

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-196-208

ФИБРИН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ СОСУДИСТОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В.Г. Матвеева, М.Ю. Ханова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараши

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская федерация

В данном обзоре свойства фибрина рассматриваются с позиции возможности использования в тканевой сосудистой инженерии (ТСИ). Аутологичный фибрин является одним из самых доступных биополимеров, поскольку с помощью несложных методик может быть получен из периферической крови. В обзоре даны описание и сравнительная характеристика методов и подходов получения фибринового геля. Способности фибрина поддерживать адгезию и миграцию, служить биологической клеточной нишей, контролировать ангиогенез, накапливать и дозированно высвобождать факторы роста являются уникальными и крайне полезными в ТСИ. Огромный потенциал формования позволяет получать сложные трехмерные формы, использовать фибрин как самостоятельный каркас или в качестве модифицирующего покрытия/пропитки. Фибриновые гели способны к полной биодеградации с помощью фибринолиза, но этот процесс должен хорошо контролироваться и быть предсказуемым. В обзоре обсуждаются основные способы регуляции скорости фибринолиза, а также возможные побочные эффекты такого воздействия. Низкая механическая прочность является главным ограничением использования фибрина в качестве основного каркаса в сосудистых протезах. В работе представлены возможные варианты повышения прочностных свойств фибриновой матрицы и дана оценка их эффективности. С учетом всех уникальных свойств и особенностей фибрин вполне может стать основой для идеального полностью аутологичного тканеинженерного сосудистого протеза малого диаметра.

Ключевые слова: тканевая сосудистая инженерия, фибрин, клеточный носитель, биополимер, аутологичный тканеинженерный сосудистый протез, фибринолиз, механическая прочность, имплантация.

FIBRIN – A PROMISING MATERIAL FOR VASCULAR TISSUE ENGINEERING

V.G. Matveeva, M.U. Khanova, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

This review looks at the use of fibrin in vascular tissue engineering (VTE). Autologous fibrin is one of the most affordable biopolymers because it can be obtained from peripheral blood by simple techniques. A description and comparative analysis of the methods and approaches for producing fibrin gel is provided. The ability of fibrin to promote cell attachment and migration, survival and angiogenesis, to accumulate growth factors and release them in a controlled manner, are unique and extremely useful in VTE. Fibrin gels can serve as a three-dimensional matrix molded in different sizes and shapes to be applied in a variety of ways, including as a scaffold, coating, or impregnation material. Fibrin's high porosity and biodegradability allows controllable release of growth factors, yet fibrinolysis must be tightly regulated to avoid side effects. We discuss the main methods of regulating the rate of fibrinolysis, as well as possible side effects of such exposure. Low mechanical strength is the main limitation in using fibrin as a scaffold for vascular tissue engineering. Possible options for increasing the strength properties of fibrin matrix and evaluating their effectiveness are presented. We propose that unique biocompatibility and ideal biodegradation profile of fibrin justify its use as a scaffold material for developing an ideal fully autologous small-diameter tissue-engineered vascular graft.

Keywords: vascular tissue engineering, fibrin, cell carrier, biopolymer, autologous tissue-engineered vascular graft, fibrinolysis, mechanical strength, implantation.

Для корреспонденции: Матвеева Вера Геннадьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6. Тел. (906) 927-66-01. E-mail: matveeva_vg@mail.ru

For correspondence: Matveeva Vera Gennadievna. Address: 6, Sosnoviy blv., Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (906) 927-66-01. E-mail: matveeva_vg@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Продолжается активный поиск идеального материала для тканевой сосудистой инженерии (ТСИ). Разработанные синтетические материалы, такие как дакрон или политетрафторэтилен (PTFE), полиэтилентерефталат (PET), с успехом используются в реконструкции сосудов большого диаметра, но малопригодны для создания протезов сосудов малого диаметра (менее 6 мм) по причине гипертрофии интимы и тромбоза вследствие неполной эндотелизации, низкой скорости кровотока и несовпадения комплаентности (диаметра сосуда и его адаптивных реакций на изменение артериального давления) [1]. Отсутствие эффективных протезов сосудов малого диаметра актуализирует поиск оригинальных стратегий, новых материалов и их модификаций.

Понимание значимости нормальных физиологических реакций сосудистой стенки в профилактике и борьбе с тромбозами, гиперплазией и воспалением сформировало целое направление в ТСИ, связанное с имитацией структуры и функции нативной артериальной стенки при разработке сосудистых протезов нового поколения. Среди наиболее перспективных подходов в ТСИ, связанных с максимальной имитацией внеклеточного матрикса (ВКМ) в сочетании с биологической функциональностью продукта, следует отметить заселение клетками биогелей и технологию биодеградируемых каркасов. В этих направлениях фибрин вызывает у исследователей особый интерес, поскольку он обладает набором уникальных характеристик, которые делают его практически идеальным природным биологическим материалом для ТСИ [2].

Фибрин формируется на конечном этапе коагуляционного каскада и представляет собой натуральную биодеградируемую матрицу. Биоматериалы на основе фибрина обладают идеальной биосовместимостью, имеют высокое сродство к различным биологическим поверхностям, контролируемой биодеградации посредством фибринолиза, при этом продукты биодеградации нетоксичны [3].

В настоящее время фибриновый гель активно используется в клинике для гемостатических целей, закрытия раневой поверхности и в качестве герметика. В ТИ ведутся поиски в области создания фибриновых матриксов в офтальмологии (восстановление склеры [4] и хрусталика [5]), в неврологии (восстановление нервных сплетений и периферических нервов [6]), в травматологии и ортопедии (восстановление хряща [7]), при создании искусственной кожи [8] и т. д. Будучи натуральным физиологическим каркасом, он поддерживает ангиогенез и репарацию тканей [9]. Волокна фибрина содержат сайты клеточной адгезии, которые создают платформу для адгезии, миграции и пролиферации клеток, условия для формирования

полноценной ткани [10]. Трехмерная пористая структура фибрина поддерживает миграцию клеток внутрь каркаса и их жизнедеятельность благодаря диффузии питательных веществ и кислорода внутрь фибринового каркаса и удалению отработанных продуктов [11]. Фибрин является самым доступным из всех полимеров. Фибриновые гели достаточно просто и в короткие сроки могут быть получены из собственной крови пациентов. Сформированные на его основе аутологичные скаффолды не имеют риска переноса различных патогенов и запуска иммунной реакции организма на инородное тело. Далее более подробно будут освещены свойства и особенности фибрина, имеющие принципиальное значение для ТСИ.

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

Фибрин – продукт полимеризации фибриногена как конечный этап коагуляционного каскада. Фибриноген представляет собой гетеродимер гликопротеина, который состоит из 3 пар идентичных цепей (α , β и γ). На первом этапе под действием фермента тромбина образуются активные одиночные молекулы фибрин-мономера, способные к полимеризации и формированию нитей фибрина (рис. 1). Ионы кальция служат ключевыми кофакторами в ферментативном превращении фибриногена в фибрин. На этом этапе фибрин растворяется в 5М мочеvine, поэтому он получил название растворимого фибрина.

Одновременно тромбин активирует XIII фактор, который в присутствии ионов кальция (Ca^{2+}) образует латеральные ковалентные связи между D-доменами фибриновых мономеров. Латеральная агрегация фибриновых волокон приводит к их утолщению и повышению упруго-деформативных свойств [12]. Общие механические свойства фибрина определяются структурными особенностями на уровне молекул, отдельных волокон, а также разветвленности волокон в сети фибрина [13, 14]. Внесение XIII фактора в достаточной концентрации позволяет получить фибрин с хорошими биомеханическими свойствами [15, 16]. Высокая концентрация XIII также катализирует сшивание белков клеточной адгезии, что способствует повышению адгезионных свойств фибрина [17].

