



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166>
УДК 616.1-77:[576.311.34:547.962]:57.085.23

Анализ эффективности различных белковых покрытий для оптимизации эндотелизации полимерных матриксов

Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.А. Сенокосова, М.Ю. Ханова,
Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Обоснование. В связи с постоянным увеличением количества операций по восстановлению кровотока в пораженных сосудах актуальна разработка синтетических протезов. Одним из ключевых факторов их успешности является повышение адгезионных свойств внутренней поверхности, поскольку быстрая эндотелизация сосудистых протезов считается фактором, необходимым для предотвращения тромбозов и гипертрофии неоинтимы.

Цель исследования: определить влияние модификации поверхности полимерных матриксов фибрином, фибронектином или коллагеном I типа на адгезию и жизнеспособность эндотелиальных клеток.

Методология и методы исследования. Исследовали полимерные матриксы, изготовленные методом электроспиннинга из смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактона). Образцы матриксов покрывали коллагеном I типа, фибронектином или фибрином. Затем на матриксы заселяли эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), культивировали 3 сут. В качестве контроля использовали немодифицированные матриксы и лунки культурального планшета. Жизнеспособность клеток оценивали сочетанной окраской Hoechst 33342 и этидий бромидом. Метаболическую активность клеток изучали с помощью МТТ-теста. Адгезию клеток анализировали по окрашиванию на F-актин. Статистический анализ результатов выполняли в программе GraphPrism 7.0.

Результаты. Установлено, что по количеству адгезированных клеток и их метаболической активности матриксы с коллагеном не отличались от немодифицированных. Покрытие фибронектином продемонстрировало более высокие показатели адгезии клеток к поверхности. Однако достаточно высокий уровень гибели клеток в этой группе указывает на то, что подобная модификация не может в полной мере обеспечить нормальное функционирование клеток. Наконец, наилучшие результаты мы наблюдали при использовании фибринового покрытия, которое по показателям адгезии и жизнеспособности эндотелиальных клеток было сравнимо с культуральным пластиком.

Заключение. Модификация поверхности полимерных матриксов фибрином позволяет значительно улучшить их адгезионные свойства и может быть использована при разработке полимерных протезов сосудов малого диаметра.

Ключевые слова:	тканевая инженерия, протезы сосудов малого диаметра, электроспиннинг, фибрин, эндотелиальные клетки.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации № 075-15-2022-1202 от 30 сентября 2022 г., заключенного в целях реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р.
Для цитирования:	Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Кривкина Е.О., Антонова Л.В. Анализ эффективности различных белковых покрытий для оптимизации эндотелизации полимерных матриксов. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):160–166. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166 .

Analysis of the effectiveness of various protein coatings for optimizing the endothelialization of polymer matrices

Elena A. Velikanova, Vera G. Matveeva, Evgeniya A. Senokosova,
Mariam U. Khanova, Evgeniya O. Krivkina, Larisa V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Background. Due to the constant increase in the number of surgeries to restore blood flow in the affected vessels, the development of synthetic prostheses is relevant. One of the key success factors is an increase in the adhesive properties of the inner surface, since the rapid endothelialization of vascular prostheses is considered a factor necessary to prevent thrombosis and neointimal hypertrophy.

Aim: To determine the effect of surface modification of polymer matrices with fibrin, fibronectin, or type I collagen on the adhesion and viability of endothelial cells.

Material and Methods. Polymer matrices prepared by electrospinning from a mixture of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) were studied. Matrix samples were coated with type I collagen or fibronectin or fibrin. Then, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were colonized on the matrices and cultured for 3 days. Unmodified matrices and culture plate wells were used as controls. Cell viability was assessed by combined staining with Hoechst 33342 and ethidium bromide. The metabolic activity of the cells was studied using the MTT test. Cell adhesion was analyzed by staining for F-actin. Statistical analysis of the results was performed using the GraphPrism 7.0 program.

