

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-4-119-131

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

В.А. Сургученко¹, Е.А. Немец¹, В.Ю. Белов^{1, 2}, В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Цель работы: разработка способа модифицирования композитных пористых трубчатых биополимерных каркасов малого диаметра на основе бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) и желатина двухслойным биологически-активным покрытием на основе гепарина и лизата тромбоцитов, способствующим адгезии и пролиферации клеточных культур. **Материалы и методы.** Композитные пористые трубчатые биополимерные каркасы с внутренним диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из смеси 1 : 2 (по объему) 10% раствора сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) и 10% раствора желатина соответственно в гексафтор-2-пропанол. Структуру каркасов стабилизировали парами глутарового альдегида. Каркасы модифицировали биологически-активным покрытием на основе гепарина и лизата тромбоцитов человека. Морфологию поверхности образцов анализировали с применением сканирующей электронной микроскопии. Биологическую безопасность модифицированных каркасов *in vitro* (гемолиз, цитотоксичность) оценивали согласно ГОСТ ISO 10993. Взаимодействие с культурами эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека исследовали с применением витальных красителей. **Результаты.** Разработан способ модифицирования композитных пористых трубчатых биополимерных каркасов малого диаметра, полученных методом электроспиннинга из смеси поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) и желатина, двухслойным биологически-активным покрытием на основе ковалентно иммобилизованного гепарина и лизата тромбоцитов человека. *In vitro* доказано отсутствие цитотоксичности и гемолитической активности образцов модифицированных каркасов. Показано, что разработанное покрытие способствует адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека на внешней поверхности и эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 на внутренней поверхности композитных пористых трубчатых биополимерных каркасов в условиях *in vitro*. **Заключение.** Полученные результаты позволяют прийти к заключению о возможности использования разработанного покрытия для формирования *in vivo* тканеинженерной конструкции кровеносных сосудов малого диаметра.

Ключевые слова: гепарин, лизат тромбоцитов, биополимерный матрикс, желатин, поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат), электроспиннинг, сосуды малого диаметра, биологическая безопасность.

BIOACTIVE COATING FOR TISSUE-ENGINEERED SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS

V.A. Surguchenko¹, E.A. Nemets¹, V.Yu. Belov^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

Objective: to develop a method for modifying composite small-diameter porous tubular biopolymer scaffolds based on bacterial copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and gelatin modified with a double-layered

Для корреспонденции: Сургученко Валентина Александровна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 196-26-61. E-mail: valent.egorova@gmail.com

Corresponding author: Valentina Surguchenko. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-26-61. E-mail: valent.egorova@gmail.com

bioactive coating based on heparin (Hp) and platelet lysate (PL) that promote adhesion and proliferation of cell cultures. **Materials and methods.** Composite porous tubular biopolymer scaffolds with 4 mm internal diameter were made by electrospinning from a 1 : 2 (by volume) mixture of a 10% solution of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer, commonly known as PHBV, and a 10% solution of gelatin, respectively, in hexafluoro-2-propanol. The structure of the scaffolds was stabilized with glutaraldehyde vapor. The scaffolds were modified with a bioactive Hp + PL-based coating. The surface morphology of the samples was analyzed using scanning electron microscopy. Biological safety of the modified scaffolds *in vitro* (hemolysis, cytotoxicity) was evaluated based on the GOST ISO 10993 standard. Interaction with cultures of human endothelial cell line (EA.hy926) and human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADMSCs) was studied using vital dyes. **Results.** We developed a method for modifying small-diameter composite porous tubular biopolymer scaffolds obtained by electrospinning from a mixture of PHBV and gelatin modified with double-layered bioactive coating based on covalently immobilized Hp and human PL. The modified scaffold was shown to have no cytotoxicity and hemolytic activity *in vitro*. It was also demonstrated that the developed coating promotes hADMSC adhesion and proliferation on the external surface and EA.hy926 on the internal surface of the composite porous tubular biopolymer scaffolds *in vitro*. **Conclusion.** The developed coating can be used for the formation of *in vivo* tissue-engineered small-diameter vascular grafts.

Keywords: *heparin, platelet lysate, biopolymer matrix, gelatin, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), electrospinning, small-diameter vascular grafts, biological safety.*

ВВЕДЕНИЕ

Минимизация процессов тромбоза и гиперплазии интимы является одной из ключевых задач для успешной разработки и применения протезов кровеносных сосудов малого диаметра (ПКС МД) [1–3]. Эндотелизация считается наиболее предпочтительным вариантом оптимизации внутренней поверхности сосудистых протезов [4–6]. Монослой функционально активного эндотелия, аналогичный присутствующему в нативных кровеносных сосудах, обуславливает повышение тромборезистентности и долгосрочную проходимость протеза за счет свойств эндотелиальных клеток синтезировать широкий спектр биологически активных факторов, препятствующих агрегации тромбоцитов, регулирующих избыточную пролиферацию, миграцию и сократительную активность гладкомышечных клеток, гомеостаз и воспаление [7–9].

С целью повышения специфичности взаимодействия с клетками эндотелия (ЭК), клетками-предшественниками эндотелия (эндотелиальными прогениторными клетками, ЭПК) и другими типами клеток, ответственных за регенерацию кровеносных сосудов, а также для достижения быстрой эндотелизации используют различные подходы к модифицированию поверхности ПКС МД [10–15]. Широко применяемым способом модифицирования является использование покрытий на основе белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген, его частично гидролизованная форма – желатин, эластин, фибронектин [12, 14, 16], или иммобилизация на поверхности пептидов, имитирующих сайты адгезии. Наиболее известным из семейства подобного рода синтезированных соединений является RGD-пептид (Arg-Gly-Asp), повторяющий адгезивный фрагмент молекулы фибронектина [8, 17, 18]. Инкорпорирование в структуру ПКС МД биологически активных

соединений (БАС), таких как антитела или факторы роста, может способствовать привлечению ЭПК и зрелых ЭК *in situ*. CD34 и рецептор фактора роста сосудистого эндотелия 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2, CD309), присутствуют на поверхности циркулирующих ЭПК. Антитела к CD31 и VEGFR-2 используют для связывания ЭК [11, 18]. Было обнаружено, что факторы, такие как стромальный фактор 1 (stromalcell-derived factor-1, SDF-1) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating actor, G-CSF), усиливают мобилизацию ЭПК из костного мозга [11, 18–21]. Основным фактором роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) способен стимулировать покоящиеся ЭК, вызывая их пролиферацию и организацию в трубчатые структуры [11, 22].

Наиболее часто для повышения эффективности эндотелизации используют фактор роста эндотелия (vascular endothelial growth factor, VEGF) – высокоспецифичный к ЭК и ЭПК цитокин, активирующий и поддерживающий их миграцию и пролиферацию [22–24]. Одним из существенных недостатков применения факторов роста, в частности VEGF, является быстрая потеря биологической активности и высокая стоимость [22]. Показано, что иммобилизация факторов роста, таких как bFGF, TGF- β 2 (трансформирующий фактор роста β 2, transforming growth factor beta 2) или VEGF через гепарин-связывающий домен, повышает устойчивость к денатурации и ферментативному расщеплению в физиологических условиях, продлевая их биологическую активность [18, 25].

