

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ПОСЕВА И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА БИОРАЗЛАГАЕМОЙ МАТРИЦЕ ИЗ L-ПОЛИЛАКТИДА

© Г. И. Попов,^{1,*} А. Е. Крюков,^{2,3} П. В. Попрядухин,^{2,3} Ю. А. Нащекина,^{3,4}
Е. М. Иванькова,^{2,3} В. Н. Вавилов,¹ В. Е. Юдин,^{2,3} Н. В. Смирнова^{2,3}

¹Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург, 197367,

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004,

³С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и

⁴Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: trek-4300@yandex.ru

В современной сердечно-сосудистой хирургии остаются нерешенными технологические проблемы, связанные с недостаточностью венозного материала для аутоотрансплантации. В связи с этим особую актуальность приобретает задача разработки сосудистых графтов малого диаметра, обеспечивающих стабильную проходимость. Возможным решением может стать создание тканеинженерного сосудистого имплантата (ТИСИ) на основе биоразлагаемой полимерной матрицы. Кроме структурно-функциональных особенностей скаффолда ключевыми этапами в разработке ТИСИ являются интеграция клеток с матрицей и культивирование клеточного материала. Цель настоящей работы заключалась в выявлении оптимальных методов посева и культивирования мезенхимных стволовых клеток жировой ткани крысы на трубчатой биоразлагаемой матрице из L-полилактида. Оценивали клеточную интеграцию с матрицей при выполнении статического, фильтрационного и вакуумного методов посева. Сравнивали результаты статического и динамического способов культивирования клеток на матрице после посева фильтрационным методом, разработанным нами. Показано, что этот метод посева в совокупности с динамическим культивированием наиболее эффективен и пригоден для дальнейшей разработки ТИСИ.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, матрица, L-полилактид, тканевая инженерия.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стволовые клетки, ЖТ — жировая ткань, ПЛА — полилактид, ТИСИ — тканеинженерный сосудистый имплантат.

В настоящее время использование нативного аутологичного материала в ходе реконструктивных сердечно-сосудистых операций остается золотым стандартом хирургических технологий. Количество оперативных вмешательств, в ходе которых необходимо замещать или шунтировать пораженные сосуды, достаточно велико (World health statistics, 2016). Для этих целей в клинике используют аутологичные артерии и вены, а также синтетические сосудистые протезы. Но используемые продукты не удовлетворяют в полной мере требованиям современной сердечно-сосудистой хирургии. Применение синтетических протезов сосудов чревато такими осложнениями, как ранний тромбоз вследствие отсутствия эндотелиальной выстилки. Довольно часто развивается стеноз зон анастомозов. Также велика опасность возникновения инфекции (Kannan et al., 2005). Вследствие низких показателей проходимости синтетические протезы сосудов непригодны для реконструкций артерий малого диаметра, например коронарных артерий и артерий голени (Leon, Greisler, 2003; Seifu et al., 2013).

Актуальными в настоящее время являются и задачи преодоления ограниченного количества аутовенозного

материала и высокой вероятности патологических изменений стенки аутолены до и после имплантации (Athanasios et al., 2011; Harskamp et al., 2013; Kim et al., 2013; Yazdani et al., 2013). Кроме того, возникают проблемы, связанные с необходимостью проведения повторных реконструктивных сосудистых операций в детской сосудистой хирургии. Это объясняется неспособностью резервируемых графтов к ремоделированию в растущем организме ребенка (Naito et al., 2011).

Решением может стать создание тканеинженерного сосудистого имплантата (ТИСИ), который, являясь искусственным сосудом, имитировал бы структуру и функции естественного сосуда, был бы чувствителен к нейрогуморальному воздействию со стороны организма реципиента.

В настоящее время разрабатывается целый ряд направлений создания ТИСИ, включая метод послойного использования клеточных пленок (Pesch et al., 2011), культивирование клеточного материала или на биodeградируемой, или на децеллюляризированной матрице (L'Heureux et al., 2007). Доказано, что технологии посева клеток являются ключевым моментом в разработке ТИСИ (Pei et al., 2002). В ряде исследований культивирование кле-

ток улучшало проходимость и долговечность ТИСИ (Pawlowski et al., 2004; Cho et al., 2005; Hashi et al., 2007), однако конкретный механизм образования новой сосудистой стенки как результат посева клеток до конца неясен.

К настоящему времени не выявлено зависимости между количеством культивируемых клеток и жизнеспособностью сосудистого графта. Считается, что залогом успеха являются равномерное распределение клеток в объеме матрицы, а также их оптимальная начальная концентрация. Равномерное распределение клеток позволяет сформироваться внеклеточному матриксу во всем объеме матрицы, что приводит к росту однородной функциональной ткани. Высокая эффективность посева, т. е. высокое соотношение числа прикрепленных клеток к числу посеянных, важна для быстрой регенерации тканей.