Results. It was found that the number of adherent cells and their metabolic activity of matrices with collagen did not differ from unmodified ones. Coating with fibronectin demonstrated higher rates of cell adhesion to the surface. However, a rather high level of cell death in this group indicates that such a modification cannot fully ensure the normal functioning of cells. Finally, we observed the best results when using a fibrin coating, which was comparable to culture plastic in terms of adhesion and viability of endothelial cells.

Conclusion. Modification of the surface of polymer matrices with fibrin can significantly improve their adhesive properties and can be used in the development of polymer prostheses for small-diameter vessels.

Keywords:	tissue engineering, small-diameter vessel prostheses, electrospinning, fibrin, endothelial cells
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest
Financial disclosure:	The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Agreement on the provision of grants from the federal budget in the form of subsidies in accordance with paragraph 4 of Article 78.1 of the Budget Code of the Russian Federation № 075-15-2022-1202 dated September 30, 2022, concluded to implement the Order of the Russian Federation Government dated May 11, 2022 No. 1144-r.
For citation:	Velikanova E.A., Matveeva V.G., Senokosova E.A., Khanova M.U., Krivkina E.O., Antonova L.V. Analysis of the effectiveness of various protein coatings for optimizing the endothelialization of polymer matrices. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):160–166. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-160-166 .

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности в мире; по прогнозам их встречаемость к 2030 г. возрастет до 23,3 млн [1]. При этом ряд широко распространенных заболеваний и патологических состояний связаны с нарушением проходимости кровеносных сосудов. Золотым стандартом хирургического лечения в таких случаях является использование аутологических вен в качестве шунтов [2]. Однако у значительной части пациентов по разным причинам, таким как сопутствующие заболевания или отсутствие подходящего для шунта сосуда, нет возможности проведения подобной операции с использованием собственного сосуда [3]. Таким образом, актуальным остается вопрос разработки

синтетических протезов, в том числе малого диаметра (до 6 мм).

Наиболее перспективным направлением разработки протезов сосудов представляется тканевая инженерия. В основе лежит идея о конструировании каркаса из биосовместимого материала, который служит базой для заселения клетками и последующего воссоздания на месте такого протеза аналога нативного сосуда [4].

В рамках подходов к решению этого вопроса рассматриваются различные варианты заселения матриц клетками: *in vitro*, с дооперационным культивированием клеточно-заселенных протезов, *in vivo* и *in situ*, с идеей привлечения клеток в матрикс непосредственно в живом организме и управления этим процессом с помощью биологически активных молекул [5]. Но независимо от

выбранного подхода, в большинстве случаев исследователи встают перед необходимостью модификации внутренней поверхности сосудистого протеза для увеличения адгезии эндотелиальных клеток. Это крайне важный аспект разработки протеза сосуда малого диаметра, поскольку наиболее частыми осложнениями, связанными с имплантацией такого протеза, являются тромбозы и гиперплазия неоинтимы [2]. Предполагается, что быстрая эндотелизация внутренней поверхности позволит предотвратить такие проблемы [6], что возвращает к необходимости разработки покрытия, которое способно максимально поддерживать адгезию, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток.

В настоящем исследовании для модификаций полимерных матриц мы использовали белки, которые широко применяются в том числе в культуральной практике для улучшения адгезивных свойств поверхности, а именно коллаген I типа, фиброноген и фибрин. В различных исследованиях были показаны хорошие перспективы использования данных покрытий в тканевой инженерии сосудов. Так, в работах [7] и [8] показано значимое усиление эффективности реэндотелизации децеллюляризованных аорты и клапана после покрытия их фибронектином, W. Flameng и соавт. получили аналогичные результаты при использовании фибрина [9]. В нашей работе мы провели сравнительный анализ эффективности этих видов покрытий в отношении улучшения адгезии эндотелиальных клеток на поверхности полимерных матриц.

Цель работы: определить эффективность модификации поверхности полимерных матриц фибрином, фибронектином или коллагеном I типа для улучшения адгезии и поддержания жизнеспособности эндотелиальных клеток.