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕЦИПИТАТА ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

Аутологичный преципитат фибриногена получают из плазмы крови с помощью физических и химических методов. Криопреципитация относится к физическим методам преципитации и описана во многих источниках. При этом протоколы сильно отличаются по времени и температуре заморозки, а также температуре и времени оттаивания, количеству циклов заморозки–оттаивания. Химические методы в

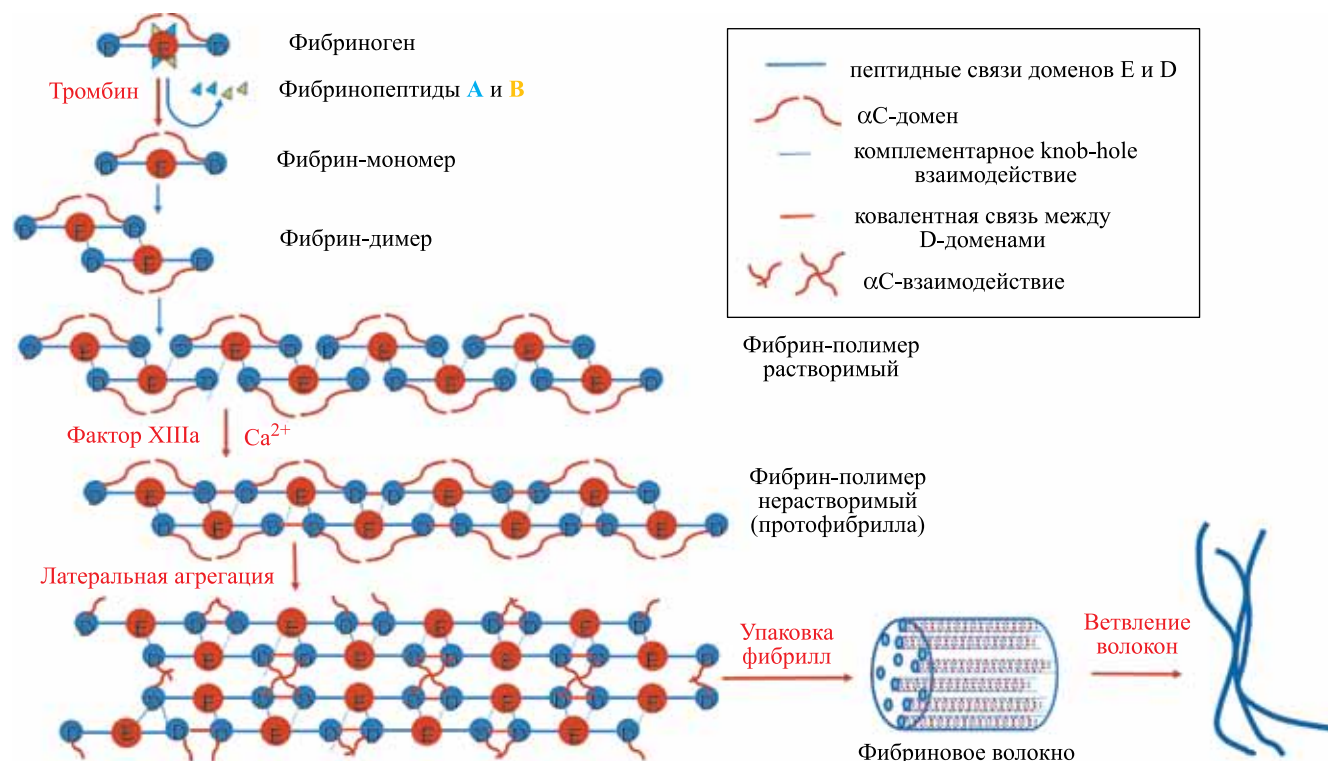


Рис. 1. Принципиальная схема полимеризации фибрина. Тромбин отщепляет от фибриногена фибринопептиды А и В, после чего открываются комплементарные участки на доменах Е и D для взаимодействия knob-hole. На этом этапе образуются олигомеры, которые удлиняются и формируют двухцепочечные растворимые фибрин-полимеры. Под действием XIIIa фактора в присутствии ионов кальция образуются ковалентные связи между D-доменами смежных мономеров фибрина. Сначала попарно сшиваются γ -цепи, далее α -цепи. На этом этапе фибрин-полимер становится нерастворимым и приобретает механическую прочность. Далее двухцепочечные молекулы фибрина (протофибриллы) латерально агрегируют, образуя волокна, процесс усиливается за счет α C-взаимодействий D-доменов. Удлинение и утолщение фибриновых волокон сопровождается их разветвлением, в результате выстраивается трехмерная фибриновая сеть

Fig. 1. Schematic diagram of the fibrin polymerization. Thrombin cleaves fibrinopeptides A and B from fibrinogen, after which the complementary regions on domains E and D open for knob-hole interaction. At this stage, the oligomers lengthen and form two-stranded soluble fibrin polymers. XIIIa factor in the presence of calcium ions covalently cross-links the D domains of neighboring fibrin monomers. Factor XIIIa crosslinks or ligates γ -chains more rapidly than α -chains. At this stage, the fibrin polymer becomes insoluble and obtain mechanical strength. Further, two-stranded fibrin molecules (protofibrils) laterally aggregate to make fibers, the process is enhanced by α C-interactions of D-domains. Elongation and thickening of fibrin fibers occurs at the same time with branching, as a result a three-dimensional fibrin network is formed

основном включают преципитацию аммония сульфатом и этанолом, также используют их сочетание [18, 19]. Фавориты методов преципитации (этаноловая, аммония сульфат и криопреципитация), по данным различных источников, отличаются, поскольку критерии оценок различны. В одних случаях преимущество отдается этаноловому методу, поскольку в преципитате выше концентрация фибриногена и меньше время, затраченное на его получение [20]. В других случаях лидером называют криопреципитацию, поскольку при достаточно высокой концентрации фибриногена механические свойства полученного фибрина выше [21], что связывают с частичной денатурацией белков при добавлении этанола или аммония сульфата с дальнейшим формированием неполноценных связей между фибрин-мономерами и рыхлости фибринового сгустка. Поэтому в зави-

симости от конечной цели используют различные технологии получения преципитата фибриногена.

В большинстве исследований фибриновый гель получают из преципитата фибрина путем внесения аутологичного или коммерческого тромбина и CaCl_2 [22, 23]. Tomomi Hasegawa и коллегами разработана и представлена бестромбиновая технология получения фибрина из фибриногена [24]. В данном варианте используется полимеризующая смесь, которая в сравнении с тромбином обладает низкой тромбогенностью, а при сравнении с коммерческим тромбином не активирует иммунный ответ [25].

ЕСТЕСТВЕННАЯ И КОНТРОЛИРУЕМАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ФИБРИНА

Фибриновые гели обладают преимуществом полностью биodeградируемого полимера с возможнос-

тью регуляции скорости деградации. В нормальной биологической среде нити фибрина деградируют с помощью фибринолиза. В процессе фибринолиза неактивный плазминоген под действием внешней (тканевой активатор плазминогена (tPA) и активатор плазминогена типа урокиназы (uPA) и внутренней (XIIa фактор, калликреин) ферментативной активации превращается в протеолитически активный фермент плазмин [26] (рис. 2). Плазмин асимметрично расщепляет фибрин на отдельные фрагменты: «ранние» крупномолекулярные продукты фибринолиза фрагменты X и Y и «поздние» фрагменты D и E. Фибринолиз вызывает деградацию фибринового геля с формированием нетоксичных продуктов, однако внутренняя нестабильность фибрина рассматривается как основная трудность при его использовании в качестве основного каркасного материала или покрытия ТИ конструкций [27]. Помимо плазмينا в деградации фибрина участвуют различные протеазы, в частности, важная роль в этом процессе отводится матриксным металлопротеиназам мембранного типа (MT-MMP) [28].