В настоящее время разработан разнообразный массив методик культивирования клеток на матрицах, но многие из них слишком длительны и трудно применимы в клинике (Parikh et al., 2000; Yow et al., 2006). Для масштабного производства ТИСИ малого диаметра необходим дешевый, надежный и эффективный способ посева (Ahsan, Nemet, 2005). Наиболее распространенным методом пока является статичный, в ходе которого концентрированная клеточная суспензия пассивно распределяется на матрице. Положительные качества этого способа, скорость и несложность вступают в противовес с целым рядом недостатков, такими как низкая эффективность посева и недостаточное распространение клеток в объеме матрицы. С целью преодоления этих недостатков были разработаны альтернативные варианты культивирования клеток, включая вакуумный, центробежный, электростатический и динамический (Solchaga et al., 2006; Soletti et al., 2006; Villalona et al., 2010).

Несмотря на то что процесс культивирования изучен для разных типов матриц и клеток, все имеющиеся исследования выполнены на определенной модели и не могут быть экстраполированы на другие. Поэтому целью настоящей работы было определение оптимальных методов посева и культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани (ЖТ) на трубчатой биоразлагаемой матрице из L-полилактида (ПЛА) малого диаметра. Кроме того, сравнивали известные методы посева клеток (статичный и вакуумный) с разработанным нами фильтрационным способом, а также результаты статичного и динамического культивирования клеток на матрице после фильтрационного посева.

Материал и методика

Получение матрицы из микроволокон ПЛА. Трубочатые матрицы на основе волокон ПЛА (мол. масса 50 кДа) получали методом электроформования из раствора ПЛА в хлороформе на лабораторной установке Nanop-01A (Япония). Раствор ПЛА в концентрации 15 % с помощью инжекторного насоса подавали через электрод-фильтру в электрическое поле при расстоянии между электродами 0.15 м, осаждение волокон происходило на цилиндрическом электроде. Скорость вращения цилиндрического электрода диаметром 1.1 мм составляла 1500 об/мин. Были получены трубчатые образцы с внутренним диаметром 1.1 мм и толщиной 320 мкм.

Исследование микроструктуры матрицы. Трубочатые матрицы на основе нановолокон из ПЛА изучали с помощью сканирующей электронной микроско-

пии. Для этого образцы промывали 0.1 М PBS (pH 7.4), после чего фиксировали в течение 20 мин 4%-ным раствором формальдегида в PBS. После удаления фиксирующего раствора образцы промывали PBS, высушивали на воздухе, прикрепляли их к предметным столикам и напыляли тонкий (~10 нм) слой платины, используя установку для катодного распыления Quorum Q150T ES. Изучение объектов проводили на аппарате Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 5 кВ.

Получение и культивирование первичной культуры МСК из ЖТ. Использовали традиционную методику селекции по адгезии к пластику (Zhu et al., 2013). Для выделения клеток использовали биологический материал одной взрослой лабораторной крысы-самца Вистар (255 г). Обращение с животным соответствовало правилам «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях». Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Под ингаляционной анестезией (3%-ный изофлуран) выделяли 0.3—0.5 мл ЖТ из передней брюшной стенки. ЖТ в чашке Петри механически гомогенизировали. Затем проводили энзиматическую диссоциацию клеток 0.2%-ным раствором коллагеназы I (Gibco, США) в растворе Хенкса в термощейкере (Biosan ES-20, Латвия) в течение 60 мин при 37 °С. После нейтрализации действия коллагеназы добавлением 10%-ной фетальной сыворотки крови телят (Gibco, США) суспензию центрифугировали 10 мин при 1.5 тыс. об/мин (настольная медицинская центрифуга ELMi CM-6M, Россия). Полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде α -MEM (Панэко, Россия), содержащей L-глутамин, 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все реактивы от Gibco, США), и культивировали в CO₂-инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, 3423, США) при 37 °С, 5 % CO₂ и повышенной влажности. Через 48 ч неприкрепленные клетки, форменные элементы крови и соединительнотканную строму удаляли двукратной отмывкой PBS. На 5-е сут клетки иммобилизовывали 0.05%-ным раствором трипсина (Gibco, США) и пересевали (1 пассаж). В дальнейшем культивирование МСК проводили в культуральных флаконах площадью 175 см² (Eppendorf) до получения монослоя 70%-ной субконфлюэнтности. Для экспериментов использовали клетки 3—8-го пассажей. Перед посевом МСК матрицы кондиционировали в культуральной среде в течение 1 ч.

Посев МСК на матрицу из L-полилактида выполняли статичным, вакуумным или фильтрационным методом, который разработан нами.

Статичный посев МСК и культивирование в статичных условиях. Интеграцию МСК с матрицей достигали нанесением суспензии клеток в полной ростовой среде (1 · 10⁶ МСК в 25 мкл) на образец матрицы (5 мм), при этом половину суспензии вводили в просвет графта, а вторую половину равномерно распределяли по наружной поверхности. Далее матрицу помещали в CO₂-инкубатор на 1 ч, при этом каждые 15 мин выполняли ее поворот на 90° вдоль продольной оси и дополнительное орошение питательной средой. Последующее культивирование проводили в пробирках-биореакторах в 10 мл среды в течение 1, 3 и 7 сут.