Гепарин (ГП) – гликозаминогликан с хорошо изученными и охарактеризованными антикоагулянтными свойствами, также часто применяется для функционализации биоматериалов и матриц, предназначенных для контакта с кровью, с целью повышения их тромборезистентности [26]. ГП также

играет важную роль в адгезии и гомеостазе эндотелиальных клеток, улучшает прикрепление к матриксу, обеспечивая трофическую и дифференцировочную клеточную сигнализацию, ингибируя при этом пролиферативную активность гладкомышечных клеток [1]. Совместная иммобилизация гепарина и ангиогенных факторов роста может одновременно подавлять тромбоз и стимулировать эндотелизацию [2]. В то же время перспективным, доступным и недорогим источником факторов роста (bFGF, TGF- β 2, VEGF) может служить лизат тромбоцитов (ЛТ), получаемый из плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (ПОТ) [27–30]. ЛТ может стать альтернативой широко используемым рекомбинантным факторам роста, которые ведут к значительному повышению стоимости получаемых изделий, а также могут провоцировать иммуногенные реакции [29].

Ранее нами были разработаны композитные пористые трубчатые биополимерные каркасы малого диаметра на основе бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) (ПГБВ) и желатина с регулируемой скоростью резорбции, обладающие необходимым комплексом физико-механических свойств, характерных для нативных кровеносных сосудов малого диаметра [31]. Однако стабилизация структуры каркаса парами глютарового альдегида приводила к повышению цитотоксичности. Учитывая как свойства ГП, так и богатый набор факторов роста, в т. ч. VEGF и bFGF, содержащийся в ЛТ, нами сделано предположение, что биофункционализация поверхности разработанных нами ранее трубчатых каркасов путем иммобилизации ГП в сочетании с биологически активным покрытием на основе ЛТ может способствовать устранению цитотоксичности, а также приданию каркасу как высокой гемосовместимости, в том числе тромборезистентности, так и специфической аффинности к адгезии эндотелиальных клеток.

Целью данной работы являлась разработка способа модифицирования композитных пористых трубчатых биополимерных каркасов малого диаметра на основе бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) и желатина двухслойным биологически-активным покрытием на основе гепарина и лизата тромбоцитов, способствующим процессу эндотелизации поверхности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление композитных пористых трубчатых биополимерных каркасов

Композитные пористые трубчатые биополимерные каркасы (КПТБ-каркасы) с внутренним диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из смеси 1 : 2 (по объему) 10% раствора сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) (ПГБВ, Sigma-Aldrich, США) и 10% раствора же-

латина кислой обработки (Gelatin from porcine skin Type A, Sigma-Aldrich, США) соответственно в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол (ГФИП, «Р&М-Invest», Россия), на установке для электроспиннинга NANON-01A («МЕСС СО», Япония) при напряжении между электродами 25 кВ, скорости подачи раствора 2 мл/ч, расстоянии до коллектора 100 мм, скорости вращения стержня-подложки 1000 об/мин, с использованием иглы 27G. После окончания процесса нанесения раствора образцы каркасов сушили в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч с последующим вакуумированием при остаточном давлении 10–20 мм рт. ст. и температуре 37 °С в течение 24 ч.

Стабилизация структуры КПТБ-каркасов

Структуру КПТБ-каркасов стабилизировали парами глютарового альдегида (ГА) в замкнутой емкости без прямого контакта образцов с 25% раствором ГА при комнатной температуре в течение 48 ч. После окончания процесса фиксации образцы тщательно промывали в трех сменах дистиллированной воды и высушивали в течение 24 ч при комнатной температуре.

Нанесение биологически активного покрытия

Иммобилизацию гепарина (ГП) (Sigma-Aldrich, США) осуществляли инкубацией образцов КПТБ-каркасов в водном растворе антикоагулянта с концентрацией 1 мг/мл (150–200 ед/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре, в результате чего происходило ковалентное связывание аминокрупп ГП с непрореагировавшими альдегидными группами ГА. Несвязанный ГП удаляли трехкратной отмыжкой в дистиллированной воде. Полученные гепаринизированные каркасы подвергали стерилизации гамма-излучением в дозе 1,5 МРад.

Необходимый объем раствора лизата тромбоцитов человека (ЛТч, Ренам, Россия) получали разведением сухого (лиофилизированного) ЛТч в соотношении 1 : 9 раствором Хенкса, не содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (HBSS, Gibco® by Life Technologies™, СК). Стерилизацию раствора лизата осуществляли фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Стерильные гепаринизированные образцы обрабатывали раствором ЛТч в асептических условиях в течение 1 ч при 37 °С непосредственно перед экспериментом. Связывание положительно заряженных факторов роста, содержащихся в ЛТч, с отрицательно заряженным ГП носит полиионный характер.

Морфология поверхности КПТБ-каркасов

Структуру поверхности модифицированных образцов КПТБ-каркасов анализировали на сканирую-

шем электронном микроскопе (СЭМ) JSM-6360LA («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 5 кВ и увеличении $\times 100$ –1000. Для создания проводящего покрытия напыляли золото.

Культуры клеток

Культуры фибробластов мышцы линии NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658™) и эндотелиальных клеток пупочной вены человека (ЭКч) линии EA.hy926 (The human umbilical vein cell line EA.hy926, ATCC®CRL-2922™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection) перед использованием хранили в жидком азоте при температуре -196°C . После разморозки фибробласты NIH/3T3 и ЭКч EA.hy926 высевали в стандартные культуральные флаконы площадью 25 или 75 см² (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) и культивировали в соответствующей полной ростовой среде (ПРС) DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л, DMEM high glucose с HEPES, «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки (ТС, Biosera, Германия) или эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин («ПанЭко», Россия) в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂. Перед экспериментом клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК) и готовили суспензию с необходимой концентрацией клеток.

Культура мезенхимальных стромальных клеток, изолированных из жировой ткани человека (МСК ЖТч), была получена в отделе биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по ранее разработанной методике [32]. Перед использованием МСК ЖТч хранили в жидком азоте при температуре -196°C . После разморозки МСК ЖТч высевали в стандартные культуральные флаконы площадью 75 см² (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) и культивировали в полной ростовой среде (ПРС) DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, HyClone, США), 10 мкг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF-2, Peprotech, AF-100-18B, США), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, СК), 1 мМ HEPES (Gibco® by Life Technologies™, СК) и 2 мМ аланил-глутамин («ПанЭко», Россия) в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂. Перед экспериментом клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК) и готовили суспензию с необходимой концентрацией

клеток. В экспериментах использовали клетки V–VI пассажей. Разными авторами показано, что МСК ЖТ используют как самостоятельный клеточный компонент при разработке тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра [33, 34], также МСК ЖТ поддерживают жизнеспособность ЭК и способствуют васкуляризации тканеинженерных конструкций сосудов малого диаметра *in vivo* [35], что явилось обоснованием применения данной культуры клеток в нашей работе.

Исходное количество клеток в суспензии определяли на автоматическом счетчике клеток (TC20™ Automated Cell Counter, BIORAD, Сингапур) с одновременным анализом жизнеспособности по исключению красителя трипанового синего (BIORAD, # 145-0013, Сингапур).

Гемолиз

Исследование гемолитического действия модифицированных КПТБ-каркасов проводили на экстрактах из образцов с использованием эритроцитарной массы крови кроликов согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-4-2011 [36]. Экстракты готовили в соответствии с рекомендациями ГОСТ ISO 10993-1-2011 [37]. В качестве экстрактанта (модельной среды) использовали 0,9% раствор натрия хлорида, время экстракции составляло 72 ч при 37 °C. Отрицательным контрольным образцом служил 0,9% раствор натрия хлорида, положительным контрольным образцом, вызывающим 100% гемолиз – дистиллированная вода. Для оценки гемолитического действия одного образца использовали кровь от трех кроликов.

