
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФИБРИНОВОЕ ПОКРЫТИЕ СПОСОБСТВУЕТ СОХРАНЕНИЮ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО СЛОЯ В УСЛОВИЯХ ПУЛЬСИРУЮЩЕГО ПОТОКА**

© 2023 г. В. Г. Матвеева¹, *, Е. А. Великанова¹, Л. В. Антонова¹, Л. С. Барбараш¹

¹Научно-исследовательский институт Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, Россия

*E-mail: matveeva_vg@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 18.06.2023 г.

Разработки протезов сосудов малого диаметра показали, что модифицирующее покрытие, сохраняющее эндотелиальный слой в условиях пульсирующего потока, препятствует тромбообразованию и определяет исход имплантации. Для улучшения адгезии эндотелиальных клеток в качестве покрытия используют различные белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, фибрин), которые требуют сравнения. Цель работы заключалась в поиске наиболее эффективного покрытия белками внеклеточного матрикса, поддерживающего биологическую функциональность и сохраняющего эндотелиальный слой в условиях пульсирующего потока. Методы исследования: матрицы и графты изготавливали из поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и поли(ε-капролактонона) методом электроспиннинга, модифицировали коллагеном 1-го типа, фибронектином и фибрином. Образцы заселяли культурой колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК). Выполнено два блока исследований: в статике и в динамике. В статических условиях, после 3 дней инкубации КФЭК на поверхности образцов, изучали их биологические характеристики: жизнеспособность, метаболическую и пролиферативную активность клеток, адгезионные свойства по площади, занимаемой белком фокальной адгезии паксиллином. Удержание клеток оценивали сравнением плотности клеток на внутренней поверхности сосудистых графтов диаметром 4 мм в условиях пульсирующего потока и в статике через 7 суток инкубации. Было найдено, что в статических условиях метаболическая активность, жизнеспособность, количество и пролиферативная активность КФЭК, а также площадь, занимаемая белком фокальной адгезии паксиллином, на матрицах, покрытых фибрином, были выше, чем на коллагене и фибронектине. Плотность КФЭК (кл/мм²) на внутренней поверхности графтов с фибриновым покрытием не различалась в статических и динамических условиях. На образцах с коллагеном и фибронектином в условиях пульсирующего потока плотность клеток была в 2 раза меньше, чем при статической инкубации. Заключение. Фибрин продемонстрировал высокую биологическую активность, адгезионные свойства и сохранение эндотелиального слоя в статике и в условиях пульсирующего потока по сравнению с коллагеном и фибронектином. Покрытие фибрином является вариантом выбора при модифицировании внутренней поверхности сосудистых протезов.

Ключевые слова: фибрин, покрытие, сосудистые протезы, пульсирующий поток, удержание клеток

DOI: 10.31857/S0869813923070087, EDN: XIVIOIO

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на рынке отсутствуют эффективные протезы для замещения сосудов малого диаметра (<6 мм). Ученые всего мира ведут активный поиск улучшенных материалов и покрытий для создания протезов сосудов малого диаметра, удовлетворяющих требованиям кардиохирургов. Основными причинами несостоятельности имплантированных сосудистых протезов малого диаметра является их окклюзия как в раннем, так и отсроченном периоде вследствие тромбообразования или гиперплазии неоинтимы [1]. Наиболее перспективные варианты получения функционального и тромборезистентного протеза связаны с формированием эндотелиального слоя на внутренней поверхности перед имплантацией [2, 3]. Эндотелиальные клетки (ЭК) в условиях естественного кровотока подвергаются комплексному механическому воздействию. Исследователи отмечают, что ЭК, заселенные на синтетический каркас в статических условиях, после имплантации в кровоток более чем на 50–70% смываются током крови в течение первого часа, и этот процесс усиливается при повышении напряжения сдвига [4, 5]. В результате на оголенные участки протеза немедленно осаждаются белки плазмы, активируются тромбоциты, факторы свертывания, запускается каскад тромбообразования. Поэтому способность материала или модифицирующего покрытия удерживать ЭК в кровотоке и сохранять их функциональность, является важнейшим условием, определяющим успех будущей имплантации.