С возможностью регуляции скорости фибринолиза напрямую связан успех имплантации ТИС. В естественных условиях фибрин разлагается в течение нескольких дней или недель, при этом скорость фибринолиза зависит от структуры фибрина, особенностей сшивки и содержания ингибиторов

протеаз [29]. Долгосрочная стабильность и механическая целостность матрицы играют важную роль для клеток, которым необходимо определенное время и достаточная прочность каркаса, чтобы ремоделировать матрицу. Фибриновые матрицы постепенно заменяются зрелым коллагеном, который синтезируют клетки, заселившие толщу и поверхность матрицы (фибробласты, ЭК/ЭПК и ГМК) [27, 30].

Для контроля над процессом деградации фибрина используют два подхода: дополнительная поперечная сшивка нитей фибрина и применение ингибиторов фибринолиза [31]. Дополнительная поперечная сшивка нитей фибрина достигается с помощью XIII фактора, который кроме латерального ковалентного связывания между γ - и α -цепями фибрина осуществляет перекрестное сшивание с фибрином таких молекул как $\alpha 2$ -антиплазмин, TAFI (активируемый тромбином ингибитор фибринолиза), PAI-2 (ингибитор активации плазминогена 2 типа), что стабилизирует фибриновую сеть и повышает устойчивость сшитого фибрина к фибринолизу [32, 33].

При создании фибриновых покрытий и каркасов на основе фибрина в качестве протеолитического ингибитора в основном используют апротинин, а в качестве фибринолитического ингибитора ϵ -аминокапроновую кислоту (ЭАКК). Вопрос влияния данных ингибиторов на жизнедеятельность, пролиферативную и функциональную активность

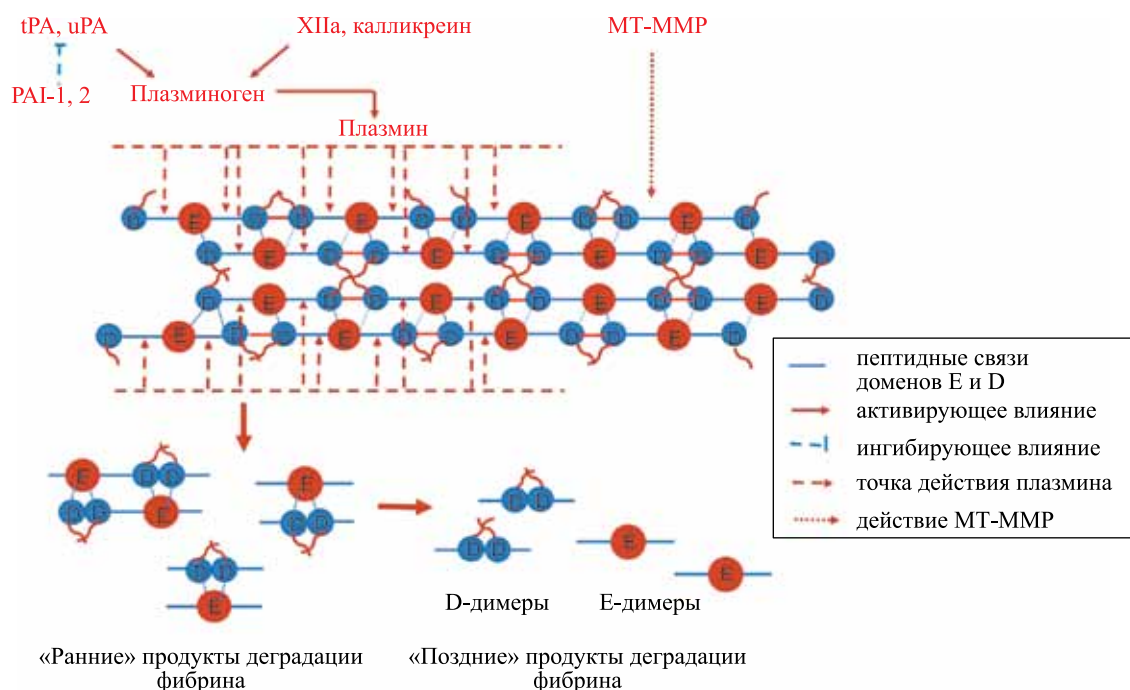


Рис. 2. Принципиальная схема фибринолиза. MT-MMP – матриксные металлопротеиназы мембранного типа; tPA – тканевой активатор плазминогена; uPA – урокиназный активатор плазминогена; PAI – ингибитор активатора плазминогена; D – D-домен; E – E-домен

Fig. 2. Schematic diagram of fibrinolysis. MT-MMP – membrane-type matrix metalloproteinases; tPA – tissue plasminogen activator; uPA – urokinase plasminogen activator; PAI – plasminogen activator inhibitor; D – D-domain; E – E-domain

клеток весьма важен, поскольку от этого зависит эффективность синтеза коллагена и формирование полноценной ткани. К сожалению, на этот вопрос пока нет однозначного ответа. Имеются сообщения как о положительном влиянии ингибиторов на жизнедеятельность клеток [34], так и о неблагоприятных результатах [30] и отсутствии эффектов вообще [35]. В работе Grassl et al. протестирован широкий диапазон концентраций ЭАКК и показано отсутствие влияния на синтез коллагена ГМК, заселенных на фибриновую трубчатую конструкцию [35]. Противоположные результаты представлены Mol et al. [30], в которых использование ЭАКК ингибировало формирование ВКМ, но не препятствовало пролиферации миофибробластов (МФБ) вены человека. Эти выводы были основаны на гистологической оценке тканевых конструкций после культивирования образцов в статических условиях от 2 до 6 недель. Коллагеновые волокна в образцах с ЭАКК не определялись на всех сроках культивирования. Исследователи предполагают, что ингибирующий эффект ЭАКК на формирование коллагеновых волокон связан с тем, что ЭАКК является синтетическим аналогом лизина и может выступать в качестве конкурентного остатка, блокирующего ковалентное сшивание молекул коллагена.

Также нет единого мнения среди ученых в отношении влияния апротинина на жизнедеятельность клеток. Описано как усиление синтеза коллагена МФБ и потенцирование развития тканей при увеличении концентрации апротинина [34], так и отсутствие его влияния на формирование клетками ВКМ, в частности на синтез коллагена IV типа и ламинина [36]. По мнению Mühleder et al. [36], стабилизация фибрина с помощью апротинина вызывает нарушение ангиогенеза и формирования трубчатых 3D-структур. Механизм данного эффекта авторы связывают с ингибированием фибринолиза. Тем не менее прямого влияния апротинина на ангиогенные свойства ЭК не обнаружено, поскольку в случае культивирования клеток без фибрина присутствие апротинина в питательной среде усиливает ангиогенез [37]. Описано влияние различных концентраций апротинина на вазореактивные (контрактильность/дилатация) и механические свойства ТИ протезов сосудов малого диаметра на основе фибрина [38]. По данным Swartz et al., апротинин повышает плотность заселения клеток и физико-механические свойства ТИС, но лишь за счет сохранения структуры фибриновой матрицы. Отмечено разнонаправленное влияние апротинина на вазореактивность ТИС. С одной стороны, он усиливает способность ТИС к вазодилатации, но одновременно снижает рецептор-опосредованную и нерепцепторную вазоконстрикцию [38].

Столь разноречивые мнения о влиянии ингибиторов фибринолиза на свойства фибрина и поведение

клеток не позволяют сформировать однозначные выводы и требуют дальнейшего всестороннего изучения.