Вакуумный метод посева и культивирование в статичных условиях. Для такого посева

МСК использовали описанную методику (Tan et al., 2012) с определенными модификациями. В шприц объемом 3 мл помещали две матрицы длиной 5 мм, а также клеточную суспензию ($3 \cdot 10^6$ клеток в 0.2 мл полной питательной среды). Кроме того, в шприц забирали дополнительный объем воздуха (0.1 мл) и закрывали трехходовым краном. После этого производили оттягивание поршня шприца до отметки 3 мл с его удержанием в течение 10 с. Далее поршень возвращался в изначальное положение на 10 с. Процедуру повторяли 10 раз. Шприц закрывали антибактериальным фильтром с размером пор 0.22 мкм (Orange Scientific, Бельгия) и помещали в CO_2 -инкубатор на 1 ч. Затем матрицы помещали в CO_2 -инкубатор в пробирке-биореакторе с полной культуральной средой объемом 5 мл на сроки 1, 3 и 7 сут.

Культивировали МСК на ПЛА-матрице статичным и динамическим способами после фильтрационного посева.

Фильтрационный метод посева МСК и культивирование в статичных условиях. Производили временное пережатие одного конца матрицы пинцетом, а через второй конец, используя венозный катетер, подсоединенный к инсулиновому шприцу, вводили 1 мл полной культуральной среды, содержащей $2.0 \cdot 10^6$ МСК. Отфильтрованную среду собирали в пробирку и процедуру ее введения повторяли дважды. Таким образом, стенка матрицы играла роль фильтра. При этом наружный диаметр венозного катетера точно совпадал с внутренним диаметром матрицы. После этого матрицу в пробирке-биореакторе в 5 мл среды помещали в CO_2 -инкубатор на 1, 3, 7 и 14 сут.

Фильтрационный метод посева МСК ЖТ и культивирование в динамических условиях. После фильтрационного посева по описанной выше методике матрицу помещали в CO_2 -инкубатор на 1 ч. Далее матрицу фиксировали в камере биореактора на периферических венозных катетерах шовной нитью. Заполняли соединительные трубки культуральной средой (30 мл), предотвращая попадание воздуха в контур. В течение первых 3 ч скорость работы перистальтического насоса составляла 1 мл/ч, затем увеличивалась сначала до 20 мл/ч на 12 ч, а потом до 600 мл/ч. МСК культивировали на матрице в четырех (I—IV) режимах: I) 5 сут в динамических и 2 сут в статичных условиях; II) 7 сут в динамических условиях; III) 7 сут в динамических и 7 сут в статичных условиях; IV) 14 сут в динамических условиях.

По истечении срока культивирования во всех случаях матрицу трижды промывали PBS, собирая смывы в отдельную пробирку. Производили подсчет неприкрепившихся клеток в культуральной и промывочной средах с помощью автоматического счетчика клеток Countess II (Invitrogen, США).

Определение времени адгезии МСК к матрице. Для определения времени, необходимого МСК для прикрепления к исследуемой матрице из ПЛА, была поставлена серия экспериментов, в которых клетки высевали на матрицу при помощи фильтрационного метода и фиксированного числа МСК ($1.3 \cdot 10^6$ в 1 мл культуральной среды на 1 см матрицы). Далее матрицы с МСК помещали в CO_2 -инкубатор на 1, 2 или 3 ч. Затем трехкратно промывали просвет матрицы раствором PBS, окрашивали МСК в промывочной среде 0.4%-ным трипановым синим (Invitrogen, США) и считали их с помощью автоматического счетчика клеток Countess II (Invitrogen, США).

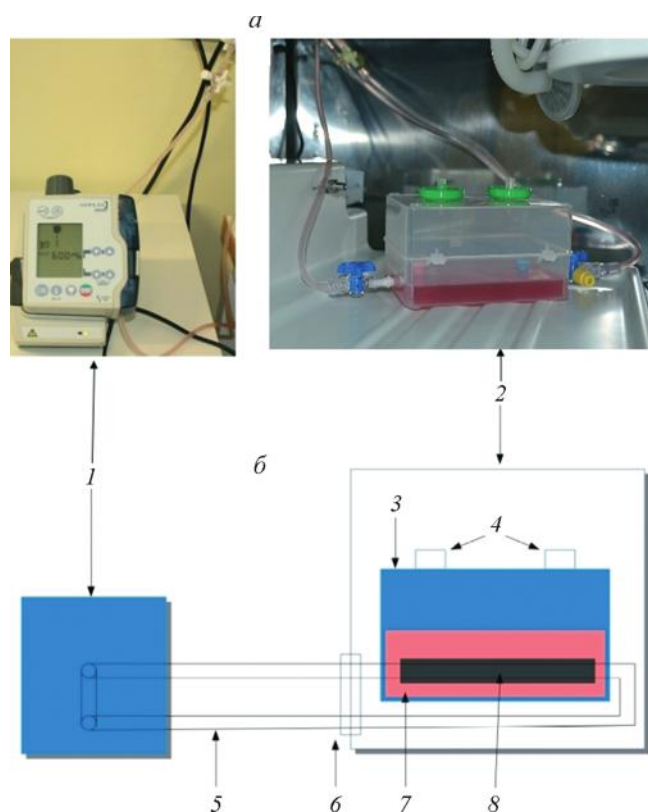


Рис. 1. Фотография (а) и схема (б) сконструированного биореактора.