Для повышения биомиметических свойств сосудистых протезов используют покрытия на основе адгезионных белков внеклеточного матрикса (БВМ), среди них наиболее популярны коллаген [6], фибронектин [7, 8] и фибрин [9, 10]. В адгезии эндотелиоцитов к БВМ участвуют различные рецепторы, которые отличаются сродством и силой сцепления с поверхностью, что отражается на жизнедеятельности и эффективности удержания клеток в кровотоке. Сравнительная оценка биологических и адгезионных свойств различных БВМ для ЭК поможет выбрать наиболее перспективный вариант для модифицирования поверхности каркасных материалов, подверженных пульсирующему току крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено два блока экспериментов. Первый блок выполняли в статических условиях на плоской поверхности с целью предварительной оценки жизнедеятельности ЭК и адгезионных свойств различных покрытий (коллаген, фибронектин и фибрин). Второй блок — в динамических условиях на заселенной клетками внутренней поверхности модифицированных сосудистых протезов, встроенных в пульсирующий поток. Сравнивали с аналогичными заселенными протезами при статическом культивировании.

Изготовление каркасных матриц и протезов сосудов методом электроспиннинга

Для формирования полимерного матрикса использовали штифт Ø8 мм, для каркаса сосудистого протеза Ø4 мм. Композицию полимеров 5% поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (ПГБВ, Sigma-Aldrich, США) и 10% поли(ε-капролактона) (ПКЛ, Sigma-Aldrich, США) растворяли в хлороформе (Вектон, Россия). Электроспиннинг выполняли на аппарате Nanon-01A (МЕСС, Япония) при следующих параметрах: напряжение на конце иглы — 23 кВ, скорость подачи рас-

Список сокращений: КФЭК — колониеформирующие эндотелиальные клетки; ЭК — эндотелиальные клетки; БВМ — белки внеклеточного матрикса; ПГБВ — поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата); ПКЛ — поли(ε-капролактона); ФСБ — фосфатно-солевой буфер; ФБС — фетальная бычья сыворотка.

твора — 0.5 мл/ч, скорость вращения намоточного коллектора — 200 об./мин, расстояние до намоточного коллектора — 15 см. Готовые образцы снимали со штифтов и подготавливали к экспериментам.

В первом блоке экспериментов использовали плоские полимерные матрицы. Для этого трубку диаметром 8 мм разрезали вдоль, раскрывали, вырезали по размеру дна лунки 24-луночного планшета и помещали в лунки внутренней поверхностью вверх.

Второй блок исследований выполняли на трубчатых полимерных каркасах, которые были сформированы на штифте 4 мм, после извлечения штифта и обрезки краев образцы имели внутренний диаметр 4 мм и длину 70 мм.

Получение фибриновой матрицы

Фибриноген выделяли методом этаноловой криопреципитации. Для этого в пробирки с цитратной плазмой донора медленно при постоянном перемешивании добавляли раствор 16%-ного этанола на Нерес-буфере (pH 7.4) (Gibco, США) и помещали в шейкер на 1 ч при температуре 0–4°C. Пробирки центрифугировали 25 мин при 1000 g в условиях охлаждения до 4°C. Супернатант удаляли и преципитат растворяли в Нерес-буфере. Концентрацию фибриногена в преципитате доводили Нерес-буфером до 60 мг/мл. Полимеризацию фибриногена проводили с помощью 0.2%-ного CaCl₂, смешивая преципитат и раствор CaCl₂ в соотношении 1 : 1.

Модифицирование образцов

Образцы матриц ПГБВ/ПКЛ покрывали коллагеном, фибронектином и фибрином.

Для коллагенизации использовали бычий коллаген I типа 50 мкг/мл (Gibco, США) в растворе 0.02 М уксусной кислоты, который вносили по 2 мл на лунку с образцом, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации содержимое лунки удаляли и промывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (Gibco, США).