Материал и методы

Изготовление матриц

Полимерные матрицы изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanop-01A (MECC, Япония) из смеси поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (Sigma-Aldrich) и поли(ε-капролактона) (Sigma-Aldrich) в соотношении 1 : 2. В качестве растворителя использовали 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich). Матрицы изготавливали с использованием иглы калибра 27G, при следующих параметрах электроспиннинга: напряжение на игле составляло 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,3 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора – 15 см. Полученные матрицы подвергали стерилизации этиленоксидом.

Из полученного матрикса вырезали образцы, которые помещали на дно лунок 24-луночного культурального планшета, затем проводили процедуру модификации поверхности.

Модификация коллагеном

Изготавливали раствор бычьего коллагена I типа (A10644-01, Invitrogen) в 0,02M уксусной кислоте в концентрации 5 мг/мл. Полученный раствор заливали в лунки планшета с матриксами, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли, трижды промывали лунки с матриксами фосфатно-солевым буфером и высушивали.

Модификация фибронектином

Изготавливали рабочий раствор фибронектина крыс в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мг/мл. Готовый раствор заливали в лунки планшета с матриксами, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли и высушивали матрицы.

Модификация фибрином

Фибрин выделяли из сыворотки крови условно здоровых доноров. Подробно процедура получения фибрина описана в нашем раннем исследовании [10].

Культура клеток

Для проведения эксперимента использовали эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC), выделенные ранее на базе нашей лаборатории. Клетки культивировали в среде MDCB 131 с добавками для эндотелиальных клеток. Пассажи культуры проводили по достижении 70% конфлюэнтности, клетки снимали с поверхности раствором трипсина-ЭДТА (15400054, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в концентрации 0,025%. Все манипуляции проводили в стерильных условиях, клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора при 37,0 °C 5% CO₂.

Для оценки адгезионных свойств модифицированных матриц HUVEC засевали на образцы матриц, покрытых коллагеном, фибронектином или фибрином в количестве 50 000 клеток на образец. В качестве контроля использовали клетки, культивированные на немодифицированных матрицах, а также в лунках культурального планшета.

Таким образом, в эксперименте использовали следующие группы:

- HUVEC, культивированные в лунке культурального планшета (CONTROL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса без модификации поверхности (PHBV/PCL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного коллагеном (PHBV/PCL-COL);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного фибронектином (PHBV/PCL-FN);
- HUVEC, культивированные на образцах полимерного матрикса, модифицированного фибрином (PHBV/PCL-FIBRIN).

Клетки на матрицах и пластике культивировали в стандартной культуральной среде в течение 3 сут. После окончания эксперимента проводили оценку жизнеспособности клеток методом флуоресцентной микроскопии, оценку метаболической активности клеток – с помощью МТТ-теста и окрашивание на F-актин для анализа адгезии клеток к поверхности.

Флуоресцентная микроскопия

Клетки на поверхности матрикса окрашивали ядерным красителем Hoechst (14533, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в концентрации 10 мг/мл в течение 10 мин. Затем к клеткам добавляли раствор этидиум бромид (46067, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich, USA, St. Louis, MO) в концентрации 30 мг/мл, окрашивали в течение еще 2 мин и затем анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioObserver (Zeiss). Анализировали по 3 образца из каждой группы, по 10 случайно выбранных полей

зрения с каждого образца на увеличении $\times 200$. Оценивали количество живых и мертвых клеток, пересчитывали на 1 мм^2 площади поверхности.

MTT-тест

Метаболическую активность клеток изучали с помощью MTT-теста (Abscam, UK). Для этого в лунки планшета с культивированными на поверхности матрикса клетками вносили реагент в соответствии с протоколом производителя и инкубировали в течение 4 ч в условиях CO_2 -инкубатора. Затем культуральную среду с прореагировавшим реагентом переносили в лунки 96-луночного планшета и считывали оптическую плотность (ОП) на анализаторе Multiskan Sky при $\lambda 570/605 \text{ нм}$. Из каждой группы анализировали по 3 образца. Контроль измерения проводили по пустой лунке (ОПконтр). ОП каждого образца рассчитывали по формуле:

$$\text{ОП} = \text{ОП}_{570} / \text{ОП}_{605} - \text{ОП}_{\text{контр}}.$$

Конфокальная микроскопия

Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание на VE-кадгерин и F-актин. Для этого клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин, затем проводили пермеабиллизацию 0,1% раствором X-100 в течение 15 мин. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (vWF, F-актин) проводили пермеабиллизацию 0,01% раствором Triton X-100. Для блокировки неспецифического связывания использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере (BSA/PBS). После этого наносили на образцы первичные антитела кролика к CD144 человека (ab33168, Abscam) и инкубировали в течение ночи при 4°C . Затем после отмывки в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% Tween-20, на образцы наносили антитела осы к IgG кролика, конъюгированные с AF488 (A11034, Invitrogen) и фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Alexa FluorTM 568 Phalloidin, A12380, Thermo Fisher), инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Образцы докрашива-

ли ядерным красителем DAPI. Готовые стекла заключали в ProLong (Life Technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов выполняли в программе GraphPrism 7.0 (Graph Pad Software). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова – Смирнова. Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q_{25} ; Q_{75})). Для оценки статистической значимости отличий между группами использовали критерий Краскела – Уоллиса и апостериорный критерий Данна для парных сравнений. За критический уровень значимости принимали $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка жизнеспособности клеток

По результатам анализа плотности клеточных культур на образцах матрикса было показано, что в отношении адгезии клеток к поверхности покрытие коллагеном оказалось наименее эффективным из всех представленных: не было обнаружено значимых различий в количестве HUVEC на матриксах PHBV/PCL и PHBV/PCL-COL (рис. 1А). Покрытие фибронектином способствовало более эффективной адгезии и пролиферации HUVEC на поверхности матрикса, для этой группы наблюдали значимое увеличение количества клеток по сравнению с немодифицированным матриксом ($268,8$ ($169,8$; $346,1$) $\text{ед}/\text{см}^2$ против $160,4$ ($88,87$; $228,3$) $\text{ед}/\text{см}^2$, $p = 0,001$). Наилучшие результаты среди выбранных вариантов модификации поверхности продемонстрировало фибриновое покрытие. В этой группе наблюдали выраженное увеличение количества адгезированных клеток ($407,5$ ($352,6$; $434,2$) $\text{ед}/\text{см}^2$), значимо отличающееся от всех групп матриц ($p = 0,001$).

Для более углубленного анализа способности представленных образцов матриц сохранять жизнеспособность клеток на их поверхности изучили соотношение живых и мертвых клеток (рис. 1В).