1 — перистальтический насос, 2 — основная часть биореактора в CO_2 -инкубаторе, 3 — камера биореактора, 4 — антибактериальные фильтры, 5 — соединительные трубки, 6 — технологическое отверстие в CO_2 -инкубаторе, 7 — питательная среда, 8 — зафиксированная матрица.

Определение оптимального числа клеток для посева на 1 см матрицы. Клетки сеяли с помощью фильтрационного способа, описанного выше. Для посева использовали следующие количества клеток ($\times 10^6$): 0.5, 1.5, 2, 3 и 4 с последующей инкубацией в пробирке-биореакторе с полной культуральной средой объемом 5 мл в течение 1 ч. Затем протез трехкратно промывали раствором PBS и считали клетки как в исходной среде, так и в промывочной, как описано выше. Число прикрепившихся МСК рассчитывали вычитанием из общего числа посеянных клеток числа нефиксированных МСК в исходной среде и их числа в промывочной среде. Эффективность посева определяли как отношение числа адгезировавших клеток к их исходному числу, выраженному в процентах.

Устройство биореактора. Разработанный биореактор выполнен в виде системы с закрытым контуром (рис. 1). Это позволяет проводить постоянную перфузию питательной среды (7) через просвет матрицы (8). Биореактор состоит из камеры (3), перистальтического насоса (1) и соединительных полихлорвиниловых трубок (5). Камера биореактора изготовлена из прозрачного пластикового контейнера с герметично закрывающейся крышкой, на которой имеются газообменные отверстия, закрытые антибактериальными фильтрами (4) с размером пор 0.22 мкм (Orange Scientific, Бельгия). Камеру располагали внутри CO_2 -инкубатора, она служит резервуаром для питательной среды. Внутри камеры зафиксирована матри-

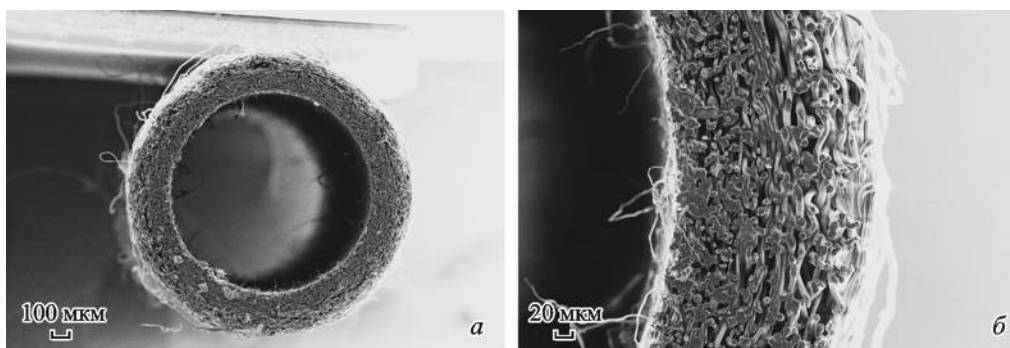


Рис. 2. Электронная микроскопия торца матрицы из ПЛА: поперечное сечение (а) и стенка матрицы (б).

ца. Она присоединена к двум венозным периферическим катетерам диаметром 1.1 мм. Рядом с CO₂-инкубатором расположен перистальтический насос (Applix Smart, Германия), от которого через технологическое отверстие инкубатора (б) проходят одноразовые стерильные соединительные трубки (5).

Флуоресцентная микроскопия. После необходимого срока культивирования клеток на матрице ее отмывали от питательной среды раствором PBS. Далее матрицу фиксировали 10 мин в 4%-ном растворе формальдегида в PBS. Отмывали от фиксатора раствором PBS в течение 10 мин. Для перфорации плазматической мембраны клетки инкубировали в течение 10 мин в 0.1%-ном растворе Тритона X-100 (Helicon, Россия) в PBS. Проводили отмывку аналогично предыдущей. Для визуализации ядер клетки окрашивали раствором DAPI в PBS (1 мкг/мл). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали в программе Microsoft Excel 2010. Результаты представлены как среднее арифметическое значение и его стандартное отклонение. Степень достоверности

межгрупповых различий средних значений оценивали с помощью парного *t*-теста Стьюдента с двухсторонним распределением (функция «СТЮДЕНТ ТЕСТ» в Microsoft Excel 2010). Нулевая гипотеза заключалась в равенстве исследуемых групп. Если результат *t*-теста был больше уровня значимости ($\alpha = 0.05$), различия в выборках считали достоверно не отличающимися друг от друга ($P < 0.05$).

