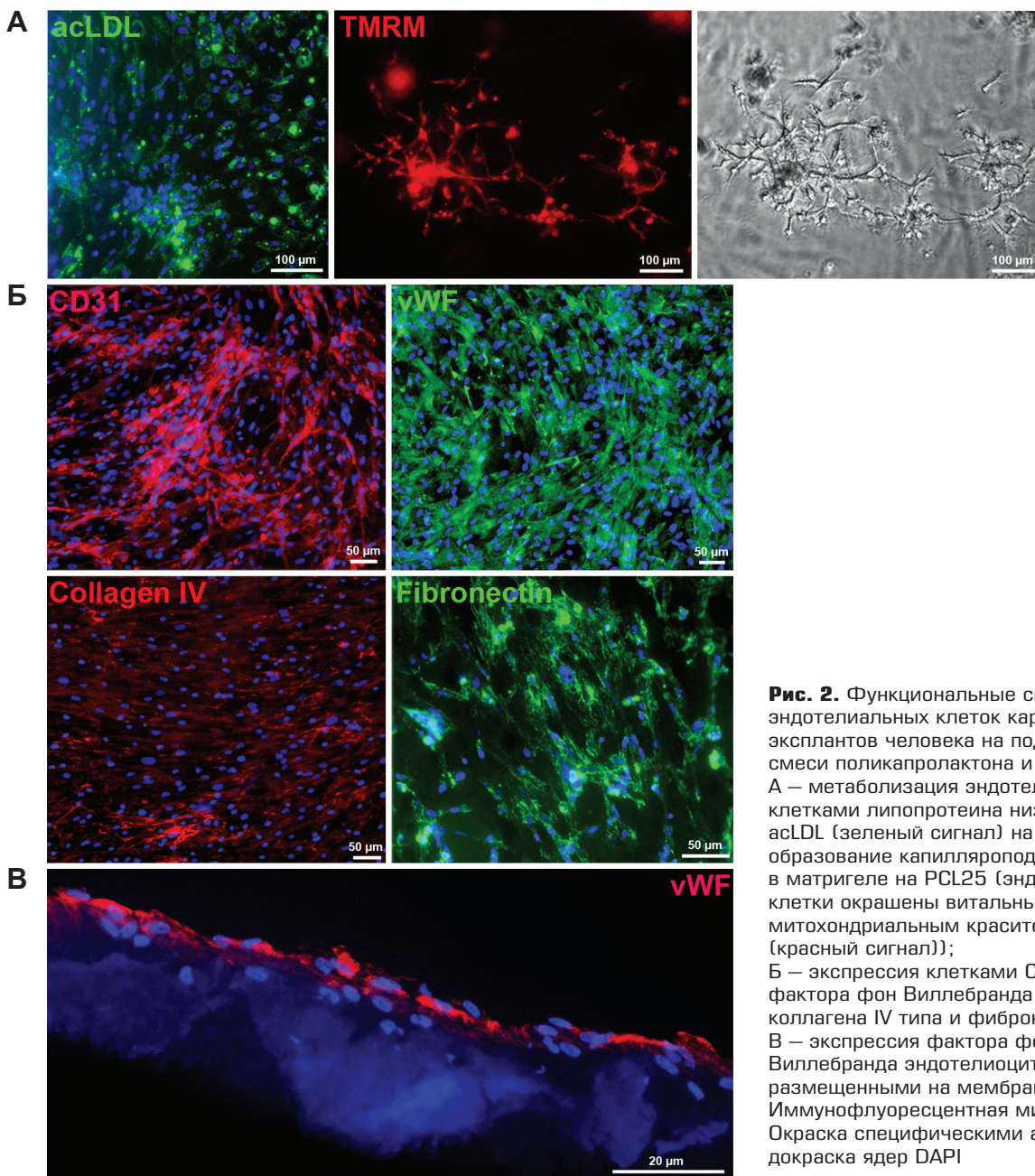


Рис. 2. Функциональные свойства эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека на подложках из смеси поликапролактона и хитозана: А – метаболизация эндотелиальными клетками липопротеина низкой плотности acLDL (зеленый сигнал) на PCL25, образование капиллярноподобных структур в матрикеле на PCL25 (эндотелиальные клетки окрашены витальным митохондриальным красителем TMRM (красный сигнал)); Б – экспрессия клетками CD 31, фактора фон Виллебранда (vWF), коллагена IV типа и фибронектина; В – экспрессия фактора фон Виллебранда эндотелиоцитами, размещенными на мембране из PCL75. Иммунофлуоресцентная микроскопия. Окраска специфическими антителами, докраска ядер DAPI