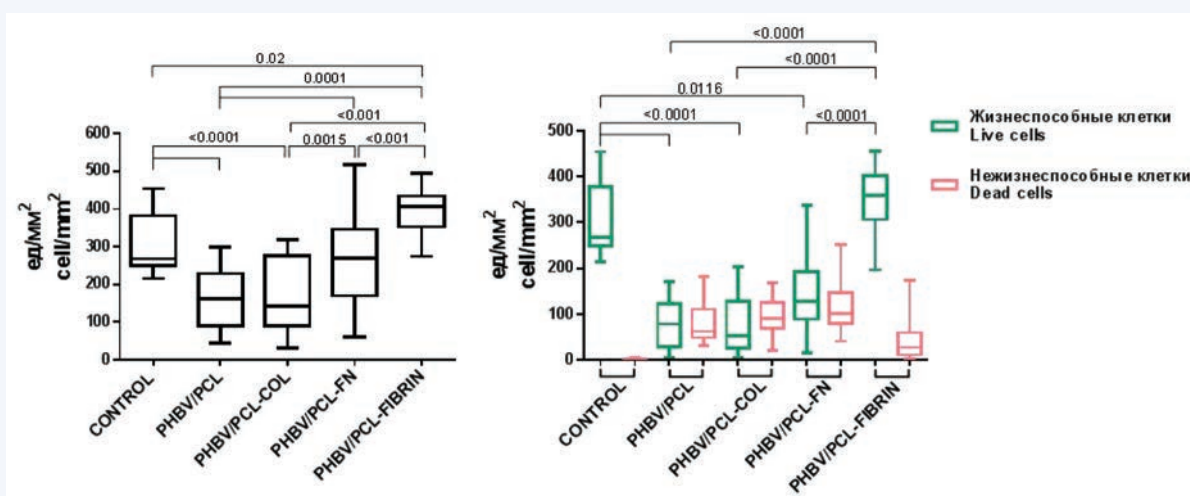


Рис. 1. Оценка плотности клеточной культуры (А) и жизнеспособности HUVEC (В), адгезировавших на поверхности полимерных матриц и культурального пластика. На диаграмме представлены медианы, 25-й и 75-й процентиля, минимальные и максимальные значения показателя. Значения p приведены над скобками

Fig. 1. Evaluation of cell culture density (A) and viability of HUVEC (B) adhering to the surface of polymer matrices and culture plastic. The diagram shows medians, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum values. The p values are given above the brackets

В целом полученные результаты соотносились с данными о плотности клеточной культуры на поверхности образцов. Однако при статистически значимом увеличении количества клеток на поверхности PHBV/PCL-FN мы не наблюдали аналогичной разницы в жизнеспособности клеточной культуры. Достаточно высокий уровень погибших клеток в этой группе (101,2 (80,20;147,4) ед/см²) позволяет предположить, что хотя покрытие фибронектином успешно создает условия для эффективного прикрепления клеток к поверхности, подобная модификация не может в полной мере обеспечить нормальное функционирование клеток. Как и в случае с плотностью культуры, наилучшие результаты мы наблюдали в группе PHBV/PCL-FIBRIN. Количество живых клеток на поверхности этих матриц в несколько раз превышало значения, полученные с остальных матриц. С учетом достаточно низкого уровня гибели клеток фибриновое покрытие было сравнимо с культуральным пластиком в отношении адгезии и пролиферации клеток на поверхности.

Аналогичные результаты были получены при анализе метаболической активности клеток (рис. 2). Наихудшие значения наблюдали у группы PHBV/PCL; показатели матриц PHBV/PCL-COL были несколько выше, однако значимо не отличались от немодифицированных матриц. Метаболическая активность матриц PHBV/PCL-FN была значимо выше по сравнению с PHBV/PCL ($p = 0,0013$); при модификации матриц фибрином наблюдали еще большее увеличение показателя ($p < 0,0001$ по сравнению с PHBV/PCL). Интересно, что метаболическая активность в группе PHBV/PCL-FIBRIN превышала даже показатели клеток на культуральном пластике.

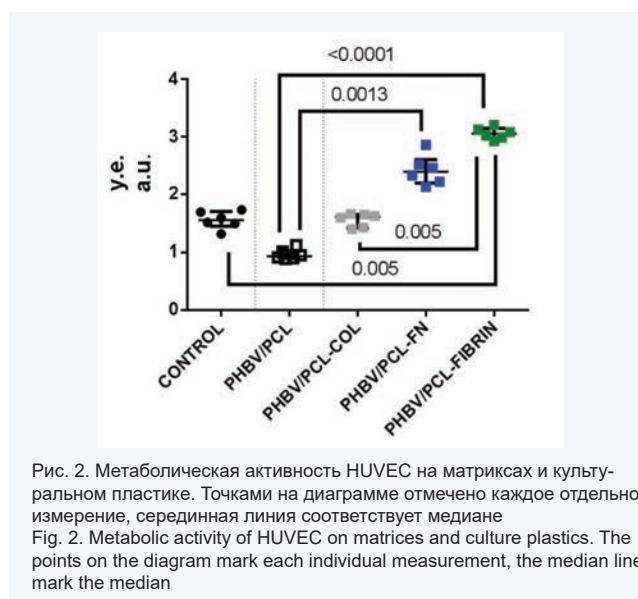


Рис. 2. Метаболическая активность HUVEC на матрицах и культуральном пластике. Точками на диаграмме отмечено каждое отдельное измерение, середина соответствует медиане
Fig. 2. Metabolic activity of HUVEC on matrices and culture plastics. The points on the diagram mark each individual measurement, the median line mark the median