Образцы покрывали фибронектином плазмы человека 50 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в ФСБ, который вносили по 1 мл в лунки с образцами, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, далее удаляли содержимое лунок. Покрытие образцов фибрином выполняли по описанному ранее протоколу, для этого в каждую лунку с образцом вносили по 0.5 мл смеси преципитата и CaCl₂ и оставляли для полимеризации на 1 ч. В качестве группы сравнения использовали немодифицированные образцы ПГБВ/ПКЛ. Положительным контролем служили лунки 6-луночного планшета без матриксов, которые заселяли и культивировали аналогично экспериментальным образцам.

Культура эндотелиальных клеток

Для выполнения исследования была выбрана культура колониеформирующих эндотелиальных клеток человека (КФЭК) 5-го пассажа, выделенная и протестированная в собственной лаборатории Научно-исследовательского института Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний [11]. Клетки заселяли на матрицы и культивировали в полной питательной среде EGM-2 (Lonza, Швейцария), содержащей комплекс ростовых факторов, биологически активных веществ и 5%-ную фетальную бычью сыворотку (ФБС) (Thermo Fisher Scientific, США) в условиях CO₂-инкубатора при 37°C и 5% CO₂.

Исследования в статике

На дно лунки 12-луночного планшета с помощью агарозы фиксировали образцы матриц, заселяли КФЭК по 4×10^4 клеток на лунку и культивировали 72 ч в полной питательной среде EGM-2 с добавлением 5% ФБС. В качестве контроля использовали заселенные лунки 12-луночного планшета без матриц, которые культивировали в аналогичных условиях.

Оценка биологических свойств матриц

По окончании инкубации оценивали жизнеспособность клеток с помощью флуоресцентной микроскопии ($n = 3$ для каждого типа матриц), пролиферативную активность методом конфокальной флуоресцентной микроскопии ($n = 3$), метаболическую активность колориметрическим методом ($n = 6$).

Метаболическая активность эндотелиальных клеток на поверхности матриц

Метаболическую активность оценивали колориметрическим методом с использованием набора Cell Cytotoxicity Assay Kit – Colorimetric (Abcam, Англия). В лунки с образцами вносили реактив в рабочей концентрации 1 : 5 с культуральной средой, инкубировали 3 ч при 37°C. После этого по 200 мкл реактива из лунок с образцами переносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность на двух длинах волн 570 и 605 нм с помощью спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США). Метаболическую активность клеток в условных единицах (УЕ) рассчитывали по формуле:

$$\text{Метаб. активность (УЕ)} = R_{\text{оп}} - R_0,$$

R – отношение оптической плотности (ОП) при длине волны 570 нм к ОП при длине волны 605 нм (ОП570/ОП605), оп – опытный образец, 0 – “нулевая” проба без клеток, содержащая реактив в рабочей концентрации, предназначена для вычета фонового окрашивания.

Жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности фибриновых матриц

Клетки окрашивали ядерным флуоресцентным красителем Hoechst 33342 в концентрации 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 10 мин, далее, для детекции ядер мертвых клеток проводили дополнительное окрашивание бромистым этидием в концентрации 30 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 1 мин. Подсчет клеток на образцах и культуральном пластике производили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с 10 случайных полей зрения с каждого образца клеток с поля зрения на $S = 1 \text{ мм}^2$. Количество живых клеток определяли вычитанием количества мертвых клеток из общего количества клеток.

$$\text{ЖК (\%)} = \text{АЖ} / \text{АВ} \times 100\%,$$

где ЖК – жизнеспособность клеток %, АЖ – абсолютное количество живых клеток, АВ – абсолютное количество всех клеток.