Кроме того, был проведен анализ жизнеспособности клеток с помощью окраски йодидом пропидия (PI) и аннексином V (Annexin V) (рис. 1Д) на исследуемых типах подложек из смеси PCL и хитозана через 1 и 7 сут. после заселения (табл.). Негативная по обоим маркерам популяция клеток является жизне-

способной. Через 1 сут. после заселения доля жизнеспособных клеток на PCL25 и PCL75 достоверно не отличалась от таковой на культуральном пластике без подложки. Несмотря на снижение жизнеспособности клеток на PCL50 (85,6±0,4%) по сравнению с контрольными условиями (92,8±0,3%), не обна-

ружено достоверных отличий в процентном содержании клеток на всех типах подложек. Через 7 сут. после заселения происходило снижение доли жизнеспособных клеток на всех трех типах подложек. При этом данный показатель был достоверно ниже на подложке из PCL75 ($76,8 \pm 0,4\%$) по сравнению с PCL25 ($86,8 \pm 0,3\%$). В остальных случаях не было достоверной разницы между подложками.

Функциональные свойства эндотелиальных клеток на подложке из смеси PCL и хитозана in vitro

Чтобы тканеинженерная конструкция имела свойства, максимально приближенные к физиологическим, и могла правильно интегрироваться в окружающие ткани, необходимо, чтобы клетки после заселения на матрикс сохраняли свои функциональные свойства. Поскольку наиболее оптимальные характеристики пролиферации и жизнеспособности клетки демонстрировали на подложке из PCL25, оценка сохранения функциональных свойств клеток проводилась именно на этом материале. Клетки, заселенные на PCL25, сохраняли специфические для эндотелия способности метаболизировать ацетилированную форму липопротеина низкой плотности и формировать капилляроподобные структуры в толще матрикса, залитого поверх клеток на подложке (рис. 2А). Клетки в составе исследуемой тканеинженерной конструкции экспрессировали специфические эндотелиальные маркеры: CD31 и фактор фон Виллебранда, а также нарабатывали компоненты межклеточного матрикса: фибронектин и коллаген 4 типа (рис. 2Б). Кроме того, на криосрезах заселенной тканеинженерной конструкции на основе PCL75 детектировался сформированный монослой эндотелиальных клеток, о чем свидетельствовала ярко выраженная окраска антителами к фактору фон Виллебранда (рис. 2В).

Обсуждение

На сегодняшний день актуальной задачей сосудистой хирургии остается разработка тканеинженерных трансплантатов сосудов малого диаметра. Одним из подходящих материалов в силу своих физико-химических и биосовместимых свойств рассматривается смесь синтетического и природного полимеров — PCL и хитозана. Для получения смеси исходные компоненты растворяются в уксусной кислоте, готовые полимерные мембраны нейтрализуют раствором щелочи. Для мембран, изготовленных из 100% хитозана, ранее было показано, что в зависимости от способа нейтрализации изменяется наноструктура волокон получившегося полимера, что, в свою очередь, влияет на топографию поверхности мембраны и адгезивные свойства заселяемых клеток [7]. Так, нейтрализация мембраны из хитозана раствором NaOH в 80% этаноле дает преимущества в адгезии и пролиферации фибробластов мыши по сравнению с нейтрализацией раствором NaOH в воде. Однако для смесей PCL и хитозана данный факт не исследовался. Также известно, что на динамику пролиферации клеток влияет соотношение компонентов смеси PCL и хитозана [5, 6].

В данной работе проанализирована динамика пролиферации и сохранение специфических функциональных свойств *in vitro* эндотелиальных клеток кардиальных эксплантов человека в составе тканеинженерных конструкций на основе смеси PCL

и хитозана. Смесь более благоприятна для пролиферации эндотелиальных клеток, чем 100% хитозан. Прослеживалась тенденция к увеличению пролиферативных показателей эндотелиальных клеток при нейтрализации раствором щелочи с этанолом по сравнению с водным раствором щелочи (рис. 1А). Таким образом, при формировании тканеинженерных конструкций, заселенных эндотелиальными клетками кардиальных эксплантов человека, предпочтительнее применять мембраны из PCL и хитозана, нейтрализованные смесью щелочи и этанола. Для дальнейших экспериментов мы использовали подложки PCL25, нейтрализованные щелочью и этанолом. Однако ускоренный темп пролиферации приводил к некоторому снижению жизнеспособности клеток к 7 сут. наблюдения (рис. 1Д). Вероятно, это связано с контактным торможением пролиферации при быстром достижении критической плотности клеточного слоя. Поэтому при разработке тканеинженерных конструкций на основе смесей PCL и хитозана, заселенных данным типом эндотелиальных клеток, необходимо подбирать оптимальное количество клеток и длительность культивирования конструкции *in vitro*.