Кровь, содержащую 3,8% цитрата натрия (в соотношении 1 : 9), полученную от кроликов породы шиншилла с соблюдением биоэтических принципов обращения с животными, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010 г. об экспериментальных животных, центрифугировали при 900 об/мин в течение 10 мин для получения эритроцитарной массы. 10% взвесь эритроцитов, полученную разведением трехкратно отмытой эритроцитарной массы (1 : 9 0,9% раствором хлорида натрия), добавляли к исследуемым экстрактам из образцов модифицированных КПТБ-каркасов, а также к отрицательному контрольному образцу и положительному контрольному образцу и инкубировали в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли и проводили измерение оптической плотности с помощью спектрофотометра Stat Fax 4500 (Awareness

Technology, США) на длине волны 540 нм. Процент гемолиза вычисляли по формуле:

$$\frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \times 100, \quad (1)$$

где $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность исследуемого образца; $E_{\text{к}}$ – оптическая плотность отрицательного контрольного образца; E_{100} – оптическая плотность образца со 100% гемолизом.

Величина гемолиза во всех образцах крови должна составлять менее 2%.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Цитотоксичность фрагментов модифицированных КПТБ-каркасов в условиях *in vitro* оценивали согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 методом прямого контакта [38]. Отрицательным контрольным образцом служила поверхность культурального пластика (КП, CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия), положительным контрольным образцом – стандарт цинка одноэлементный водный 10 мг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях.

Для исследования цитотоксического эффекта фибробласты высевали в культуральные 24-луночные плоскодонные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации $7-12 \times 10^4$ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂, до образования $(80 \pm 10)\%$ монослоя, после чего исследуемые фрагменты матриц помещали непосредственно на поверхность монослоя фибробластов. Визуально культуру оценивали с помощью бинокулярного флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония).

Метаболическую активность фибробластов после контакта с фрагментами матриц оценивали через 24 ч с помощью реагента PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. В лунки, содержащие исследуемые образцы, отрицательный контрольный и положительный контрольный образцы, добавляли 10% витального реагента PrestoBlue™, после чего планшет инкубировали в течение 3 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂. PrestoBlue™ – витальный краситель, в состав которого входит индикатор окислительно-восстановительных процессов резазурина. Жизнеспособные пролиферирующие клетки восстанавливают резазурин при участии митохондриальных дегидрогеназ, цитохромов и дегидрогеназ, находящихся в цитоплазме клетки, до резозурина [39], вследствие чего происходит изменение цвета реагента с индиго на розовый. Изменение поглощения среды регистрировали

Таблица 1

Степень ответной реакции клеток

Cell response rate

Шкала цитотоксичности	Интерпретация результата
0	Не цитотоксично
1	Легкая цитотоксичность
2	Средняя цитотоксичность
3	Значительная цитотоксичность

с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M (Tecan, Австрия) с программным обеспечением Spark Control™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм. Процент восстановленного PrestoBlue™ характеризует метаболическую активность клеток. Относительная разница в процентах между метаболической активностью клеток в отрицательном контрольном образце и после контакта с исследуемыми образцами характеризует цитотоксичность исследуемого образца и вычисляется по формуле:

$$\frac{117,216 \times A_{570 \text{ Обр.}} - 80,586 \times A_{600 \text{ Обр.}}}{117,216 \times A_{570}^0 - 80,586 \times A_{600}^0} \times 100\%, \quad (2)$$

где 117,216 и 80,586 – значения молярных коэффициентов экстинкции для окисленной формы витального реагента PrestoBlue™ на длинах волн 600 и 570 нм соответственно; $A_{570 \text{ Обр.}}$ и $A_{600 \text{ Обр.}}$ – поглощение исследуемого образца на длинах волн 570 и 600 нм соответственно; A_{570}^0 и A_{600}^0 – поглощение отрицательного контрольного образца на длинах волн 570 и 600 нм соответственно.

Анализ результатов проводили с помощью оценочной шкалы степени ответной реакции клеток после непосредственного контакта с образцами согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 (табл. 1).

Отрицательный контрольный образец должен соответствовать степени реакции 0 (отсутствие цитотоксичности), положительный контрольный образец – 3 (значительная цитотоксичность, практически полностью разрушенный монослой). Степень ответной реакции исследуемого образца должна соответствовать степени реакции 0.

Культивирование ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч на поверхности КПТБ-каркасов

Исследуемые стерильные образцы модифицированных КПТБ-каркасов предварительно разрезали вдоль, расправляли, помещали на дно культурального плоскодонного 24-луночного планшета (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) соответствующей стороной (внутренней или внешней) и фиксировали стерильными силиконовыми кольцами. ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч засевали в асептических условиях на внутреннюю и внешнюю стороны образцов соответственно. Исходная плотность посева на

исследуемые образцы и КП составляла 4×10^4 кл/см² для культуры ЭКч линии EA.hy926 и 3×10^4 кл/см² для культуры МСК ЖТч. Поскольку исследуемые образцы получены методом электроспиннинга и являются трехмерными, использовать двухмерную поверхность КП в качестве контрольного образца было бы некорректно. В данных экспериментах поверхность КП использовали для контроля морфологии и адекватного роста исследуемых культур клеток. После посева 24-луночные планшеты с образцами культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях в течение 24 и 96 ч или 24, 96 и 168 ч, после чего проводили соответствующие исследования.

Оценка жизнеспособности

Для оценки жизнеспособности и визуализации количества ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч на поверхности модифицированных КПТБ-каркасов использовали набор Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes® by Life Technologies™, США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. Метод заключается в двойном флуоресцентном окрашивании, с одновременным определением живых и мертвых клеток посредством связывания красителей: бромистого этидия (ethidium bromide homodimer, EthD-1) и ацетоксиметил кальцеина (calcein acetoxymethyl, calcein AM). EthD-1 является маркером мертвых клеток, проникая через поврежденную плазматическую мембрану и связываясь с нуклеиновыми кислотами, дает ярко-красное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~635 нм). Calcein AM, проникая в жизнеспособные клетки, подвергается воздействию внутриклеточных эстераз, превращаясь в кальцеин, дающий ярко-зеленое однородное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~515 нм). В исследуемые лунки добавляли раствор фосфатного буфера Дюльбекко, содержащего 2 мкМ calcein AM и 4 мкМ EthD-1, через 15 мин результаты окрашивания визуализировали с помощью бинокулярного инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония), оснащенного цифровой фотокамерой Digital Sight DS-Vil (Nikon, Япония). Фотографирование исследуемых и контрольных образцов в процессе культивирования ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч проводили через 24 и 96 ч после посева.