ФИБРИН КАК КЛЕТОЧНЫЙ НОСИТЕЛЬ, ВОЗМОЖНОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО СВОЙСТВ

Важным моментом ТСИ является разработка трехмерного каркаса, имитирующего ВКМ, который способствует адгезии, пролиферации, миграции клеток и формированию полноценной ткани. Фибрин имитирует ВКМ и оказывает не только физическую поддержку клеток, но и действует как биомиметическая ниша, индуцируя биохимические и биофизические сигналы, регулирующие поведение клеток. Трехмерная фибриновая матрица имеет нанометрическую волокнистую структуру, которая включает микропористость и макропористость. Поры обеспечивают клеткам доставку питательных веществ и возможность миграции и колонизации [39]. Известно, что фибрин поддерживает экспансию, миграцию и пролиферацию различных типов клеток, включая ЭК [40], ЭПК [39], фибробласты [41], МФБ [11], мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [42]. Структура и физико-механические свойства фибринового геля зависят от концентрации фибриногена и тромбина [39, 43]. При низкой активности или концентрации тромбина нет полного отделения фибринопептидов А и В от фибриногена, соответственно, не формируются полноценные нити фибрина и увеличивается время полимеризации, что сильно влияет на прочность матрикса. В случаях достаточной концентрации или активности тромбина размер пор и проницаемость фибринового носителя зависит от концентрации фибриногена. Так, увеличение концентрации фибриногена в диапазоне от 5 до 20 мг/мл снижает размер пор и проницаемость матрицы, но повышает ее прочность и жесткость [39, 43]. Однако слишком мелкие поры препятствуют миграции клеток в толщу матрикса и ухудшают их рост и выживаемость за счет снижения проницаемости и перфузии питательных веществ. Для ЭК, располагающихся на поверхности матрикса, изменения размера пор не оказывают столь значимого влияния на жизнедеятельность. Поэтому в зависимости от целей и задач оптимальная концентрация фибриногена должна подбираться индивидуально.

Kurniawan et al. показали, что буфер, который ранее считали инертным, значительно влияет на самосборку фибрина и проницаемость геля [44]. Буферные агенты, контролируемые рН среды, не влияют на первоначальную сборку фибрин-мономеров в протофибриллы, но сильно препятствуют дальнейшей латеральной ассоциации протофибрилл в более толстые волокна фибрина. Опосредованное буфером нарушение связывания протофибрилл вызывает заметное снижение проницаемости фибри-

новых сетей, но не оказывает значимого эффекта на модуль упругости [44].

Кроме концентрации фибриногена, фибрина и рН буфера на структурные свойства фибрина влияет концентрация ионов кальция (Ca^{2+}). Фибриновые гели с конечной концентрацией фибриногена 25 мг/мл и выше, концентрацией Ca^{2+} 20 мМ и рН между 6,8 и 9 обладают прозрачностью и стабильностью [27]. При использовании компонентов фибрина вне этих диапазонов формируется мутный гель, который полностью деградирует в течение нескольких недель.

Оптимальное соотношение фибриноген/тромбин позволяет получать фибрин, который поддерживает рост ЭПК и их дифференцировку в направлении эндотелиального фенотипа с высокими ангиогенными свойствами [39]. Отмечено преимущество фибринового носителя по сравнению с фибронектиновым. Показано, что жизнеспособность, дифференцировка и ангиогенные свойства ЭПК на фибрине выше по сравнению с фибронектином. Кроме того, фибрин способен поддерживать функционально активными большее количество клеток в течение более длительного времени [39].

Распределение и распространение клеток на матрицах является важным аспектом для эффективного формирования ткани. Известно, что высокая однородность распределения клеток обуславливает высокий синтез белков ВКМ [30]. Поэтому принципиальное значение имеет иерархичность и равномерность распределения клеток по всему объему скаффолда. В работе T. Areg et al. показано [11], что сокультуры ЭК и МФБ человека при заселении на композитную матрицу, состоящую из фибрина и каркаса из полилактина, формировали иерархическую структуру с равномерным монослоем ЭК на поверхности и проникновении МФБ в толщу каркаса, соответственно структуре нативного сосуда. Миграция клеток с сохранением их жизнеспособности, по данным авторов, составляет 519 ± 27 мкм. В более глубоких слоях фибрина живых клеток не было обнаружено, что связывают с недостаточным снабжением кислородом и питательными веществами. Другие исследования показали трехмерное распространение заселенных фибробластов в фибрине на глубину до 3 мм [30, 45]. Средняя толщина стенки коронарной артерии человека имеет диапазон от 390 до 1300 мкм, следовательно, максимальная глубина, обеспечивающая жизнеспособность МФБ в фибриновой матрице, позволит создать сосуд малого диаметра. Таким образом, фибриновый гель как клеточный носитель в зависимости от типа клеток обеспечивает их иерархичное и равномерное распределение, способствует свободной миграции и пролиферации на поверхности и внутри матрицы. Это позволит быстро и эффективно заселить фибрин и сформировать компактный состав. Кроме того, клеточный синтез белков ВКМ

внутри матрицы предотвращает вымывание растворимых компонентов и обуславливает созревание ВКМ в короткие сроки.

Хорошая эластичность фибринового геля является еще одним важным аспектом его эффективности как клеточного носителя. Эластичность определяет функциональные характеристики клеток, влияет на динамику ангиогенеза, регулирует миграцию и силу трекции клеток [46]. Фибрин обладает как эластичными, так и вязкими свойствами, которые напрямую связаны с деформацией сдвига. В свою очередь, деформация сдвига индуцирует запуск комплекса сигнальной механотрансдукции, регулирующей адаптацию клеток к их физическому окружению. Фибриновые волокна необычайно растяжимы и эластичны [47], что выгодно отличает фибрин от других белковых волокон [48].

ФИБРИН КАК НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ РЕГУЛЯТОР АНГИОГЕНЕЗА

В процессе заживления раны фибриновый сгусток не только ограничивает кровопотерю, но обеспечивает высвобождение ряда факторов, стимулирующих формирование новых кровеносных сосудов. Классическая модель заживления ран признает активную роль клеток, которые влияют на поведение других клеток посредством сигнальной трансдукции, но при этом ВКМ отводится пассивная роль основы [49, 50]. В настоящее время доказано, что фибриновая матрица принимает прямое участие в регуляции ангиогенеза, колонизации и инвазии клетками [51]. Структура матрицы содержит не только сайты для связывания клеточных интегринов, но также определяет скорость и степень протеолитической деградации матрицы, вызываемой непосредственно самими клетками [52]. Фактором, регулирующим и контролирующим колонизацию и инвазию фибрина ЭК, является фибринолиз, который в свою очередь определяется активностью металлопротеиназной и плазминовой системы [51]. Гемостаз и ангиогенез являются двумя взаимосвязанными физиологическими процессами, которые действуют сбалансированно и гармонично для восстановления микроциркуляции после повреждения сосудов [50]. Непосредственно после травмы чрезвычайно важно предотвратить чрезмерное кровотечение, и для этого необходима эффективная коагуляция. Начало ангиогенеза на этой стадии непродуктивно и преждевременно, поскольку новообразованные сосуды хрупки и нестабильны [53]. Поэтому процессы тромбообразования и ангиогенеза строго контролируются, и ангиогенез запускается только после того, как гемостаз был благополучно завершен. Доказательства непосредственного влияния фибрина на ангиогенез представлены в работе Hadjipanayi et al. [54]. Фибрин связывает многие про-

и антиангиогенные факторы, высвобождающиеся после коагуляции (трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбоцитарный фактор 4 (PF4), тромбоспондин 1 (TSP1) [55], и принимает прямое участие в контролируемом высвобождении этих факторов и регуляции ангиогенеза. Механизм тонкой регуляции тесно связан с процессом фибринолиза и гемостаза. На ранних этапах фибриновый сгусток выполняет гемостатическую функцию и контролируется высвобождает ангиогенные ингибиторы, при этом с помощью хемотаксических факторов способствует привлечению и миграции ЭК. На этапе сформированного фибринового сгустка и активации фибринолитических процессов фибрин дозированно повышает высвобождение проангиогенных факторов и снижает выход антиангиогенных, формируя условия для эффективного ангиогенеза.