Исходные функциональные характеристики данной клеточной популяции исследованы нами в предыдущей работе [10]. Одной из специфических функциональных характеристик эндотелиальных клеток является способность метаболизировать ацетилированную форму липопротеина низкой плотности. В данной работе показано сохранение клетками тканеинженерной конструкции на основе смеси PCL и хитозана в условиях *in vitro* специфических эндотелиальных маркеров: CD31 и фактора Фон Виллебранда, способности метаболизировать липопротеин низкой плотности, нарабатывать компоненты межклеточного матрикса, формировать капилляроподобные структуры в матриксе. Сохранение функциональных свойств клеток в составе тканеинженерной конструкции дает основание полагать, что заселение будет способствовать адекватной интеграции сосудистого трансплантата и, возможно, минимизировать негативные отделенные показатели. Так, в 2013 г. группой исследователей была продемонстрирована возможность использования материала, состоящего из смеси PCL и хитозана, для создания тканеинженерного сосуда малого диаметра (менее 6 мм). Нановолокна, применяемые для изготовления матрикса-носителя, получали путем электроспиннинга смеси данных полимеров, заселяли аутогенными мононуклеарными клетками периферической крови собаки и имплантировали в сонные артерии 6 животных. Гистологические и иммуногистохимические анализы тканеинженерных конструкций, изъятых через 3 мес., показали регенерацию эндотелия, а также наличие коллагена и эластина [8]. В работе по экспансии эндотелия роговицы крупного рогатого скота на мембранах, изготовленных из смеси PCL и хитозана методом выпаривания в конвекционной печи, авторы выявили хорошую пролиферативную активность и сохранение морфофункциональных свойств эндотелиальных клеток в составе конструкции [6].

Таким образом, тканеинженерные конструкции на основе PCL и хитозана, заселенные эндотелиальными клетками кардиальных эксплантов человека, могут быть основой для разработки функциональных трансплантатов со свойствами, максимально

приближенными к физиологическим, что позволит снизить негативные последствия, связанные с неадекватной работой сосудистого трансплантата в отдаленном периоде.

ЛИТЕРАТУРА:

1. G N., Tan A., Gundogan B. et al. Tissue engineering vascular grafts a fortiori: looking back and going forward. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2015; 15(2): 231-44.
2. Tara S., Rocco K.A., Hibino N. et al. Vessel bioengineering. *Circ. J.* 2014; 78(1): 12-9.
3. Wang T.J., Wang I.J., Lu J.N. et al. Novel chitosan-polycaprolactone blends as potential scaffold and carrier for corneal endothelial transplantation. *Mol. Vis.* 2012; 18: 255-64.
4. García Cruz D.M., Gomez Ribelles J.L., Salmerón Sánchez M. Blending polysaccharides with biodegradable polymers. I. Properties of chitosan/polycaprolactone blends. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2008; 85(2): 303-13.
5. Sarasam A., Madihally S.V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5500-8.
6. Young T.H., Wang I.J., Hu F.R. et al. Fabrication of a bioengineered corneal endothelial cell sheet using chitosan/polycaprolactone blend membranes. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2014; 116: 403-10.
7. He Q., Ao Q., Gong Y. et al. Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2011; 22(12): 2791-802.
8. Zhou M., Qiao W., Liu Z. et al. Development and in vivo evaluation of small-diameter vascular grafts engineered by outgrowth endothelial

Благодарности

Работа поддержана бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН № 0324-2015-0003 и грантом РФФИ № 14-04-00082.

cells and electrospun chitosan/poly(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 2014; 20(1-2): 79-91.

9. Wang H., Zhou J., Liu Z. et al. Injectable cardiac tissue engineering for the treatment of myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14(5): 1044-55.

10. Захарова И.С., Живень М.К., Саая Ш.Б. и др. Разработка клеточных технологий для создания клеточно-наполненных сосудистых трансплантатов. Патология кровообращения и кардиохирургия 2015; 19(4-2): 43-54.

11. Coimbra P., Ferreira P., de Sousa H.C. et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011; 48(1): 112-8.

12. Thuaksuban N., Nuntanaranont T., Pattanachot W. et al. Biodegradable polycaprolactone-chitosan three-dimensional scaffolds fabricated by melt stretching and multilayer deposition for bone tissue engineering: assessment of the physical properties and cellular response. *Biomed. Mater.* 2011; 6(1): 015009.

13. Thuaksuban N., Nuntanaranont T., Suttapreyasri S. et al. Biomechanical properties of novel biodegradable poly ϵ -caprolactone-chitosan scaffolds. *J. Investig. Clin. Dent.* 2013; 4(1): 26-33.

14. Yang W., Fu J., Wang D. et al. Study on chitosan/polycaprolactone blending vascular scaffolds by electrospinning. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2010; 6(3): 254-9.

Поступила: 04.03.2016