Результаты и обсуждение

Структура биodeградируемой матрицы из L-полилактида. Методом электроспиннинга получена матрица из микроволокон ПЛА с внутренним диаметром 1.1 мм и толщиной стенки 320 мкм (рис. 2). Волокна диаметром 1.5—4 мкм в структуре матрицы располагаются хаотично, размеры пор между ними находятся в диапазоне 10—50 мкм. Такие значения сопоставимы с размерами МСК.

Время адгезии МСК к ПЛА-матрице. Подсчет МСК в промывочном растворе показал, что большая часть клеток прикрепляется к матрице в течение первого

Т а б л и ц а 1

Зависимость адгезии МСК от времени культивирования

Параметр	Время культивирования, ч		
	1	2	3
Число МСК в промывочном растворе ($\times 10^3$ кл.)	314 \pm 3	356 \pm 4	348 \pm 3
Выживаемость, %	95 \pm 2	93 \pm 3	96 \pm 2

Т а б л и ц а 2

Эффективность посева МСК на матрицу в зависимости от числа посеянных клеток

Параметр	Число посеянных МСК, $\times 10^6$				
	0.50 \pm 0.01	1.50 \pm 0.02	2.00 \pm 0.02	3.00 \pm 0.03	4.00 \pm 0.03
Эффективность, %	17	35	63	48	36
Доля живых клеток в промывочном растворе, %	75	58	54	85	90

Примечание. Эффективность посева определяли через 1 ч после посева как отношение числа адгезировавших клеток к их исходному числу, выраженному в процентах.

часа. При увеличении времени культивирования не происходит значимого нарастания числа прикрепившихся клеток (табл. 1). Следует отметить, что высокая выживаемость клеток сохранялась на всех исследуемых временных промежутках.

Концентрация МСК, оптимальная для посева. Как видно из представленных данных (табл. 2; рис. 3), с повышением концентрации МСК в среде при посеве происходит линейный рост числа прикрепившихся к матрице клеток, но только до определенного уровня. При исходном числе клеток более $2.0 \cdot 10^6$ значимого увеличения числа прикрепившихся клеток не происходит. Таким образом, оптимальным числом МСК в клеточной суспензии, используемой для посева клеток, является $2.0 \cdot 10^6$ на 1 см длины матрицы. Эффективность засева при этом составляет 63 %.

Интеграция МСК с матрицей после статичного посева и культивирования в статичных условиях. В результате пассивного посева, выполненного нанесением суспензии МСК на матрицу, не происходит равномерного распределения клеток. Через 1 сут большая часть клеток располагается отдельными локусами без существенного проникновения в глубь стенки графта (рис. 4, а). С увеличением времени не происходит распространения клеток в объеме матрицы

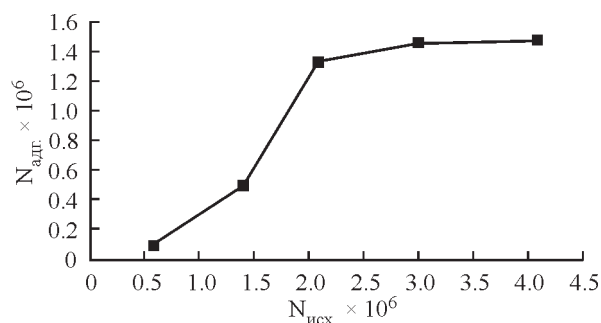


Рис. 3. Зависимость числа МСК, прикрепившихся к матрице ($N_{адг.}$), от их числа при посеве ($N_{исх.}$).

$N_{адг.}$ рассчитывали вычитанием из общего числа посеянных клеток числа нефиксированных МСК в исходной среде и их числа в промывочной среде.

(рис. 4, б). Через 7 сут культивирования внутренняя и в большей степени наружная поверхности графта неравномерно покрыты МСК без проникновения в глубь стенки матрицы (рис. 4, в).

Интеграция МСК с матрицей после вакуумного посева и культивирования в статичных условиях. При посеве МСК с использованием ва-