ФИБРИН КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ФАКТОРОВ РОСТА

Фибрин является самостоятельным регулятором поведения клеток. Во время морфогенеза и заживления тканей высвобождение ростовых факторов (РФ) из ВКМ имеет решающее значение для привлечения клеток, регуляции зональности их распределения и передачи сигналов [56, 57]. При этом для правильного формирования ткани высвобождение РФ должно быть точно сбалансировано.

Фибриноген и фибрин через гепарин-связывающий домен способны неспецифически с высокой афинностью связывать и длительно удерживать РФ различных семейств (PDGF, VEGF, FGF, TGF- β) [55, 58]. Не связанные с фибриногеном/фибрином РФ быстро элюируют из фибриновой матрицы, тогда как связанные длительно удерживаются и медленно высвобождаются. Неспецифическое высокоафинное сродство фибрина к РФ играет важную роль в восстановлении поврежденных тканей, поскольку фибрин действует как резервуар для доставки ростовых факторов, способствуя репарации и заживлению.

Замедления процесса высвобождения РФ можно добиться путем прессования фибрина, что одновременно увеличивает плотность каркаса и повышает физико-механические свойства конструкции [53]. Другой способ повысить содержание РФ в фибрине связан с использованием богатой тромбоцитами плазмы при изготовлении матрицы. Тромбоциты содержат большое количество РФ, таких как PDGF, TGF-b1 и TGF-b2, FGF, VEGF и инсулиноподобный фактор роста (IGF), которые стимулируют пролиферацию клеток, ремоделирование матрикса и ангиогенез [54]. Использование тромбоцитарного концентрата при формировании фибриновой матрицы

является интересным вариантом для оптимизации заживления тканей [55], но не подходит для создания протезов сосудов, поскольку усиливает тромбогенность конструкции. Кроме физиологической способности фибрина связывать и высвобождать РФ фибриновый гель/матрикс позволяет инкорпорировать факторы роста, биоактивные пептиды и белки [56], что открывает дополнительные возможности направленной дифференцировки и влияния на жизнедеятельность заселенных клеток.

ВАЗОРЕАКТИВНОСТЬ ТИС НА ОСНОВЕ ФИБРИНА

Идеальный ТИС-протез должен адаптироваться к изменяющимся условиям кровотока, т. е. проявлять вазореактивность. Основным элементом вазореактивности являются ГМК, которые способны отвечать на контрактильные и дилатационные стимулы. Благодаря контрактильным свойствам и правильному радиальному расположению сосудистых ГМК не только создаются условия для повышения прочности и стабильности каркаса, но и приобретает вазореактивность всей конструкции. Swartz et al. изучали свойства ТИС малого диаметра на основе фибрина, заселенного ГМК и ЭК [32]. Способность ТИС к констрикции и расслаблению оценивали после воздействия различных вазоактивных веществ на кольцевые сегменты конструкции. Значительную механическую прочность и вазореактивность ТИС достигали уже через 2 недели созревания в статических условиях. После имплантации продолжался процесс ремоделирования с повышением механической прочности и сосудистой реактивности.

ФИБРИН ПОВЫШАЕТ СОПРОТИВЛЕНИЕ КЛЕТОК К НАПРЯЖЕНИЮ СДВИГА

ЭК играют решающую роль в биологии сосудов и выполняют различные функции: служат селективным барьером проницаемости, участвуют в регуляции тромбообразования и тромболизиса, адгезии тромбоцитов, модуляции тонуса сосудов, регуляции иммунного и воспалительного ответа, механотрансдукции. Потеря ЭК вызывает локальную активацию патофизиологического каскада, приводящего к гиперплазии неоинтимы [59]. Поэтому формирование и поддержание функционального, атромбогенного эндотелиального монослоя является ключевым требованием при создании ТИС.

В физиологических условиях ЭК подвергаются сложному механическому воздействию, которое включает напряжение сдвига, давление и радиальное растяжение. Известно, что более 70% ЕС, заселенных на синтетический каркас, смываются в течение первых 20 минут после имплантации и этот процесс усугубляется при повышении уровня напря-

жения сдвига [60]. Покрытие конструкции адгезивными белками дает возможность ЭК противостоять потоку. В качестве адгезивных белков используют фибронектин, коллаген, желатин, цельный ВКМ и фибрин. Наиболее полная сравнительная характеристика эффективности удержания клеток на поверхности сосудистого протеза, покрытого различными видами адгезивных белков, представлена в работе Chlupáč et al. [23]. Исследователи тестировали способность к удержанию ЭК человека на коммерческих протезах из PET с коллагеном I типа и таких же протезах, дополнительно покрытых ламинином, фибрином и фибрином/фибронектином. Эффективность заселения клеток через 4 часа внутривагинального культивирования в условиях ротации составила 22–30% от внесенного количества и существенно не различалась в протезах с покрытием и без покрытия. После 3-дневного созревания заселенных протезов в статичных условиях их помещали в биореактор. Значительная и прогрессирующая во времени потеря клеток наблюдалась на коммерческом и покрытом ламинином протезах. При тех же условиях с поверхности протезов, обработанных фибрином и фибрином/фибронектином, происходила менее значимая потеря клеток, а к 120 мин отмечался даже рост их количества. Повышение содержания ЭК на поверхности, обработанной фибрином или фибрином/фибронектином, исследователи связывают с началом пролиферации клеток.

В адгезии к фибронектину и фибрину вовлечены интегриновые рецепторы $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$ [61], которые играют решающую роль в адаптации ЭК к гемодинамическим усилиям, их активация запускает внутриклеточную передачу сигналов и изменение экспрессии генов, активирующих ангиогенез и пролиферацию [62]. Указанные рецепторы не задействованы при адгезии ЭК к коллагену и ламинину [61], что подчеркивает преимущество взаимодействия ЭК с фибрином для формирования желаемых клеточных ответов. Способность фибрина удерживать ЭК при напряжении сдвига не зависит от вида полимерной основы (PET, PTFE, ePTFE), а также способа использования фибрина (покрытие для полимеров или как самостоятельный каркас) [63]. Полностью фибриновые скаффолды также позволяют получать эндотелизацию высокой плотности и поддерживать монослой в условиях физиологически значимого напряжения сдвига [63].

К сожалению, покрытие трансплантатов адгезивными белками (ВКМ, плазмой или фибронектином) помимо улучшения адгезии ЭК способствует адгезии и агрегации тромбоцитов и повышению риска тромбообразования. В сравнении с цельным ВКМ и желатином фибрин демонстрирует меньшую активацию и адгезию тромбоцитов на поверхности, и соответственно, меньшую тромбогенность [64].

Таким образом, фибрин является материалом выбора для поддержания эндотелизации ТИС в условиях пульсирующего кровотока.

ФОРМОВАНИЕ ФИБРИНА

Полимеризация фибрина происходит в течение определенного промежутка времени, что имеет свои положительные аспекты при создании ТИ-конструкций. Существуют различные технологии изготовления скаффолдов: заливка формы для создания трехмерной пористой структуры и пропитывание каркаса для модификации или для формирования фибринового покрытия.

В первом варианте в желаемую форму заливают компоненты фибрина, позволяющие им полимеризоваться, и далее готовую конструкцию высвобождают из формы. Благодаря первоначальной текучести смеси компонентов при формировании фибрина возможно получение точных и сложных форм, например, клапаны и сложные сосуды с боковыми ответвлениями [65]. Свойство текучести позволяет пропитывать различные виды каркасов, что создает на поверхности стабильный фибриновый слой и придает конструкции новые желательные свойства [23]. Кроме того, введение культуры клеток в состав суспензии или раствора перед смешиванием и полимеризацией благоприятствует равномерному распределению клеток в залитых матрицах. Благодаря исключительно благоприятным свойствам фибрина для заселения клеток и дальнейшего ремоделирования в организме активно разрабатываются технологии изготовления фибриновых протезов сосудов малого диаметра с помощью заливки [15].