Оценка метаболической активности и количества клеток

Метаболическую активность ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч на поверхности образцов матриц оценивали через 24, 96 и 168 ч с помощью реагента PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу, рекомендуемому производителем. В лунки,

содержащие исследуемые образцы и бесклеточный контрольный образец (ПРС, не содержащая клеток), добавляли 10% витального реагента PrestoBlue™, после чего планшет инкубировали в течение 3 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшетов, как было описано ранее, на длинах волн 570 и 600 нм. Процент восстановленного PrestoBlue™ характеризует метаболическую активность клеток и вычисляется по формуле:

$$\frac{117,216 \times A_{570 \text{ Обр.}} - 80,586 \times A_{600 \text{ Обр.}}}{155,677 \times A'_{600} - 14,652 \times A'_{570}} \times 100\%, (3)$$

где 117,216 и 80,586 – значения молярных коэффициентов экстинкции для окисленной формы витального реагента PrestoBlue™ на длинах волн 600 и 570 нм соответственно; 155,677 и 14,652 – значения молярных коэффициентов экстинкции для восстановленной формы витального реагента PrestoBlue™ на длинах волн 570 и 600 нм соответственно; $A_{570 \text{ Обр.}}$ и $A_{600 \text{ Обр.}}$ – поглощение исследуемого образца на длинах волн 570 и 600 нм соответственно; A'_{570} и A'_{600} – поглощение бесклеточного контрольного образца на длинах волн 570 и 600 нм соответственно.

Количество ЭКч линии EA.hy926 и МСК ЖТч на поверхности образцов каркасов оценивали с помощью калибровочных кривых, линейных в полулогарифмических координатах до концентрации клеток $0,8 \times 10^5$ в случае ЭКч линии EA.hy926 и 1×10^5 в случае МСК ЖТч (VI пассаж). Для построения калибровочной кривой выбранный тип клеток высевали в плоскодонные 24-луночные культуральные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) с плотностью посева $1\text{--}20 \times 10^4$ кл/см². Через 24 ч в лунки, содержащие необходимое количество клеток и бесклеточный контрольный образец, добавляли витальный реагент PrestoBlue™, инкубировали планшет в течение 3 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей $(5 \pm 1)\%$ CO₂ и регистрировали изменение поглощения среды. Процент восстановленного PrestoBlue™, определенный по формуле (3), наносили на график по оси Y, по оси X откладывали соответствующее количество клеток.

Статистическая обработка

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ при количестве образцов (n) от 3 до 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена структура КПТБ-каркаса. Поперечный срез (рис. 1, а) демонстрирует выражен-

ную высокопористую структуру. Толщина стенки составляет ~500 мкм. Внутренний и внешний слой каркаса (см. рис. 2, б, в) имеют сходную организованную из не упорядоченно расположенных волокон толщиной преимущественно от 0,8 до 2,0 мкм, размер пор – 10–25 мкм.

Данные проведенного исследования гемолитической активности позволяют сделать вывод, что испытанные образцы модифицированных биоактивным покрытием на основе ГП и ЛТч КПТБ-каркасов не

оказывают гемолитического действия (процент гемолиза 0,07%) и соответствуют допустимым значениям (процент гемолиза менее 2%), удовлетворяющим требованиям, предъявляемым к медицинским изделиям согласно ГОСТ ISO 10993-4-2011.

В табл. 2 представлены значения, характеризующие метаболическую активность фибробластов линии NIH/3T3 после прямого контакта с образцами модифицированного КПТБ-каркаса относительно отрицательного (не цитотоксичного)

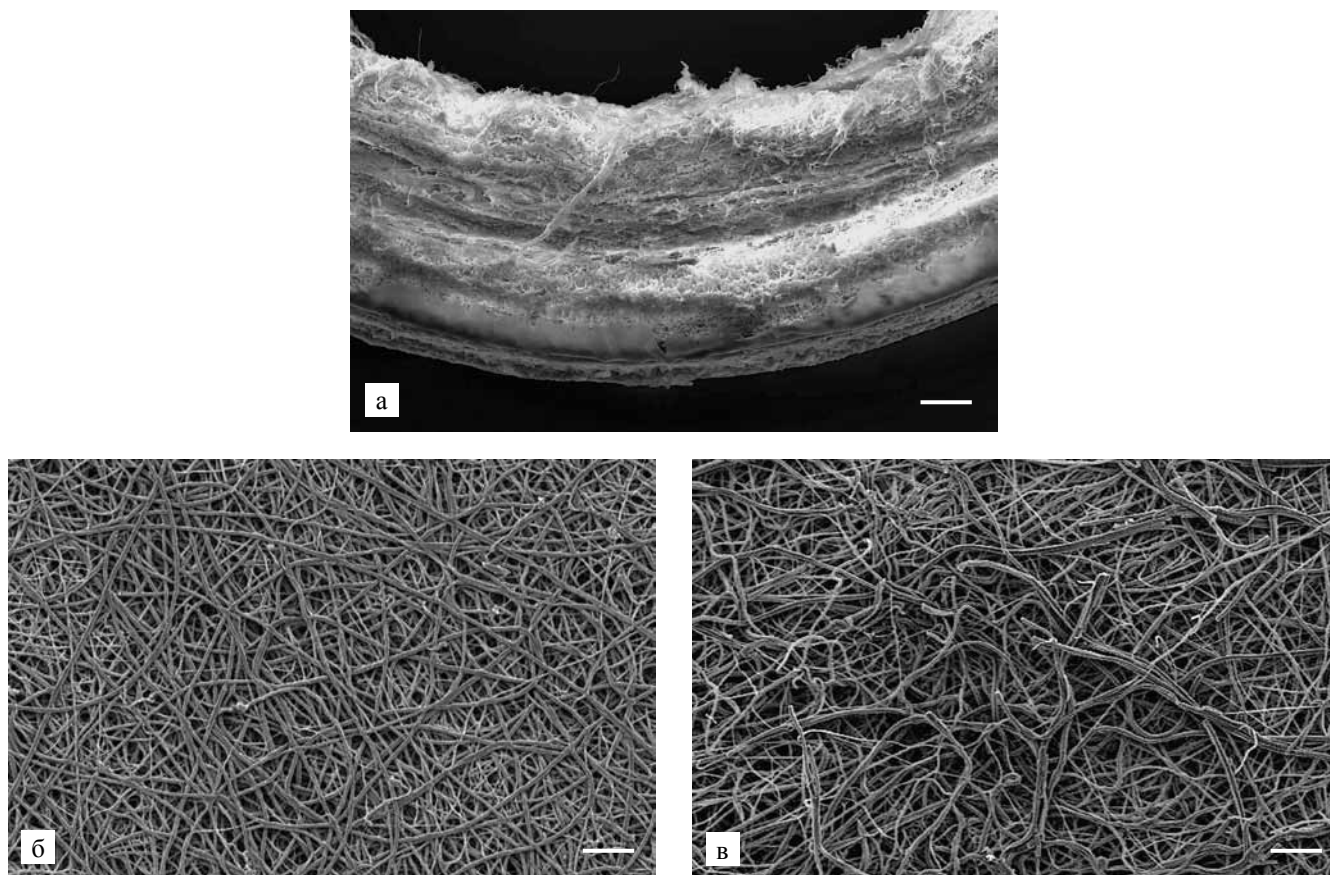


Рис. 1. Структура КПТБ-каркаса с двухслойным покрытием, d = 4 мм: а – поперечный срез ($\times 100$. Бар 100 мкм); б – внутренняя поверхность ($\times 1000$. Бар 10 мкм); в – внешняя поверхность ($\times 1000$. Бар 10 мкм)

Fig. 1. The structure of composite porous tubular biopolymer (CPTB) scaffold modified with double-layered coating, d = 4 mm: a – cross section (Magnification $\times 100$. Bar 100 μm); б – inner surface (Magnification $\times 1000$. Bar 10 μm); в – outer surface (Magnification $\times 1000$. Bar 10 μm)

Таблица 2

Процент жизнеспособных фибробластов линии NIH/3T3 относительно отрицательного контрольного образца после контакта с модифицированными образцами КПТБ-каркасов
Percentage of viable NIH/3T3 fibroblast cell line relative to a negative control sample after contact with the modified samples of CPTB scaffolds

Образец	% жизнеспособных клеток относительно отрицательного контрольного образца	Степень ответной реакции клеток
Модифицированный (ГП)	$95,55 \pm 2,06$	0
Модифицированный (двухслойное биоактивное покрытие ГП + ЛТч)	$97,83 \pm 1,67$	0
Положительный контрольный образец	$9,87 \pm 0,73$	3

контрольного образца (КП). Образец не оказывает цитотоксического действия, если метаболическая активность фибробластов относительно отрицательно-го контрольного образца остается выше 90%. После

контакта клеток с образцами, модифицированными ГП или ГП с ЛТч, относительная метаболическая активность фибробластов выше 90%, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия.