Пролиферативная активность эндотелиальных клеток

Пролиферативную активность клеток оценивали с использованием набора Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки инкубировали с EdU-реагентом в течение 16 ч, далее окрашивали в соответствии с инструкцией производителя. После окончания процедуры ядра клеток

контрастировали красителем DAPI 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 30 мин. Препараты анализировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss, Германия). Оценивали 10 случайно выбранных полей зрения с каждого образца при увеличении $\times 20$, по 2 образца для каждого типа полимера. Количественный анализ изображений осуществляли в программе ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, США), подсчитывали общее количество и количество пролиферирующих клеток в поле зрения.

$$\text{ОП \%} = \text{ПК/ОК} \times 100\%,$$

ОП — относительное количество пролиферирующих клеток, ПК — количество пролиферирующих клеток в поле зрения, ОК — общее количество клеток в поле зрения.

Исследование адгезионных свойств образцов

Адгезионные свойства оценивали по площади, занимаемой белком фокальной адгезии паксиллином. Для этого подготовленные образцы фиксировали 10 мин 4%-ным параформальдегидом, пермеабелизировали в растворе 0.1%-ного Triton X-100 в течение 15 мин, неспецифическое связывание блокировали внесением 1%-ного бычьего сывороточного альбумина на ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы инкубировали с первичными антителами Recombinant Anti-Paxillin 1 : 200 (Abcam, Англия) при 4°C в течение ночи, отмывали и инкубировали 1.5 ч со вторичными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) 1 : 600 и Phalloidin Alexa Fluor 568 (Invitrogen, США) 1 : 40. После повторного отмывания от несвязавшихся вторичных антител выполняли контрастирование ядер 10 мкг/мл DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochlorid) (Sigma Aldrich, США) в течение 40 мин. Готовые образцы монтировали под покровные стекла в ProLong medium (Life Technologies, США) и исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Zeiss, Германия).

Исследование в пульсирующем потоке

Подготовка сосудистых протезов и заселение в биореакторе:

Полимерные сосудистые каркасы стерилизовали в этиленоксиде, затем проводили модификацию внутренней поверхности в подготовленном растворе коллагена, фибронектина и фибрина аналогично описанному выше протоколу ($n = 3$). Каркасы помещали на 6 ч в раствор фибронектина или коллагена, далее аккуратно промывали ФСБ три раза с экспозицией 5 мин. Полимеризацию фибрином выполняли путем пропитывания графта раствором преципитата с последующим коротким погружением в 0.2%-ный раствор CaCl_2 . Ожидали окончательную полимеризацию в течение 2 ч с последующей промывкой ФСБ.

Заселение конструкции эндотелиальными клетками и подключение к биореактору:

В подготовленные таким образом протезы вводили суспензию КФЭК в концентрации 5×10^5 клеток/мл, концы лигировали и далее помещали в полную питательную среду EGM-2 с 5% ФБС при 37°C и 5% CO_2 . Для равномерного расселения клеток по поверхности выполняли медленную радиальную ротацию конструкции в течение 18 ч, после чего проводили замену культуральной среды. Для создания пульсирующего потока использовали насос Harvard Rodent Blood Pump model 1407 (Harvard Apparatus, США) с шаровыми клапанами, который имитирует работу желудочков сердца.

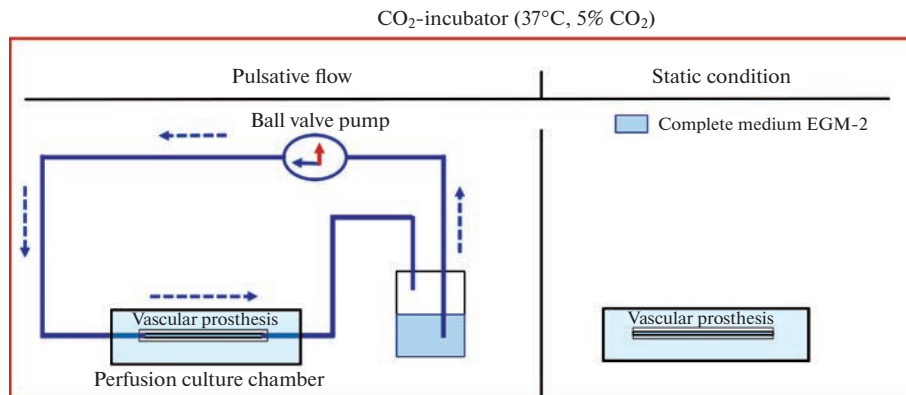


Рис. 1. Схема эксперимента на удержание эндотелиальных клеток на внутренней поверхности протезов в динамических (пульсирующий биореактор) и статических условиях. В CO₂-инкубатор помещали контур биореактора, содержащий перфузионную камеру с заселенным клетками протезом, насос с шаровыми клапанами, резервуар для культуральной среды. В системе создавалось конечное напряжение сдвига 2.46 дин/см². Одновременно в статических условиях культивировали заселенный клетками протез.