Однако использование только фибрина в качестве основы ТИС наталкивается на главную проблему – недостаточную механическую прочность фибриновых гелей, для того чтобы противостоять физиологической динамической нагрузке *in vivo*.

НИЗКАЯ МЕХАНИЧЕСКАЯ ПРОЧНОСТЬ ФИБРИНА, ВАРИАНТЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ

Применяемые техники повышения механической прочности фибриновых гелей включают два направления: повышение прочностных свойств непосредственно самого фибрина и создание каркаса или гибридикация с полимерами/тканями.

Воздействие на фибрин с целью улучшения прочностных характеристик включает несколько вариантов: повышение концентрации фибриногена и тромбина (описано выше), сшивание волокон фибрина XIIIa фактором, уплотнение структуры фибрина с помощью центробежной силы или компрессии, заселение фибрина клетками при последующем созревании в биореакторе или статике. В работах по созданию ТИС используют как отдельные, так и сочетание нескольких методов [15, 16].

Сшивание XIIIa фактором не только препятствует фибринолизу, но и увеличивает прочностные характеристики фибринового сгустка. С помощью XIIIa фактора возможно повышение модуля упругости волокон фибрина более чем в 8 раз и предела прочности в 4,5 раза [12, 16].

Улучшению физико-механических свойства фибринового сгустка в определенной степени способствует механическое воздействие во время полимеризации. Под действием непрерывных колебательных сил достаточной интенсивности формируется более жесткая и прочная фибриновая матрица по сравнению с аналогичными матрицами, не подвергнутыми механическому давлению [66]. Thomas Areg и группа исследователей представили технологию высокоскоростного центробежного формования, благодаря которой значительно увеличивалась биомеханическая стабильность фибриновых трубчатых каркасов при увеличении скорости вращения пресс-формы от 1000 до 15 000 об/мин [15]. Основной принцип центробежного формования связан с удалением избыточной жидкости, составляющей более 80% объема фибриновой матрицы, происходящее при этом уплотнение фибринового сгустка способствует увеличению сшивания фибриновых волокон. Замечено, что изолированное центробежное формование менее эффективно, чем сочетание аналогичных параметров центробежной силы и сшивание XIIIa фактором. Более того, введение ЭК и ГМК в состав фибрина наряду с добавлением XIIIa фактора дополнительно повышает прочность трубчатой фибриновой конструкции [15].

Заселение фибробластами, ГМК и ЭК фибриновой конструкции способствует укреплению стенки за счет формирования клеточных взаимодействий, синтеза белков ВКМ. Однако для улучшения физико-механических свойств после заселения клетками *in vitro* должен пройти период созревания конструкции в статических или динамических условиях. Условия пульсирующего потока ускоряют и повышают эффективность созревания фибриновых конструкций. Кондиционирование в условиях пульсирующего биореактора фибринового каркаса, заселенного фибробластами, за 7 недель усиливает прочность конструкции до параметров нативной артерии [67].

Недостаточная прочность и жесткость фибриновых матриц тесно перекликается с проблемой усадки фибрина [65]. Воздействие пульсирующего потока на заселенную клетками фибриновую конструкцию снижает процент усадки фибрина [68]. Пульсирующий поток стимулирует экспрессию белков цитоскелета, выравнивает заселенные клетки по направлению потока, а также значительно увеличивает синтез и накопление белков ВКМ, это повышает прочностные и упругие свойства матрицы, активиру-

ет ремоделирование и создает резистентный каркас, препятствующий усадке [68].

Формирование укрепляющего полимерного каркаса или армирующей сетки в фибриновой основе не только улучшает прочностные характеристики, но и сокращает период созревания фибриновой конструкции. Так, создание быстро разлагающегося каркаса из полигликолевой кислоты с поли-4-гидроксипропаном на фибриновой основе, заселенной МФБ, снизило время подготовки до 4 недель [69]. Через 4 недели динамической деформации *in vitro* механические характеристики ТИС приобрели показатели, сопоставимые с внутренней маммарной артерией (давление на разрыв 903 ± 123 мм рт. ст.). Более короткий период подготовки описан при усилении стенки аутологичного фибринового сосудистого протеза, заселенного МФБ, армирующей сеткой из поливинилиденфторида (PVDF) [70]. За 2 недели пребывания конструкции в условиях биореактора с физиологическими параметрами скорости потока и градиента давления удалось повысить среднюю прочность удерживания шва до 6,3 N, а прочность на разрыв до 236 мм рт. ст. Одновременно в матрице фибринового геля отмечалось хорошее развитие тканей и высокое сходство с нативными сосудами.

Армированные фибриновые ТИС малого диаметра после имплантации показывают очень обнадеживающие результаты: высокую проходимость, отсутствие кальцификации и аневризм, признаки активного ремоделирования стенки (присутствие ГМК и зрелых аутологичных белков ВКМ) и формирование монослоя ЭК на внутренней поверхности протеза [71].

При изготовлении сосудистых протезов все большую популярность завоевывает метод электроспиннинга, позволяющий формировать наноразмерные волокна и создавать пористую структуру каркаса. Предложен вариант изготовления фибринового каркаса, укрепленного ультратонкой волокнистой оболочкой из поли-ε-капролактона (PCL) с использованием электроспиннинга, который дает возможность за 1 неделю получить готовый к имплантации протез сосудов малого диаметра [72]. Через неделю имплантации мышам эти протезы приобрели прочностные свойства, аналогичные нативной артерии. Опосредованное фибрином клеточное ремоделирование, стабильная интима, обильное отложение матрикса с организованными слоями коллагена и эластиновыми волокнами формировались уже с 4-й недели имплантации. Графты показали высокую проходимость, низкие тромбогенность и склонность к кальцификации. Данная технология имеет многообещающую перспективу развития, но требует дополнительных исследований на крупных животных с удлинением сроков имплантации.

Концепция гибридных скаффолдов, сочетающих в себе преимущества натуральных и синтетических материалов, очень привлекательна и кажется эффективной. Покрытия на поверхности полимеров и децеллюляризованных тканей призваны создать сайты клеточной адгезии и повысить биосовместимость, при этом фибриновому покрытию уделяется большое внимание. В данной технологии формование и основную механическую нагрузку несет полимерный каркас или децеллюляризованная ткань, а фибриновое покрытие создает на поверхности биосовместимый слой, что облегчает клеточную инвазию и рост. Хорошая проникающая способность фибринового геля, крепкое сцепление с рельефной или пористой поверхностью после полимеризации позволяют использовать фибрин в качестве покрытия или пропитки каркасов из различных полимерных материалов или ксеногенной ткани [23, 71, 73]. В качестве полимерной основы биомиметического гибридного каркаса с биологическими свойствами фибрина используют пористый PCL [74], полилактид [71], PET [23], PTFE/дакрон [75]. Для сохранения механических свойств и улучшения биосовместимости разрабатывают биологические композитные каркасы на основе децеллюляризованных артерий, покрытых фибриновым гелем [73]. Предлагается изготавливать гибридный каркас путем нанесения аэрозольного фибринового геля на внутреннюю и наружную поверхности децеллюляризованных артерий с последующим заселением клетками (МФБ и ЭК). При этом способе децеллюляризованные волокна сонной артерии оказываются тесно переплетены с волокнами фибринового геля, а слои прочно связаны между собой. Полученные гибридные каркасы/сосудистые трансплантаты и нативные артерии демонстрируют схожие физико-механические характеристики [73].

Таким образом, уплотненный и армированный фибрин, а также гибридные варианты каркасов являются потенциальными основами для создания эффективных протезов сосудов малого диаметра.