Очевидно, что при увеличении количества клеток будут получены более высокие значения поглощения формазана в этом тесте, поэтому можно было ожидать, что результаты в группе PHBV/PCL-FN будут выше, чем в других экспериментальных группах. Тем не менее полученные результаты позволяют также судить о сохранении высокого уровня функциональной активности клеток, адгезировавших на фибриновом покрытии.

На основе окрашивания клеток на F-актин проводили анализ адгезии HUVEC к поверхности (рис. 3).

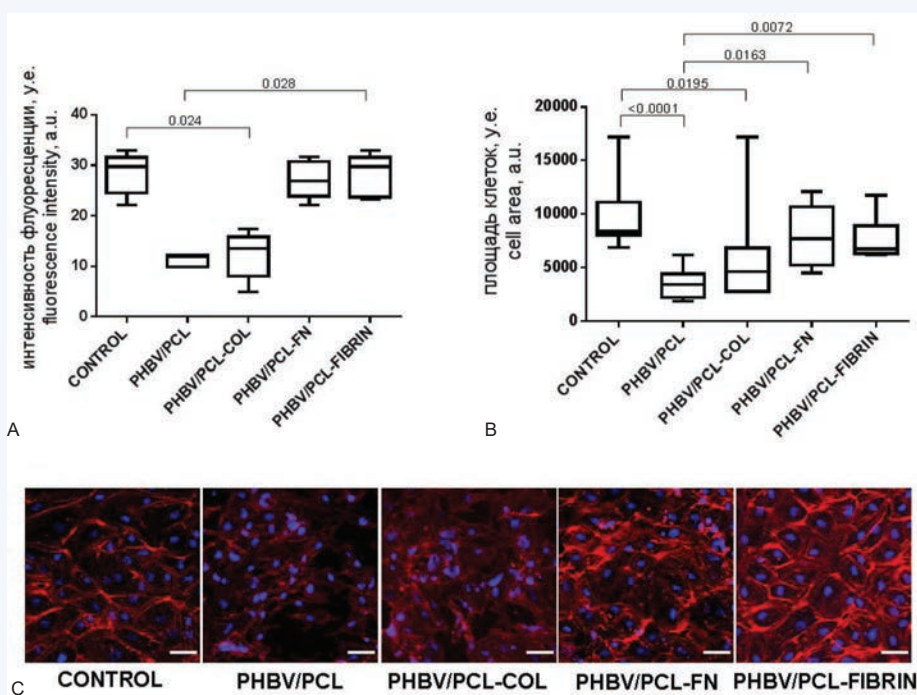


Рис. 3. Адгезия HUVEC на полимерных матрицах и культуральном пластике. А – интенсивность флуоресцентного сигнала F-актина, В – площадь клеток, С – конфокальная микроскопия, репрезентативные микрофотографии; масштабная линейка 50 мкм. На диаграмме представлены медианы, 25-й и 75-й проценти, минимальные и максимальные значения показателя. Значения p приведены над скобками
Fig. 3. Adhesion of HUVEC on polymer matrices and culture plastic. A – fluorescent intensity of F-actin, B – cell area, C – Representative confocal microscopy images; scale bar = 50 μ m. The diagram shows medians, 25th and 75th percentiles, minimum and maximum values. The p values are given above the brackets

В качестве исследуемых показателей использовали интенсивность флуоресцентного сигнала, которая характеризовала выраженность в клетках актиновых филаментов, а также площадь клеток на матриксе, поскольку степень расплывчатости адгезионных клеток напрямую зависит от эффективности прикрепления к субстрату.

Было выявлено, что по количеству F-актина в клетке образцы групп PNBV/PCL-FN и PNBV/PCL-FIBRIN значительно превосходят остальные матриксы; при этом между этими группами отличий не наблюдали (рис. 3А).