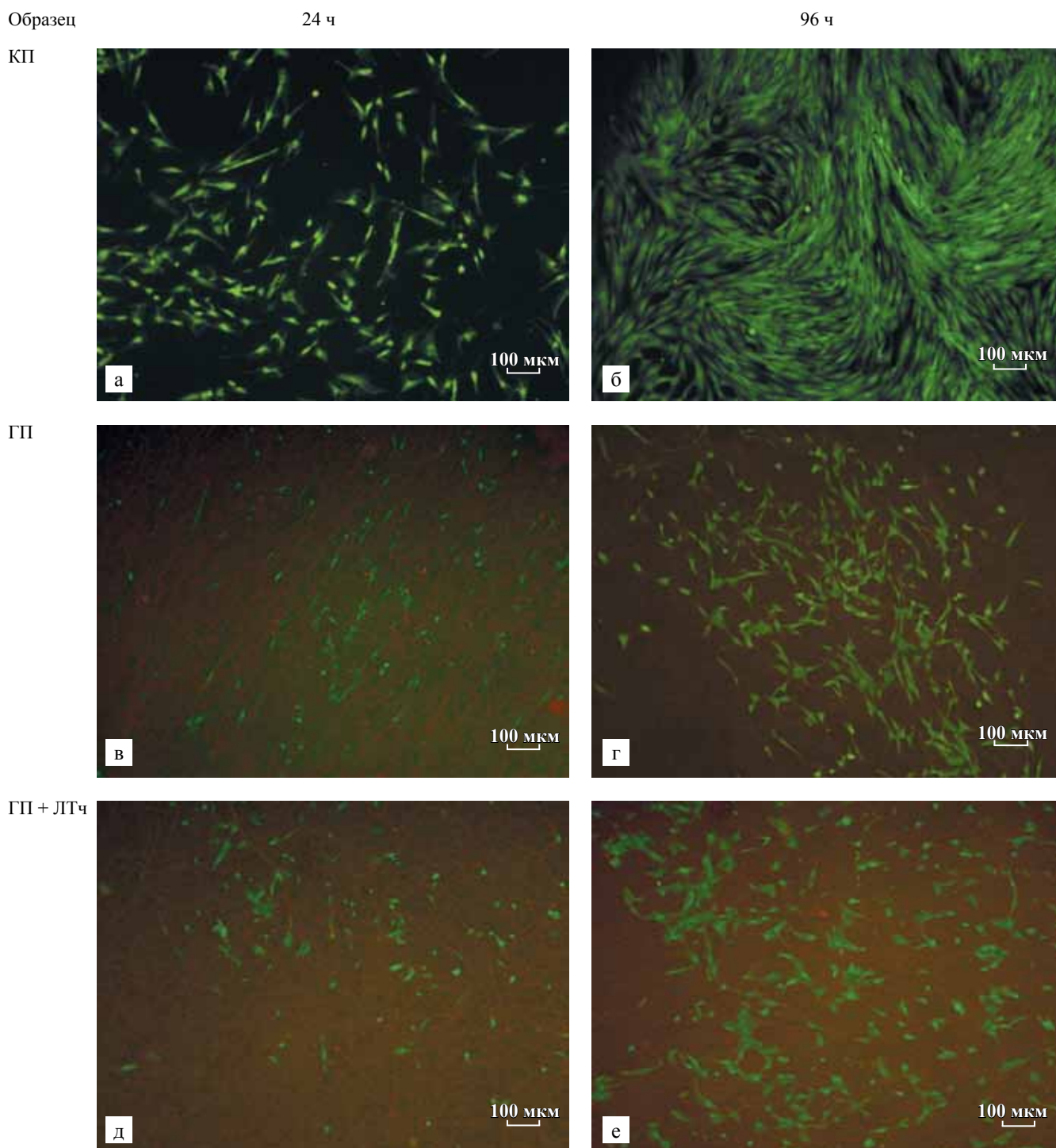


Рис. 2. Культура МСК ЖТч (VI пассаж) на внешней поверхности модифицированных КПТБ-каркасов: а, б – КП, 24 и 96 ч соответственно; в, г – каркасы с модифицирующим покрытием на основе ковалентно иммобилизованного ГП, 24 и 96 ч соответственно; д, е – каркасы с модифицирующим покрытием на основе лизата тромбоцитов человека, 24 и 96 ч соответственно. Окрашивание Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. $\times 10$. Бар 100 мкм

Fig. 2. The culture of hADMSCs (VI passage) on the outer surface of the modified CPTB scaffolds: а, б – Cell culture polystyrene, 24 and 96 h, respectively; в, г – Scaffolds with covalently immobilized heparin coating, 24 and 96 h, respectively; д, е – Scaffolds with modifying coating on the basis of human platelet lysate, 24 and 96 h, respectively. Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. Magnification $\times 10$. Bar 100 μm

Ранее нами было показано, что КПТБ-каркасы на основе ПГБВ и желатина, стабилизированные в парах ГА без применения дополнительной обработки, проявляют значительную цитотоксичность (степень реакции 3) [31].

На рис. 2 приведены фотографии культуры МСК ЖТч (VI пассаж) на поверхности КП и внешней поверхности модифицированных КПТБ-каркасов через 24 и 96 ч после посева.

Через 24 ч на поверхности всех модифицированных КПТБ-каркасов наблюдается сравнимое количество адгезированных и распластанных МСК ЖТч. Через 96 ч культивирования МСК ЖТч на поверхности КП формируют монослой. На исследуемых же образцах количество МСК ЖТч заметно возрастает, но не достигает монослоя, все клетки жизнеспособны и распластаны, что также подтверждает ранее полученные данные об отсутствии цитотоксичности модифицированных образцов. На рис. 3 представлены результаты исследования пролиферации МСК ЖТч на внешней поверхности модифицированных КПТБ-каркасов. Через 24 ч количество МСК ЖТч на внешней поверхности модифицированных ГП и покрытием на основе ГП и ЛТч образцов отличается незначительно ($11,8 \pm 0,6 \times 10^3$ и $15,1 \pm 1,3 \times 10^3$ кл соответственно). К концу срока культивирования, через 168 ч, количество МСК ЖТч на внешней поверхности исследуемых образцов с модифицирующим покрытием на основе ГП и ЛТч увеличивается в 3 раза ($42,5 \pm 2,8 \times 10^3$ кл), в то время как количество МСК ЖТч на внешней поверхности гепаринизированных матриц увеличивается всего в 1,3 раза ($16,5 \pm 0,7 \times 10^3$ кл). Таким образом, модифицирующее покрытие на основе лизата тромбоцитов способствует адгезии и пролиферации МСК ЖТч на внешней поверхности КПТБ-каркасов. Модифицирующее покрытие на основе одного лишь ковалентно иммобилизованного ГП относительно культуры МСК ЖТч в большей степени способствует адгезии, чем пролиферации данного типа клеток.