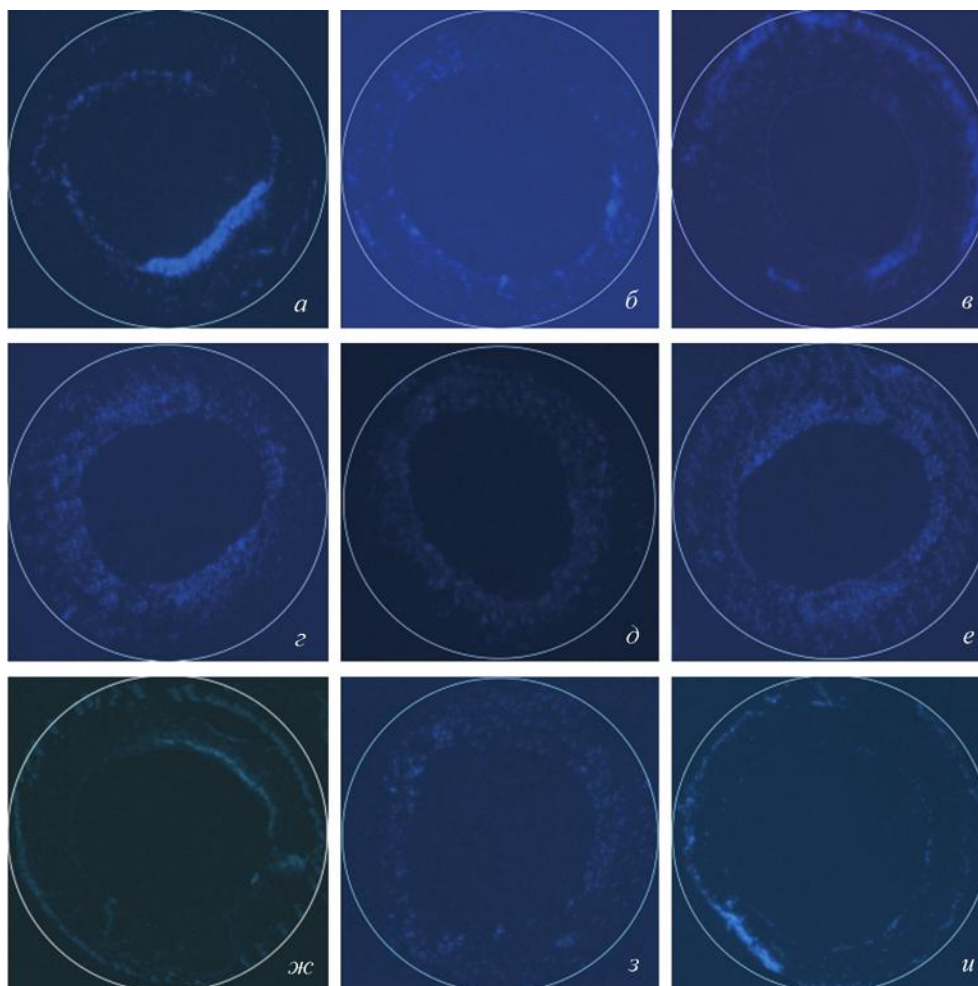


Рис. 4. Распределение клеток в матрице при разных способах их посева: пассивного (а—в), фильтрационного (г—е) и вакуумного (ж—и).

Распределение МСК через 1 (а, г, ж), 3 (б, д, з) и 7 (в, е, и) сут. Флуоресцентная микроскопия. Ядра клеток окрашены DAPI. Об. 2.5×.

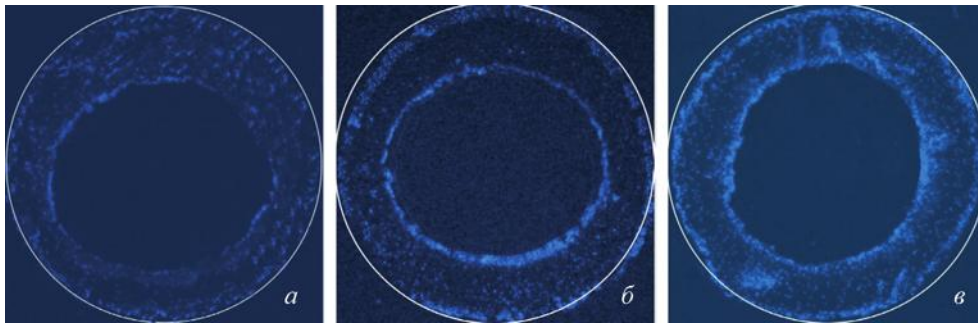


Рис. 5. Распределение МСК в матрице при разных режимах культивирования.

a — культивирование 5 сут в динамических и 2 сут в статичных условиях (режим I), *б* — 7 сут в динамических и 7 сут в статичных условиях (режим III), *в* — 7 сут в динамических условиях (режим II). Об. 2.5×.

куума клетки распределились в основном на внешней поверхности матрицы отдельными кластерами без значимого проникновения внутрь (рис. 4, *ж*). Через 3 сут культивирования происходит постепенное распространение клеток по внешней поверхности графта с незначительной инвазией вглубь (рис. 4, *з*). Значимого улучшения распределения клеток в сторону равномерности и проникновения в объем матрицы через 7 сут также не происходит (рис. 4, *и*).