Интенсивность напряжения сдвига (τ) рассчитывали по формуле [12]

$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi r^3},$$

где μ – вязкость среды (Р) (приравнивали к вязкости полной среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и 5% ФБС при 37°C, поскольку среды имели одинаковый состав критически важных компонентов, значимо влияющих на вязкость раствора [13]), Q – скорость потока жидкости (мл/с), π – отношение длины окружности к ее диаметру, r – радиус протеза (см).

Для динамического культивирования заселенные сосудистые протезы подключали к системе (рис. 1) и в течение суток создавали напряжение сдвига 1.1 дин/см²: объем выброса 0.3 мл, частота выброса – 20 уд/мин, скорость потока 0.8 мл/с, температура 37°C.

Затем постепенно увеличивали напряжение сдвига до 2.46 дин/см²: объем выброса 0.7 мл, частота выброса – 20 уд/мин, скорость потока – 1.79 мл/с. В таком режиме культивировали еще 5 сут. Другую часть заселенных клетками протезов оставляли в статических условиях на аналогичный промежуток времени с заменой культуральной среды дважды в сутки. Общее время культивирования с ЭК составило 7 сут.

Детекция клеток на внутренней поверхности графтов

По окончании эксперимента проводили иммунофлуоресцентное окрашивание внутренней поверхности протезов. Внутреннюю поверхность фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин, разрезали вдоль и фиксировали на предметных стеклах внутренней поверхностью вверх. Клетки окрашивали на CD144, фактор фон Виллебранда (vWF). Перед окрашиванием образцы пермеабилizировали 0.01%-ным раствором Triton X-100. Соответствующие антигены метили первичными антителами: Rabbit anti-CD144 (Abcam, Англия), Sheep anti-vWF – FITC (Abcam, Англия), далее использовали вторичные антитела Donkey anti-Rabbit

IgG Highly Cross-Adsorbed – AF488 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение 16 ч, со вторичными – при комнатной температуре в течение часа. Образцы отмывали и докрашивали DAPI (Sigma, США). Готовые препараты заключали под стекло в ProLong (Life Technologies, США) и анализировали на конфокальном микроскопе LSM 700.

Дополнительно определяли плотность заселения поверхности протеза клетками. На окрашенных DAPI препаратах подсчитывали количество ядер в поле зрения, анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении $\times 20$, проводили пересчет на мм^2 и результаты представляли $\text{кл}/\text{мм}^2$.

Статистическая обработка данных

Статистическую и графическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение отличалось от нормального, количественные данные представлены в виде медианы и квартилей (Q1, Me, Q3). Достоверность различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Сравнение между несколькими группами проводили по критерию Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимым при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболическая активность клеток

Немодифицированный матрикс ПГБВ/ПКЛ обеспечивал самую низкую метаболическую активность клеток (0.200, 0.213, 0.242 УЕ), которая значимо не различалась с модификацией коллагеном (0.360, 0.409, 0.437 УЕ) (рис. 2а).

Покрытие фибронектином повышало метаболическую активность ЭК (0.843, 0.917, 1.079 УЕ), при этом фибриновое покрытие позволяло достигнуть наиболее высокие показатели (2.006, 2.076, 2.133 УЕ), сопоставимые с положительным контролем на пластике (1.563, 1.665, 1.699 УЕ).