На рис. 4 и 5 представлены результаты исследования взаимодействия модифицированной внутренней поверхности КПТБ-каркасов с культурой эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 через 24 и 96 ч после посева. Через 24 ч на поверхности каркасов, модифицированных ГП с ЛТч, наблюдается большее количество адгезированных и распластанных эндотелиальных клеток по сравнению с образцами, модифицированными только ГП. Через 96 ч культивирования на образце, модифицированном только ГП, наблюдается отсутствие пролиферации и значительное количество нежизнеспособных клеток. В то же время на образцах, модифицированных двухслойным покрытием, формируется монослой жизнеспособных клеток. Заметим, что аналогичный эффект наблюдается для КП. Из рис. 5 следует, что

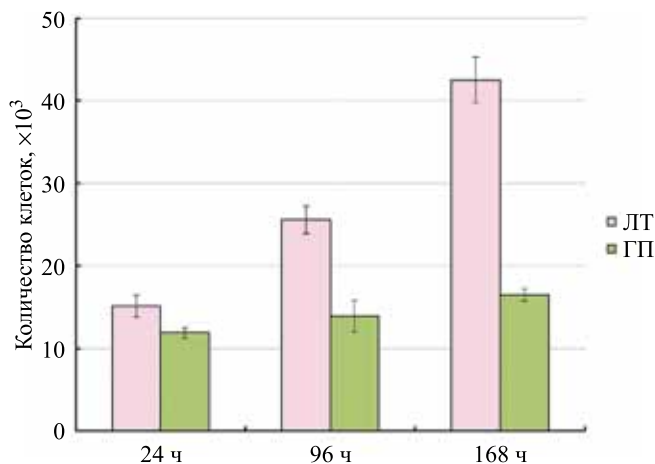


Рис. 3. Пролиферация МСК ЖТч (VI пассаж) на внешней поверхности КПТБ-каркасов, модифицированных покрытиями на основе ковалентно иммобилизованного ГП и ГП с ЛТч

Fig. 3. hADMSCs (VI passage) proliferation on the outer surface of CPTB scaffolds modified with covalently immobilized heparin and heparin with human platelet lysate coatings

модифицирующее биоактивное покрытие на основе иммобилизованного ГП и ЛТч способствует адгезии, распластыванию и стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 *in vitro* на внутренней поверхности КПТБ-каркасов в силу достаточно большого содержания факторов роста, содержащихся в лизате тромбоцитов, включая VEGF: количество ЭК через 168 ч увеличивается в 2,4 раза. Полученные нами результаты косвенно подтверждаются данными литературы. S.M. Oliveira et al. было показано, что нанопокрывание на основе ЛТ активизирует эндотелиальные клетки и способствует ангиогенезу (формированию микротрубочек) в присутствии сульфированных полисахаридов в трехмерном матриксе [29].

Возможно, гепаринизация поверхности в условиях данного эксперимента не способствует эндотелизации *in vitro*. Это, на наш взгляд, связано с тем, что хотя гепарин способен связывать факторы роста, присутствующие в сывороточном компоненте среды, их концентрации явно недостаточно, чтобы поддерживать пролиферацию эндотелиальных клеток. Несмотря на то что ГП играет важную роль в адгезии и гомеостазе эндотелиальных клеток [1], R.J. Smith Jr. et al. показали, что при имплантации бесклеточных протезов кровеносных сосудов, модифицированных ГП, а также ГП + VEGF, в аорту мышей, через 4 недели имплантации образцы хоть и были полностью эндотелизированы, состав стенки протезов для образцов с разным покрытием значительно отличался [40]. В протезах, модифицированных только ГП, слои эндотелиальных и гладкомышечных клеток не были ярко выраженными и оказались сформированы

не типично для нативных сосудов, в то время как в образцах, модифицированных ГП + VEGF, присутствовали четко разделенные внутренний и средний слои, сходные по своему строению с нативными со-

судами, а также присутствовал функционирующий эндотелий. То есть модифицирования протеза одним ГП недостаточно для получения адекватно функционирующего тканеинженерного сосуда.

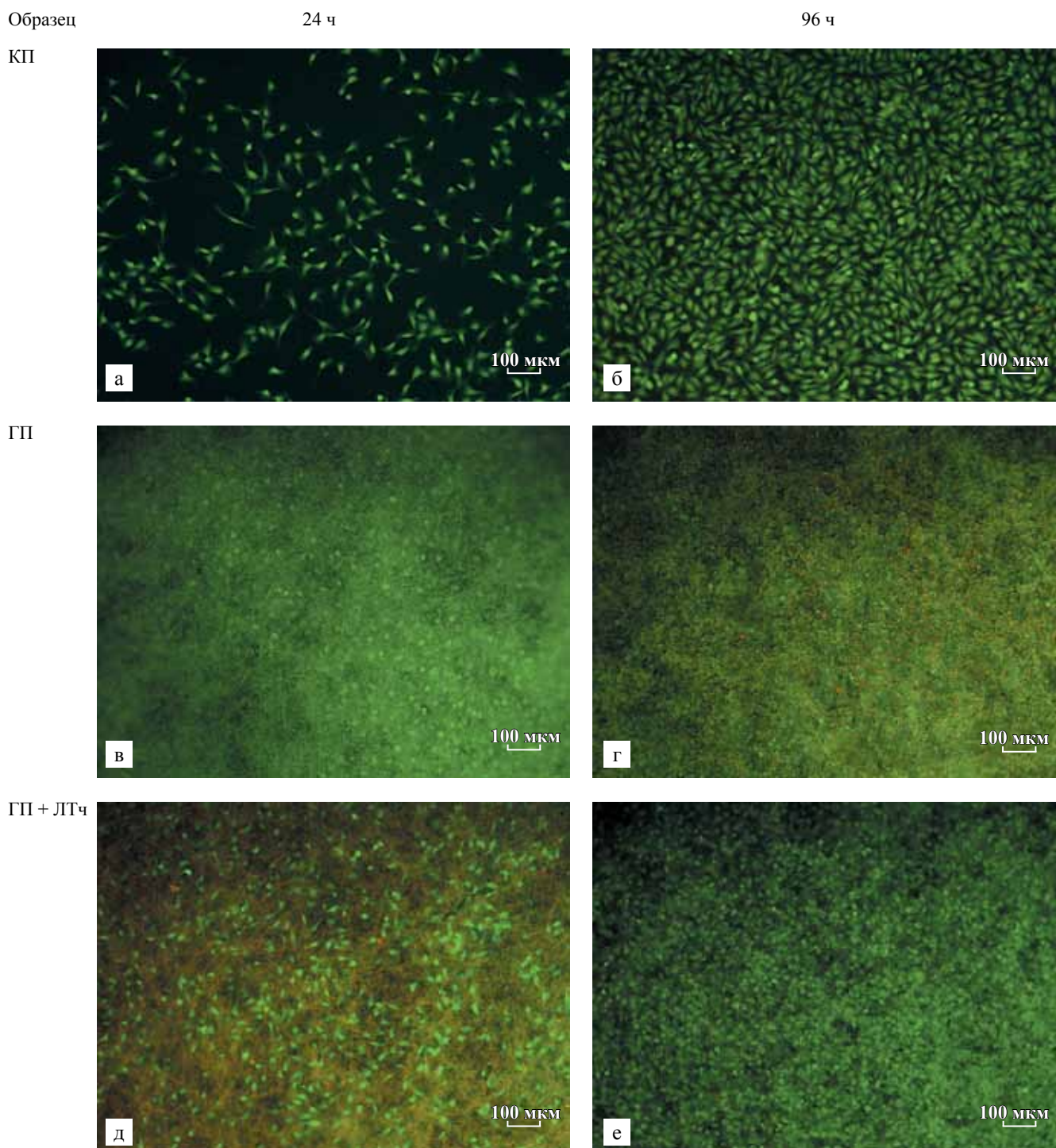


Рис. 4. Культура ЭКч линии EA.hy926 на внутренней поверхности модифицированных КПТБ-каркасов: а, б – КП, 24 и 96 ч соответственно; в, г – матриксы с модифицирующим покрытием на основе ковалентно иммобилизованного ГП, 24 и 96 ч соответственно; д, е – матриксы с модифицирующим покрытием на основе ГП и ЛТч, 24 и 96 ч соответственно. Окрашивание Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. $\times 10$. Бар 100 мкм