ВОЗМОЖНОСТЬ СОЗДАНИЯ АУТОЛОГИЧНОГО ПРОТЕЗА НА ОСНОВЕ ФИБРИНА

Одной из главных целей в ТСИ является создание полностью аутологичного протеза сосудов малого диаметра. Открытие сосудистых ЭПК позволяет получать чистые культуры аутологичных ЭК даже от пациентов с ССЗ. ЭПК могут быть получены из собственной периферической крови. Увеличение количества ЭПК в ответ на сосудистое механическое повреждение, гипоксию и ишемию расширяет возможность выделения ЭК из крови, которая представляет собой наиболее доступный, постоянный и неистощимый источник аутологичных колони-

формирующих ЭК (КФЭК) (Endothelial Colony Forming Cells – ECFCs) [76, 77]. Кроме того, из крови возможно изолировать колониформирующие ГМК (КФГМК) (Late Outgrowth Smooth Muscle Cells – LOSMC) [78, 79], необходимые для заселения стенки сосудистого протеза.

Aper et al. удалось получить полностью аутологичный ТСИ-протез, объединив все три составляющие: фибриновый каркас, КФЭК и КФГМК [15]. Для получения высококомпактного фибринового матрикса с удовлетворительными физико-механическими свойствами использовали сшивание XIIIa фактором, высокоскоростное центробежное формование, заселение КФЭК и гладкомышечными клетками КФГМК, которые были изолированы из периферической крови. Конструкция имплантировалась овцам сроком на 1 и 6 месяцев. В результате активного ремоделирования стенки протеза через 6 месяцев имплантации сформировалась структура, схожая с нативной артерией. Фибрин был замещен вновь синтезированными белками ВКМ, обнаружено врастание клеток и капилляров из окружающей ткани в имплантированные сегменты, в итоге биомеханические свойства стали соответствовать свойствам нативной артерии. Несмотря на очевидный успех, прочностные свойства протезов до имплантации не в полной мере соответствовали нативной артерии, и одна из овец умерла от разрыва протеза в процессе операции. Возможным решением проблемы может стать дополнительное введение этапа созревания фибриновой заселенной конструкции в условиях биореактора, что несколько увеличит время подготовки конструкции к имплантации. Тем не менее результаты вселяют надежду, что из доступных источников собственных клеток и тканей пациента могут быть получены функциональные, полностью аутологичные сосудистые протезы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фибрин является перспективным материалом в ТСИ. Он имеет огромный потенциал формования, позволяющий получать сложные трехмерные формы. Фибриновый каркас обладает уникальными инструментами для адгезии, миграции и удержания клеток в условиях напряжения сдвига, способен контролировать ангиогенез, накапливать и дозированно высвобождать факторы роста. Возможность контролировать биodeградацию и морфобиологические свойства фибрина позволяют подбирать и сохранять требуемые характеристики. Перечисленные преимущества фибрина в сочетании с доступностью источника и отсутствием иммунного ответа после имплантации делают его идеальным каркасом для создания ТИС-графтов. Фибриновый гель обладает внутренним потенциалом, превосходя во многом другие матричные материалы, за исключением механической прочности. Во всем мире продолжают поиски способов

повышения механической прочности фибриновых матриц, при этом технология гибридных скаффолдов или армирования фибрина может стать одним из вариантов решения данной проблемы. Кроме того, на основе фибрина возможно создание полностью аутологичного ТИ-сосудистого протеза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Best C, Strouse R, Hor K et al. Toward a patient-specific tissue engineered vascular graft. *J Tissue Eng.* 2018; 9: 2041731418764709. doi: 10.1177/2041731418764709.
2. Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *The Scientific World Journal* 2015; Article ID 685690: 10 p. doi: 10.1155/2015/685690.
3. Park CH, Woo KM. 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.
4. Scalcione C, Ortiz-Vaquerizas D, Said DG, Dua HS. Fibrin glue as agent for sealing corneal and conjunctival wound leaks. *Eye (Lond).* 2018; 32 (2): 463–466. doi: 10.1038/eye.2017.227.
5. Mohan S, John B, Rajan M et al. Glued intraocular lens implantation for eyes with inadequate capsular support: Analysis of the postoperative visual outcome. *Indian J Ophthalmol.* 2017; 65 (6): 472–476. doi: 10.4103/ijo.IJO_375_16.
6. Bhatnagar D, Bushman JS, Murthy NS et al. Fibrin glue as a stabilization strategy in peripheral nerve repair when using porous nerve guidance conduits. *J Mater Sci Mater Med.* 2017; 28 (5): 79. doi: 10.1007/s10856-017-5889-4.
7. de Barros CN, Miluzzi Yamada AL et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair – Experimental study and preliminary results. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 241 (13): 1410–1415. doi: 10.1177/1535370215597192.
8. Reddy KS, Chittoria RK, Babu P et al. Effectiveness of Fibrin Glue in Adherence of Skin Graft. *J Cutan Aesthet Surg.* 2017; 10 (2): 72–75. doi: 10.4103/JCAS.JCAS_100_16.
9. Morin KT, Tranquillo RT. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp Cell Res.* 2013; 319 (16): 2409–2417. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.06.006.
10. Podolnikova NP, Yakovlev S, Yakubenko VP et al. The interaction of integrin α IIb β 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.
11. Aper T, Teebken OE, Steinhoff G, Haverich A. Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28: 296–302. doi: 10.1016/j.ejvs.2004.05.016.
12. Collet JP, Moen JL, Veklich YI et al. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood.* 2005; 106 (12): 3824–3830. doi: 10.1182/blood-2005-05-2150.
13. Lim BB, Lee EH, Sotomayor M, Schulten K. Molecular basis of fibrin clot elasticity. *Structure.* 2008; 16: 449–459. doi: 10.1016/j.str.2007.12.019.
14. Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M. The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1030–1036. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x.
15. Aper T, Wilhelmi M, Gebhardt C et al. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomater.* 2016; 29: 21–32. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.012.
16. Dickneite G, Metzner HJ, Kroez M et al. The importance of factor XIII as a component of fibrin sealants. *J Surg Res.* 2002; 107 (2): 186–195.
17. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (8): 1894–1904. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
18. Siedentop KH, Harris DM, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. *Laryngoscope.* 1985 Sep; 95 (9 Pt 1): 1074–1076.
19. Ayman E Ismail. Purification of fibrinogen from human plasma. *Thromb Res.* 1987; 46 (1): 19–27. doi: 10.1016/0049-3848(87)90203-9.
20. Weis-Fogh US. Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in a tissue adhesive system. *Eur Surg Res.* 1988; 20 (5–6): 381–389. doi: 10.1159/000128789.
21. Aper T, Kolster M, Hilfiker A et al. Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012, 2: 3. doi: 10.4172/2155-9538.1000115.
22. Almelkar SI, Patwardhan AM, Divate SA et al. Fibrin matrix supports endothelial cell adhesion and migration in culture. *OA Biology.* 2014; 2 (1): 5.
23. Chlupáč J, Filová E, Riedel T et al. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res.* 2014; 63 (2): 167–177.
24. Hasegawa T, Okada K, Takano Y et al. Thrombin-free fibrin coating on small caliber vascular prostheses has high antithrombogenicity in rabbit model. *Artif Organs.* 2005; 29 (11): 880–886. doi: 10.1111/j.1525-1594.2005.00151.x.
25. Hasegawa T, Okada K, Takano Y et al. Autologous fibrin-coated small-caliber vascular prostheses improve antithrombogenicity by reducing immunologic response. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133 (5): 1268–1276, 1276.e1. doi: 10.1016/j.jtcvs.2006.12.049.
26. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews.* 2015; 29 (1): 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
27. Eyrich D, Brandl F, Appel B et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials.* 2007; 28: 55–65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.
28. Hotary KB, Yana I, Sabeh F et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-

- MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med*. 2002; 195 (3): 295–308. doi: 10.1084/jem.20010815.
29. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007; 28 (35): 5298–5306. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.020.
 30. Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG et al. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005; 26 (16): 3113–3121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.007.
 31. Schneider-Barthold C, Baganz S, Wilhelmi M et al. Hydrogels based on collagen and fibrin – frontiers and applications. *BioNanoMaterials*. 2016; 17 (1–2): 3–12. doi: 10.1515/bnm-2015-0025.
 32. Ritchie H, Lawrie LC, Crombie PW et al. Crosslinking of plasminogen activator inhibitor 2 and α 2-antiplasmin to fibrin(ogen). *J Biol Chem*. 2000; 275: 24915–24920. doi: 10.1074/jbc.M002901200.
 33. Valnickova Z, Enghild JJ. Human procarboxypeptidase U, or thrombinactivable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases: evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem*. 1998; 273: 27220–27224.
 34. Ye Q, Zund G, Benedikt P et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000; 17: 587–591. doi: 10.1016/s1010-7940(00)00373-0.
 35. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res*. 2003; A 66: 550–561. doi: 10.1002/jbm.a.10589.
 36. Mühleder S, Pill K, Schoupper M et al. The role of fibrinolysis inhibition in engineered vascular networks derived from endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 12; 9 (1): 35. doi: 10.1186/s13287-017-0764-2.
 37. Koutsoumpa M, Hatzia Apostolou M, Mikelis C et al. Aprotinin stimulates angiogenesis and human endothelial cell migration through the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Eur J Pharmacol*. 2009; 602: 245–249. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.11.046.
 38. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H1451–H146070. doi: 10.1152/ajp-heart.00479.2004.
 39. Barsotti MC, Magera A, Armani C et al. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell Prolif*. 2011; 44: 33–48. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00715.x.
 40. Almelkar SI, Patwardhan AM, Divate SA et al. Fibrin matrix supports endothelial cell adhesion and migration in culture. *OA Biology*. 2014; 14: 2 (1): 5.
 41. Pajorova J, Bacakova M, Musilkova J et al. Morphology of a fibrin nanocoating influences dermal fibroblast behavior. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 3367–3380. doi: 10.2147/IJN.S162644.
 42. Voss A, McCarthy MB, Allen D et al. Fibrin Scaffold as a Carrier for Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors in Shoulder Rotator Cuff Repair. *Arthrosc Tech*. 2016; 5 (3): e447–e451. doi: 10.1016/j.eats.2016.01.029.
 43. Chiu CL, Hecht V, Duong H et al. Permeability of three-dimensional fibrin constructs corresponds to fibrinogen and thrombin concentrations. *Biores Open Access*. 2012; 1 (1): 34–40.
 44. Kurniawan NA, van Kempen TH, Sonneveld S et al. Buffers Strongly Modulate Fibrin Self-Assembly into Fibrous Networks. *Langmuir*. 2017; 27; 33 (25): 6342–6352.
 45. Jockenhoevel S, Chalabi K, Sachweh JS et al. Tissue engineering: complete autologous valve conduit – a new moulding technique. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2001a; 49: 287–290.
 46. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005; 310: 1139–1143.
 47. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA et al. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science*. 2006; 313: 634.
 48. Guthold M, Liu W, Sparks EA et al. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 49: 165–181.
 49. Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, Clark RA. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *Int J Cell Biol*. 2013; 2013: 231279. doi: 10.1155/2013/231279 PMID: 23737792.
 50. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49 (1): 35–43. doi: 10.1159/000339613 PMID: 22797712.
 51. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 2003; 101: 1810–1817.
 52. Van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 936: 426–437.
 53. Monroe DM, Hoffman M. The clotting system – a major player in wound healing. *Haemophilia*. 2012; 18 (5): 11–16.
 54. Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P et al. The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0135618.
 55. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (12): 4563–4568.
 56. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009; 17 (2): 153–162.
 57. Martino MM, Tortelli F, Mochizuki M et al. Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing. *Sci Transl Med*. 2011; 3 (100): 100ra189. doi: 10.1126/scitranslmed.3002614.
 58. Martino MM, Hubbell JA. The 12th–14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth

- factor-binding domain. *FASEB J.* 2010; 24 (12): 4711–4721. doi: 10.1096/fj.09-151282.
59. Patel SD, Waltham M, Wadoodi A et al. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; 4 (2): 129–141. doi: 10.1177/1753944710362903.
60. Wong CS, Sgarioto M, Owida AA et al. Polyethyleneterephthalate provides superior retention of endothelial cells during shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. *Heart Lung Circ.* 2006; 15: 371–377. doi: 10.1016/j.hlc.2006.08.002.
61. Post A, Wang E, Cosgriff-Hernandez E. A Review of Integrin-Mediated Endothelial Cell Phenotype in the Design of Cardiovascular Devices. *Ann Biomed Eng.* 2019; 47: 366. doi: 10.1007/s10439-018-02171-3.
62. Schaulfer V, Czichos-Medda H, Hirschfeld-Warnecken V et al. Selective binding and lateral clustering of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins: Unraveling the spatial requirements for cell spreading and focal adhesion assembly. *J Cell adhesion & migration.* 2016; 10 (5): 505–515. doi: 10.1080/19336918.2016.1163453.
63. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng.* 2006b; 34: 971–985.
64. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Dohle E et al. Homogeneous pressure influences the growth factor release profiles in solid platelet-rich fibrin matrices and enhances vascular endothelial growth factor release in the solid platelet-rich fibrin plugs. *Int. J. Growth Factors and Stem Cells in Dentistry.* 2018; 1 (1): 8–16.
65. Moreira R, Neusser C, Kruse M et al. Tissue-Engineered Fibrin-Based Heart Valve with Bio-Inspired Textile Reinforcement. *Advanced Healthcare Materials.* 2016; 5 (16): 2113–2121.
66. Munster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA. Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 557–560.
67. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW et al. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flowstretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials.* 2011; 32: 714–722.
68. Flanagan TC, Cornelissen C, Koch S et al. The *in vitro* development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning. *Biomaterials.* 2007; 28 (23): 3388–3397.
69. Stekelenburg M, Rutten M, Snoeckx CM et al. Dynamic Straining Combined with Fibrin Gel Cell Seeding Improves Strength of Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Engineering. Part A.* 2009; 15 (5): 1081–1089.
70. Tschoeke B, Flanagan TC, Cornelissen A et al. Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft. *Artif Organs.* 2008; 32: 800–809.
71. Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS et al. Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials.* 2010; 31 (17): 4731–4739.
72. Morgan BE, Ginn B, Fukunishi T et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019; 116 (26): 12710–12719.
73. Zhijuan He, Xu Ma, Yan Wang et al. Decellularized Fibrin Gel-Covered Canine Carotid Artery: A Completely Biological Composite Scaffold for Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Graft. *J Biomaterials and Tissue Engineering.* 2018; 8 (3): 336–346. doi: 10.1166/jbt.2018.1745.
74. Pankajakshan D, Krishnan VK, Krishnan LK. Functional stability of endothelial cells on a novel hybrid scaffold for vascular tissue engineering. *Biofabrication.* 2010; 2 (4): 041001. doi: 10.1088/1758-5082/2/4/041001.
75. Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs.* 2006; 30 (4): 242–249.
76. Matveeva V, Khanova M, Sardin E et al. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 2; 19 (11). pii: E3453. doi: 10.3390/ijms19113453.
77. Paschalaki KE, Randi AM. Recent Advances in Endothelial Colony Forming Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med (Lausanne).* 2018; 5: 295. doi: 10.3389/fmed.2018.00295.
78. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002; 106 (10): 1199–1204. doi: 10.1161/01.cir.0000031525.61826.a8.
79. Kolster M, Wilhelmi M, Schrimpf C, Hilfiker A, Haverich A, Aper T. Outgrowing endothelial and smooth muscle cells for tissue engineering approaches. *J Tissue Eng.* 2017; 8: 2041731417698852. doi: 10.1177/2041731417698852.

Статья поступила в редакцию 22.08.2019 г.

The article was submitted to the journal on 22.08.2019