Жизнеспособность клеток

Покрытие матриц фибронектином и фибрином увеличивало жизнеспособность и количество ЭК по сравнению с ПГБВ/ПКЛ (рис. 2б, 2с). Количество клеток на поверхности фибрина в 9.9 раз (131.0, 141.5, 161.9 $\text{кл}/\text{мм}^2$), а фибронектина в 3.3 раза (38.10, 47.62, 69.05 $\text{кл}/\text{мм}^2$) превышало показатели немодифицированного ПГБВ/ПКЛ (0, 14.28, 28.82 $\text{кл}/\text{мм}^2$). Обработка коллагеном не дала ожидаемого улучшения показателей жизнеспособности (31.28, 50.0, 50.05%) и количества ЭК (18.92, 28.57, 38.10 $\text{кл}/\text{мм}^2$) по сравнению с ПГБВ/ПКЛ (жизнеспособность 9.38, 41.67, 54.17%). Максимальная жизнеспособность (88.71, 94.84, 98.16%) и количество КФЭК обнаружено на матрицах, модифицированных фибрином и на культуральном пластике (жизнеспособность 96.18, 100, 100%; количество клеток 76.19, 85.71, 115.20 $\text{кл}/\text{мм}^2$).

Пролиферативная активность

Пролиферативная активность КФЭК, аналогично предыдущим результатам, была максимальной на фибрине (14.26, 26.67, 33.33%) и значимо превышала показатели не только на ПГБВ/ПКЛ (0, 0, 0%), но и на коллагене (0, 0, 9.38%) и фибронектине (0, 0, 25.0%) (рис. 2д, 2е). Пролиферативная активность клеток на стекле

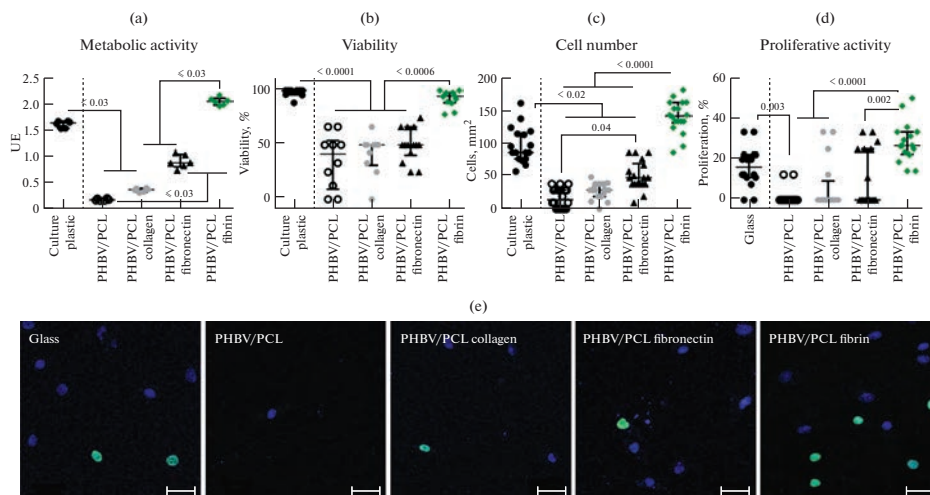


Рис. 2. Биологические свойства матриц в статических условиях (a–d). Графическое выражение количественных данных метаболической активности, жизнеспособности, количества клеток на поверхности, пролиферативной активности. (e) – Типичные фотографии заселенных матриц, демонстрирующие пролиферирующие (зеленое окрашивание) и непролиферирующие клетки (синее окрашивание) (шкала 50 мкм).

(11.11, 13.25, 22.22%) была выше, чем на ПГБВ/ПКЛ и не отличалась от других модифицирующих покрытий.

Адгезионные свойства

На фотографиях визуализируется белок фокальной адгезии паксиллин (зеленый цвет) и связанный с ним белок микрофиламентов F-актин (красный цвет) (рис. 3a). Поверхность фибрина покрывает монослой ЭК, тогда как на коллагене и фибронектине имеются незаселенные участки. Количественная обработка визуальных данных подтверждает, что на поверхности фибрина паксиллин занимает максимальную площадь (24.48, 27.25, 29.6%), которая превышает коллаген (14.46, 17.01, 19.08%), фибронектин (17.94, 19.81, 20.92%) и пластик (16.02, 20.35, 22.15%) (рис. 3b).