Интеграция МСК с матрицей после фильтрационного посева и культивирования в статичных условиях. При посеве фильтрационным методом, в ходе которого стенка матрицы играла роль своеобразного фильтра для клеток, происходит существенное распределение МСК в объеме протеза. Через 1 сут регистрировали формирование градиента плотности клеток от максимальной на внутренней поверхности до минимальной на внешней поверхности графта (рис. 4, *д*). Постепенно, через 3 сут, снижается разница распределения клеток по плотности в толще матрицы (рис. 4, *д*), а через 7 сут сформированный вначале градиент плотности практически нивелируется за счет увеличения количества клеток на периферии стенки матрицы (рис. 4, *е*).

Интеграция МСК с матрицей после фильтрационного посева и культивирования в динамических условиях. Культивирование в динамических условиях приводит к однородному распределению

МСК в стенке матрицы. После 7-суточного воздействия пульсовой волны в режим I и II на внутренней поверхности графта определяется ровный слой клеток, стенка матрицы равномерно заселена клетками, а образованный ими внешний контур имеет гладкую структуру. При этом значимой разницы в распределении клеток между режимами I и II не наблюдали (рис. 5, *а, б*). При увеличении продолжительности культивирования в режиме III равномерное распределение клеток сопровождается увеличением их количества (рис. 5, *в*). Через 14 сут культивирования только в условиях пульсирующей волны (режим IV) также отмечено равномерное распределение клеток с высокой плотностью расположения в объеме матрицы. Максимальное количество клеток регистрировали на внутренней поверхности матрицы (рис. 6, *а*). Графт, инкубированный в статичных условиях после фильтрационного способа посева, характеризуется меньшей плотностью распределения клеток, в том числе без образования насыщенного клетками внутреннего слоя (рис. 6, *б*).

Итак, проведенное исследование *in vitro* показало биологическую совместимость трубчатой матрицы из ПЛА. Показано, что большая часть МСК из ЖТ прикрепляется к матрице в течение первого часа. Оптимальное количество клеток, необходимое для засева матрицы, составляет $2.0 \cdot 10^6$ на 1 см ее длины. Методика пассивного посева не способствует достаточному и равномерному

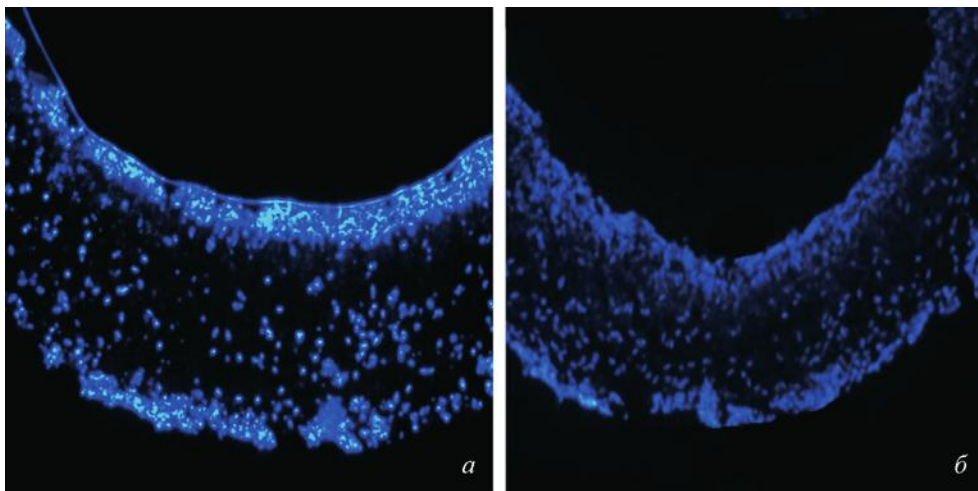


Рис. 6. Распределение МСК в матрице при культивировании в течение 14 сут в динамических (режим IV) (*а*) или статичных (*б*) условиях. Об. 10×.

распределению клеток в объеме матрицы. В результате вакуумного посева большинство клеток распределяется на внешней поверхности матрицы. Интеграция клеток с матрицей после фильтрационного способа посева, в ходе которого стенка матрицы выступает в роли своеобразного фильтра, является оптимальным технологическим решением. Такой метод позволяет решить проблему равномерного распределения клеток в объеме матрицы. В результате воздействия постоянной пульсовой волны в разработанном биореакторе происходит еще большее распределение МСК в матрице. При этом плотность клеточного слоя напрямую зависит от времени культивирования. Таким образом, совокупность фильтрационного способа посева клеток на матрицу и динамического культивирования оказалась наиболее эффективной и пригодной для дальнейшей разработки ТИСИ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-33-00003).