Fig. 4. Culture of human EA.hy926 endothelial cells on the inner surface of the modified CPTB scaffolds: а, б – Cell culture polystyrene, 24 and 96 h, respectively; в, г – Scaffolds with covalently immobilized heparin coating, 24 and 96 h, respectively; д, е – Scaffolds with modifying coating on the basis of heparin and human platelet lysate, 24 and 96 h, respectively. Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. Magnification $\times 10$. Bar 100 μm

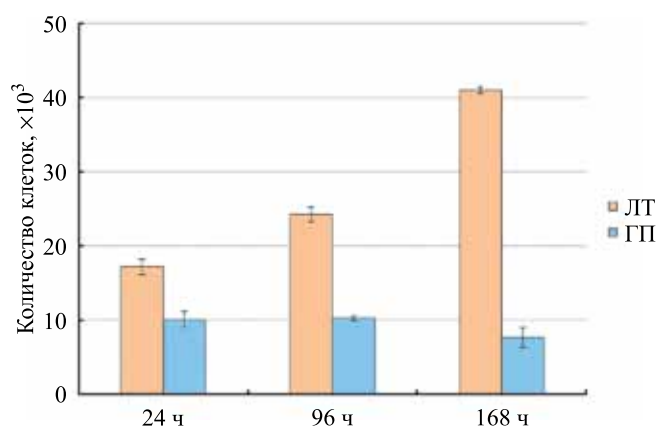


Рис. 5. Пролиферация эндотелиальных клеток линии EA.hy926 на внутренней поверхности модифицированных КПТБ-каркасов

Fig. 5. Human EA.hy926 endothelial cells proliferation on the inner surface of modified CPTB scaffolds

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для поверхности КПТБ-каркасов малого диаметра, полученных методом электроспиннинга из смеси ПГБВ и желатина, разработан способ модифицирования двухслойным биологически-активным покрытием на основе ковалентно иммобилизованного ГП и ЛТч, компоненты которого образуют с ГП полиионные комплексы. *In vitro* доказано отсутствие цитотоксичности и гемолитической активности образцов модифицированных КПТБ-каркасов. Показано, что разработанное биологически активное покрытие способствует адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека на внешней поверхности КПТБ-каркасов и эндотелиальных клеток пупочной вены человека линии EA.hy926 на внутренней поверхности КПТБ-каркасов в условиях *in vitro*.

Полученные результаты позволяют прийти к заключению о возможности использования разработанного покрытия для формирования *in vivo* тканеинженерной конструкции кровеносных сосудов малого диаметра.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shoji T, Shinoka T. Heparin-eluting tissue-engineered bioabsorbable vascular grafts. *Appl Sci*. 2021; 11: 4563–4575. <https://doi.org/10.3390/app11104563>.
- Henry JJD, Yu J, Wang A, Lee R, Fang J, Li S. Engineering the mechanical and biological properties of nanofibrous vascular grafts for *in situ* vascular tissue engineering. *Biofabrication*. 2017; 9 (3): 035007. doi: 10.1088/1758-5090/aa834b. PMID: 28817384; PMCID: PMC5847368.
- 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. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26447530; PMCID: PMC4753638.
- Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015; 44 (15): 5680–5742. doi: 10.1039/c4cs00483c. PMID: 26023741.
- Cai Q, Liao W, Xue F, Wang X, Zhou W, Li Y et al. Selection of different endothelialization modes and different seed cells for tissue-engineered vascular graft. *Bioact Mater*. 2021; 6 (8): 2557–2568. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.12.021. PMID: 33665496; PMCID: PMC7887299.
- Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR et al. Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering of Vascular Grafts. *Acta Biomater*. 2014; 10 (1): 11–25. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.022.
- Smith RJ, Nasiri B, Kann J, Yergeau D, Bard JE, Swartz DD et al. Endothelialization of arterial vascular grafts by circulating monocytes. *Nat Commun*. 2020; 11: 1622–1638. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15361-2>.
- Neufurth M, Wang X, Tolba E, Dorweiler B, Schröder HC, Link T et al. Modular Small Diameter Vascular Grafts with Bioactive Functionalities. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0133632. doi: 10.1371/journal.pone.0133632. PMID: 26204529; PMCID: PMC4512703.
- Matsuzaki Y, John K, Shoji T, Shinoka T. The evolution of tissue engineered vascular graft technologies: from preclinical trials to advancing patient care. *Appl Sci (Basel)*. 2019; 9 (7): 1274–1295. doi: 10.3390/app9071274.
- Ardila DC, Liou JJ, Maestas D, Slepian MJ, Badowski M, Wagner WR 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. PMID: 30720769; PMCID: PMC6416564.
- Melchiorri AJ, Hibino N, Fisher JP. Strategies and techniques to enhance the *in situ* endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013; 19 (4): 292–307. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0577. PMID: 23252992; PMCID: PMC3690089.
- Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci*. 2016 Feb 1; 53: 86–168. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004. PMID: 27022202; PMCID: PMC4808059.
- Mota C, Puppi D, Chiellini F, Chiellini E. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015; 9 (3): 174–190. doi: 10.1002/term.1635. PMID: 23172792.
- Schmedlen RH, Elnjeirami WM, Gobin AS, West JL. Tissue engineered vascular grafts. *Tissue engineering: principles and practices*. ed. by JP Fisher, AG Mikos,