По площади HUVEC в группах PNBV/PCL-FN и PNBV/PCL-FIBRIN также значительно превышали остальные группы, значимо ($p = 0,0001$) отличаясь от PNBV/PCL (7700 (5245;10675), 6760 (6315;8898) и 3427 (2198;4392) у.е. соответственно) (рис. 3В). В группе PNBV/PCL отмечали значительную гетерогенность в площади прикрепленных клеток, что в сочетании с общей неравномерностью распределения клеток по поверхности указывало на неэффективность покрытия. Аналогично, неравномерно распределялись клетки на поверхности матриксов PNBV/PCL (рис. 3С).

Коллаген является наиболее ранним и часто используемым биополимером в тканевой инженерии [11]. Столь широкое распространение в этих целях обусловлено его низкой иммуногенностью и хорошей биосовместимостью [12], а также способностью стимулировать клеточную адгезию [13]. Тем не менее в нашем исследовании из коллагена I типа не удалось сформировать эффективное адгезионное покрытие на поверхности полимерного матрикса. С учетом того, что способность коллагена I типа формировать субстрат с высокими адгезионными свойствами не вызывает сомнений, можно предположить, что в нашей работе не достигнуто достаточного связывания коллагеновой пленки с матриксом. Возможно, в этом случае требуется проведение дополнительной обработки для химической сшивки коллагена с полимером матрикса.

Фибриноген не обладает достаточными механическими свойствами, чтобы использовать его в качестве самостоятельного каркаса, однако он находит свое применение в тканевой инженерии как адгезирующее покрытие, так как несет на себе сайты клеточной адгезии [14]. В нашем исследовании фибриноген и фибрин успешно формировали фидерный слой на матриксах, значительно увеличивая адгезию эндотелиальных клеток, обеспечивая равномерное заселение клетками поверхности и формирование эндотелиального монослоя. Однако выживаемость клеток на PNBV/PCL-FN была несколько ниже, чем на PNBV/PCL-FIBRIN, что заставляет отдавать предпочтение именно фибриновому покрытию.

По популярности при использовании для нужд тканевой инженерии фибрин не уступает коллагену. Он также обладает высокой биосовместимостью и нетоксичностью [15]. Также его волокна содержат сайты клеточной адгезии [16], что обеспечивает способность поддерживать адгезию, пролиферацию и жизнеспособность клеток на поверхности. Кроме того, несомненным преимуществом фибринового покрытия тканеинженерных конструкций является его высокая доступность, поскольку фибрин можно получать из крови пациента, которому предназначен сосудистый протез, и таким образом полностью избежать иммунологических проблем, связанных с использованием чужеродного белка.

Заключение

По результатам проведенного исследования можно заключить, что модификация поверхности матриксов из PNBV/PCL фибрином, полученным из крови, позволяет значительно улучшить их адгезионные свойства. Модификацию фибрином можно использовать при разработке полимерных протезов сосудов малого диаметра.