Список литературы

- Ahsan T., Nerem R. M. 2005. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthod. Craniofac. Res.* 8 : 134—140.
- Athanasioiu T., Saso S., Rao C., Vecht J., Grapsa J., Dunning J., Lemma M., Casula R. 2011. Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty years of competition — which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis. *Review Article. Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* 40 : 208—220.
- Cho S. W., Lim S. H., Kim I. K., Hong Y. S., Kim S. S., Yoo K. J., Park H. Y., Jang Y., Chang B. C., Choi C. Y., Hwang K. C., Kim B. S. 2005. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann. Surg.* 241 : 506—515.
- Harskamp R. E., Lopes R. D., Baisden C. E., de Winter R. J., Alexander J. H. 2013. Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions. *Ann. Surg.* 257 : 824—833.
- Hashi C. K., Zhu Y., Yang G. Y., Young W. L., Hsiao B. S., Wang K., Chu B., Li S. 2007. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 11 915—11 920.
- Kannan R. Y., Salacinski H. J., Butler P. E., Hamilton G., Seifalian A. M. 2005. Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 74 : 570—581.
- Kim F. Y., Marhefka G., Ruggiero N. J., Adams S., Whelan D. J. 2013. Saphenous vein graft disease: review of pathophysiology, prevention, and treatment. *Cardiol. Rev.* 21 : 101—119.
- L'Heureux N., Dusserre N., Marini A., Garrido S., de la Fuente L., McAllister T. 2007. Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4 : 389—395.
- Leon L., Greisler H. P. 2003. Vascular grafts. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 1 : 581—594.
- Naito Y., Shinoka T., Duncan D., Hibino N., Solomon D., Cleary M., Rathore A., Fein C., Church S., Breuer C. 2011. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 : 312—323.
- Parikh S. A., Edelman E. R. 2000. Endothelial cell delivery for cardiovascular therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42 : 139—161.
- Pawlowski K. J., Rittgers S. E., Schmidt S. P., Bowlin G. L. 2004. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci.* 1 : 1412—1421.
- Peck M., Gebhart D., Dusserre N., McAllister T. N., L'Heureux N. 2011. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs.* 195 : 144—158.
- Pei M., Solchaga L. A., Seidel J., Zeng L., Vunjak-Novakovic G., Caplan A. I., Freed L. E. 2002. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J.* 16 : 1691—1694.
- Seifu D. G., Purnama A., Mequanint K., Mantovani D. 2013. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat. Rev. Cardiol.* 10 : 410—421.
- Solchaga L. A., Tognana E., Penick K., Baskaran H., Goldberg V. M., Caplan A. I., Welter J. F. 2006. A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs. *Tissue Eng.* 12 : 1851—1863.
- Soletti L., Nieponice A., Guan J., Stankus J. J., Wagner W. R., Vorp D. A. 2006. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials.* 27 : 4863—4870.
- Tan L., Ren Y., Kuijper R. 2012. A 1-min method for homogeneous cell seeding in porous scaffolds. *J. Biomat. Appl.* 26 : 877—889.
- Villalona G. A., Udelsman B., Duncan D. R., McGillicuddy E., Sawh-Martinez R. F., Hibino N., Painter Ch., Mirensky T., Erickson B., Shinoka T., Breuer Ch. K. 2010. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue Eng. B: Reviews.* 16 : 341—350.
- World health statistics. 2016. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization. Geneva: WHO Press. 2016 : 64—121.
- Yazdani S. K., Otsuka F., Nakano M., Ladich E., Virmani R. 2013. Pathology of saphenous vein grafts. *Interv. Cardiol. Clin.* 2 : 241—249.
- Yow K. H., Ingram J., Korossis S. A., Ingham E., Homer-Vanniasinkam S. 2006. Tissue engineering of vascular conduits. *Br. J. Surg.* 93 : 652—661.
- Zhu M., Heydarkhan-Hagvall S., Hedrick M., Benhaim P., Zuk P. 2013. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J. Vis. Exp.* 79 : 50585.

Поступила 10 I 2018

DETERMINING OPTIMAL METHODS OF CELL SEEDING AND CULTIVATION
ON L-POLYLACTIDE BIODEGRADABLE SCAFFOLD

G. I. Popov,^{1,} A. E. Kryukov,^{2,3} P. V. Popryadukhin,^{2,3} Yu. A. Nashedkina,^{3,4} E. M. Ivankova,^{2,3}
V. N. Vavilov,¹ V. E. Yudin,^{2,3} N. V. Smirnova^{2,3}*

¹ Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197367,

² Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg, 199004,

³ Peter the Great St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, 195251, and

⁴ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: trek-4300@yandex.ru

Technological problems associated with a lack of venous material for bypass operations still exist in the modern cardiovascular surgery. Therefore, the problem of developing small-diameter vascular grafts, ensuring stable patency has particular interest. The possible solution is the creation of a tissue-engineered vascular implant (TEVI) based on a biodegradable polymer scaffold. As structural and functional features of the scaffold, cell integration and cultivation on the matrix are the key processes in the development of TEVI. The aim of this research is to identify the optimal method of mesenchymal stem cells integration and cultivation on the tubular biodegradable matrix from L-poly lactide. Comparison of static, vacuum, filtration methods of cell integration and maturing static, dynamic methods of cultivation were made. The proposed method of combining filtration method of cell integration and dynamic cultivation has proved its higher efficiency and is suitable for further development of TEVI.

Key words: mesenchymal stem cells, arix, L-poly lactide, tissue engineering.