- JD Bronzino, DR Peterson. 1st ed. USA: CRC Press Taylor & Francis Group; 2013: 1–9.
15. Mallis P, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering*. 2020; 7 (4): 160–200. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040160>.
16. Han F, Jia X, Dai D, Yang X, Zhao J, Zhao Y et al. Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF. *Biomaterials*. 2013; 34 (30): 7302–7313. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.06.006. PMID: 23830580.
17. Kuwabara F, Narita Y, Yamawaki-Ogata A, Kanie K, Kato R, Satake M et al. Novel small-caliber vascular grafts with trimeric peptide for acceleration of endothelialization. *Ann Thorac Surg*. 2012; 93 (1): 156–163; doi: 10.1016/j.athoracsurg.2011.07.055. PMID: 22054652.
18. Антонова ЛВ, Сильников ВН, Ханова МЮ, Королева ЛС, Серпокрялова ИЮ, Великанова ЕА и др. Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 142–152. Antonova LV, Silnikov VN, Khanova MYu, Koroleva LS, Serpokrilova IYu, Velikanova EA et al. Adhesion, proliferation and viability of human umbilical vein endothelial cells cultured on the surface of biodegradable non-woven matrices modified with RGD peptides. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (1): 142–152. (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-1-96-109>.
19. Smith RJ, Koobatian MT, Shahini A, Swartz DD, Andreadis ST. Capture of endothelial cells under flow using immobilized vascular endothelial growth factor. *Biomaterials*. 2015 May; 51: 303–312. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.025.
20. Wang K, Chen X, Pan Y, Cui Y, Zhou X, Kong D et al. Enhanced vascularization in hybrid PCL/gelatin fibrous scaffolds with sustained release of VEGF. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 865076. doi: 10.1155/2015/865076. PMID: 25883978; PMCID: PMC4390103.
21. Lee KW, Johnson NR, Gao J, Wang Y. Human progenitor cell recruitment via SDF-1 α coacervate-laden PGS vascular grafts. *Biomaterials*. 2013; 34 (38): 9877–9885. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.082. PMID: 24060423; PMCID: PMC3882008.
22. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Кутихин АГ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ и др. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1 α и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 96–109. Antonova LV, Sevostyanova VV, Kutikhin AG, Velikanova EA, Matveeva VG et al. Influence of bFGF, SDF-1 α , or VEGF incorporated into tubular polymer scaffolds on the formation of small-diameter tissue-engineered blood vessel *in vivo*. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 96–109. (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-1-96-109>.
23. Wan X, Li P, Jin X, Su F, Shen J, Yuan J. Poly(ϵ -caprolactone)/keratin/heparin/VEGF biocomposite mats for vascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2020; 108 (2): 292–300. doi: 10.1002/jbm.a.36815. PMID: 31606923.
24. Emechebe GA, Obiweleuzor FO, Jeong IS, Park J-K, Park CH et al. Merging 3D printing with electrospun biodegradable small-caliber vascular grafts immobilized with VEGF. *Nanomedicine: NBM* 2020; 30: 102306, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102306>.
25. Spadaccio C, Nappi F, De Marco F, Sedati P, Sutherland FW, Chello M et al. Preliminary *in vivo* evaluation of a hybrid armored vascular graft combining electrospinning and additive manufacturing techniques. *Drug Target Insights*. 2016; 10 (Suppl 1): 1–7. doi: 10.4137/DTI.S35202. PMID: 26949333; PMCID: PMC4772909.
26. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. 1989; 9 (1): 1–20. doi: 10.1161/01.atv.9.1.1. PMID: 2643420.
27. Santos SCNDS, Sigurjonsson ÓE, Custódio CA, Mano JFCDL. Blood plasma derivatives for tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018; 24 (6): 454–462. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0008. PMID: 29737237; PMCID: PMC6443031.
28. Giusti I, D'Ascenzo S, Macchiarelli G, Dolo V. *In vitro* evidence supporting applications of platelet derivatives in regenerative medicine. *Blood Transfus*. 2020; 18 (2): 117–129. doi: 10.2450/2019.0164-19. PMID: 31657710; PMCID: PMC7141937.
29. Oliveira SM, Pirraco RP, Marques AP, Santo VE, Gomes ME, Reis RL et al. Platelet lysate-based pro-angiogenic nanocoatings. *Acta Biomater*. 2016; 32: 129–137. doi: 10.1016/j.actbio.2015.12.028. PMID: 26708711.
30. Шанский ЯД, Сергеева НС, Свиридова ИК, Кураков МС, Курсанова ВА, Ахмедова СА и др. Исследование лизата тромбоцитов человека как перспективной ростовой добавки для культивирования стволовых и других типов клеток. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2013; 3: 153–158. Shanskij YD, Sergeeva NS, Sviridova IK, Kirakozov MS, Kirsanova VA, Ahmedova SA et al. Issledovanie lizata trombocitov cheloveka kak perspektivnoj rostovoj dobavki dlja kul'tivirovaniya stvolovyh i drugih tipov kletok. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine*. 2013; 3: 153–158. (In Russ).
31. Немец ЕА, Белов ВЮ, Ильина ТС, Сургученко ВА, Панкина АП, Севастьянов ВИ. Композитный пористый трубчатый биополимерный матрикс малого диаметра. *Перспективные материалы*. 2018; 9: 49–59. Nemets EA, Belov VYu, Ilina TS, Surguchenko VA, Pankina AP, Sevastianov VI. Composite porous tubular biopolymer matrix of small diameter. *Perspektivnye materialy*. 2018; 9: 49–59. (In Russ.). doi: 10.30791/1028-978X-2018-9-49-59.
32. Егорова ВА, Пономарева АС, Богданова НБ, Абрамов ВЮ, Севастьянов ВИ. Характеристика фенотипа мезенхимальных стволовых клеток из жировой тка-

- ни человека методом проточной цитометрии. *Технологии живых систем*. 2009; 6 (5): 40–46. Egorova VA, Ponomareva AS, Bogdanova NB, Abramov VYu, Sevastianov VI. Characterization of human adipose-derived stem cells phenotype by flow cytometry method. *Tehnologii zhivyyh system*. 2009; 6 (5): 40–46. (In Russ.).
33. Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Yang JQ, Heydarkhan S, Xu Y, Zuk PA et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 187 (4): 263–274. doi: 10.1159/000113407. PMID: 18196894.
 34. Zhang X, Simmons CA, Paul Santerre J. Paracrine signalling from monocytes enables desirable extracellular matrix accumulation and temporally appropriate phenotype of vascular smooth muscle cell-like cells derived from adipose stromal cells. *Acta Biomater*. 2020; 103: 129–141. doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.006. PMID: 31821896.
 35. Ciucurel EC, Sefton MV. Del-1 overexpression in endothelial cells increases vascular density in tissue-engineered implants containing endothelial cells and adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20 (7–8): 1235–1252. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0242. PMID: 24151812; PMCID: PMC3993021.
 36. ГОСТ ISO 10993-4-2020 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью. Дата введения 2021-03-01. М.: Стандартиформ, 2020. GOST ISO 10993-4-2020 Izdelija medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstvija medicinskih izdelij. Chast' 4. Issledovanie izdelij, vzaimodejstvujushhih s krov'ju. Data vvedenija 2021-03-01. M.: Standartinform, 2020.
 37. ГОСТ ISO 10993-12-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и контрольные образцы. Дата введения 2013-01-01. М.: Стандартиформ, 2014. GOST ISO 10993-12-2011 Izdelija medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstvija medicinskih izdelij. Chast' 12. Prigotovlenie prob i kontrol'nye obrazcy. Data vvedenija 2013-01-01. M.: Standartinform, 2014.
 38. ГОСТ ISO 10993-5-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. Дата введения 2013-01-01. М.: Стандартиформ, 2014. GOST ISO 10993-5-2011 Izdelija medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstvija medicinskih izdelij. Chast' 5. Issledovanie na citotoksichnost': metody *in vitro*. Data vvedenija 2013-01-01. M.: Standartinform, 2014.
 39. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 2012; 12 (9): 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.
 40. Smith RJ Jr, Yi T, Nasiri B, Breuer CK, Andreadis ST. Implantation of VEGF-functionalized cell-free vascular grafts: regenerative and immunological response. *FASEB J*. 2019; 33 (4): 5089–5100. doi: 10.1096/fj.201801856R. PMID: 30629890; PMCID: PMC6436645.

Статья поступила в редакцию 8.10.2021 г.
The article was submitted to the journal on 8.10.2021