Литература / References

- Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442.
- Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft – past, present, and future. *Tissue Eng. Part. B: Rev.* 2016;22(1):68–100. DOI: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
- Elliott M.B., Ginn B., Fukunishi T., Bedja D., Suresh A., Chen T. et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(26):12710–12719. DOI: 10.1073/pnas.1905966116.
- Shoji T., Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Transl. Pediatr.* 2018;7(2):188–195. DOI: 10.21037/tp.2018.02.01.
- Abdulhannan P., Russell D.A., Homer-Vanniasinkam S. Peripheral arterial disease: a literature review. *Br. Med. Bull.* 2012;104:21–39. DOI: 10.1093/bmb/ldo027.
- Ardila D.C., Liou J.J., Maestas D., Slepian M.J., Badowski M., Wagner W.R. et al. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J. Clin. Med.* 2019;8(2):185. DOI: 10.3390/jcm8020185.
- Assmann A., Delfs C., Munakata H., Schiffer F., Horstkötter K., Huynh K. et al. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials.* 2013;34:6015–6026. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.037.
- Conklin B.S., Wu H., Lin P.H., Lumsden A.B., Chen C. Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft. *Artif. Organs.* 2004;28:668–675. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2004.00062.x.
- Flameng W., De Visscher G., Mesure L., Hermans H., Jashari R., Meuris B. Coating with fibronectin and stromal cell-derived factor-1 α of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response-related degeneration. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014;147(4):1398–1404.e2. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.06.022.
- Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Глушкова Т.В., Матвеева В.Г. Создание персонализированного клеточнозаселенного сосудистого протеза *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2021;10(2):89–93.
- [Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Glushkova T.V., Matveeva V.G. Development of personalized cell-populated vascular graft in vitro. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2021;10(2):89–93. (In Russ.).] DOI: 10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93.
- Copes F., Pien N., Vlierberghe S.V., Boccafroschi F., Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:166. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00166.
- Lynn A.K., Yannas I.V., Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2004; 71:343–354. DOI: 10.1002/jbm.b.30096.
- Smethurst P.A., Onley D.J., Jarvis G.E., O'Connor M.N., Knight C.G., Herr A. B. et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J. Biol. Chem.* 2007;282(2):1296–1304. DOI: 10.1074/jbc.M606479200.
- Dietrich M., Heselhaus J., Wozniak J., Weinandy S., Mela P., Tschöcke B. et al. Fibrin-based tissue engineering: Comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. *Tissue Engineering. Part C: Methods.* 2013;19(3):216–226. DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0473.
- Park C.H., Woo K.M. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1064:253–261. DOI: 10.1007/978-981-13-0445-3_16.
- Podolnikova N.P., Yakovlev S., Yakubenko V.P., Wang X., Gorkun O.V., Ugarova T.P. The interaction of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ with fibrin occurs through multiple binding sites in the α_{IIb} β -propeller domain. *J. Biol. Chem.* 2014;289(4):2371–2383. DOI: 10.1074/jbc.M113.518126.

Информация о вкладе авторов

Великанова Е.А. – дизайн эксперимента, проведение экспериментов (иммунофлуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, написание статьи, окончательное утверждение текста статьи.

Матвеева В.Г. – дизайн эксперимента, работа с клеточными культурами, проведение экспериментов (получение фибрина, МТТ-тест), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Сенокосова Е.А. – проведение экспериментов (флуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Ханова М.Ю. – проведение экспериментов (флуоресцентный анализ), анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

Кривкина Е.О. – проведение экспериментов (изготовление полимерных матриц), окончательное утверждение текста статьи.

Антонова Л.В. – дизайн эксперимента, окончательное утверждение текста статьи.

Сведения об авторах

Великанова Елена Анатольевна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

Сенокосова Евгения Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergea@kemcardio.ru.

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: hanomu@kemcardio.ru.

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Антонова Лариса Валерьевна, д-р мед. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antolv@kemcardio.ru.

 **Великанова Елена Анатольевна**, e-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Information on author contributions

Velikanova E.A. – study concept, the experiments performance (immunofluorescence analysis), study results analysis, writing and final approval of the manuscript for publication.

Matveeva V.G. – study concept, working with cell cultures, the experiments performance (obtaining fibrin, MTT-test), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Senokosova E.A. – the experiments performance (fluorescence analysis), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Khanova M.U. – performing the experiments (fluorescence analysis), analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Krivkina E.O. – the experiments performance (production of polymer matrices), and final approval of the manuscript for publication.

Antonova L.V. – study concept, and final approval of the manuscript for publication.

Information about the authors

Elena A. Velikanova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Vera G. Matveeva, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4146-3373.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

Evgeniya A. Senokosova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-9430-937X.

E-mail: sergea@kemcardio.ru.

Mariam U. Khanova, Junior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: hanomu@kemcardio.ru.

Evgeniya O. Krivkina, Junior Research Scientist, Laboratory for Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Larisa V. Antonova, Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antolv@kemcardio.ru.

 **Elena A. Velikanova**, e-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Received November 11, 2022

Поступила 11.11.2022