Сохранение эндотелиального слоя в условиях пульсирующего потока

Количество КФЭК на внутренней поверхности протезов через 7 суток культивирования в условиях статики подтверждают преимущество покрытия коллагеном, фибронектином и фибрином. Так, количество клеток на немодифицированных протезах из ПГБВ/ПКЛ значительно ниже (9.45, 23.63, 40.17 кл/мм²), чем на таких же протезах с коллагеном (139.4, 170.1, 250.4 кл/мм²), фибронектином (155.3, 204.1, 231.0 кл/мм²) и фибрином (241.0, 264.6, 304.8 кл/мм²) (рис. 4).

Аналогичную картину наблюдали в условиях пульсирующего потока. Однако количество клеток на фибрине (259.9, 311.9, 342.6 кл/мм²) было значительно выше, чем на коллагене (44.9, 70.9, 113.5 кл/мм²) и фибронектине (64.4, 93.6, 93.6 кл/мм²). Сравнение результатов на аналогичных заселенных протезах при динамическом и статическом культивировании характеризует способность поверхности к удержа-

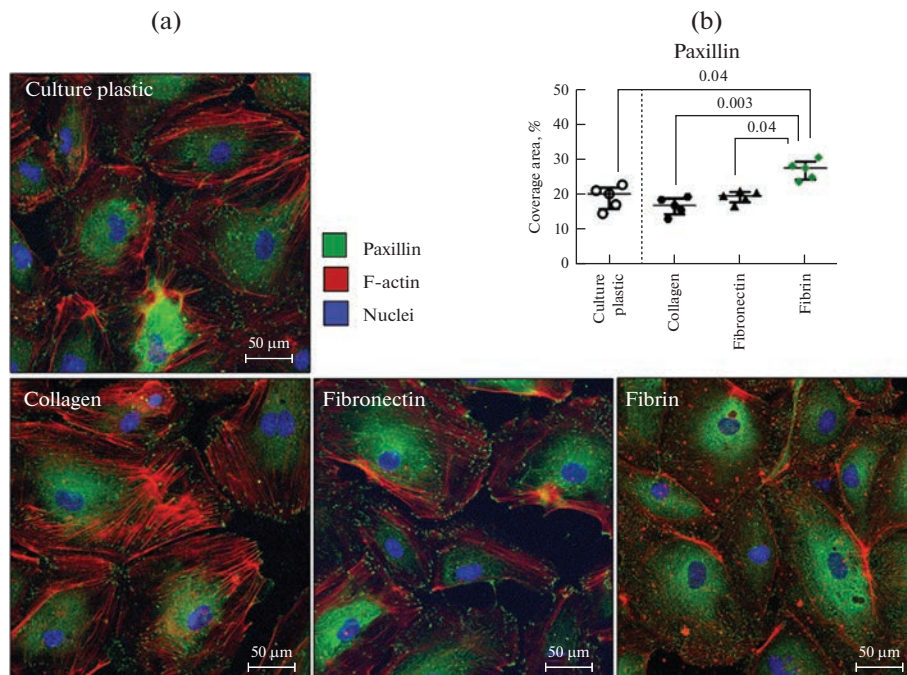


Рис. 3. Формирование очагов фокальной адгезии в эндотелиальных клетках на различных поверхностях в статических условиях. (а) — Типичные фотографии клеток, окрашенных на паксиллин (зеленая) и белок микрофиламентов F-актин (красная) (шкала 50 мкм). (б) — Площадь поверхности образцов, занимаемая паксиллином.

нию клеток в кровотоке. В условиях пульсирующего потока количество клеток на поверхности протезов, покрытых коллагеном и фибронектином, было более чем в 2 раза меньше по сравнению со статическими условиями. На фибриновом покрытии этот показатель в статике и в динамике не различался.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К идеальному сосудистому протезу предъявляется комплекс требований, которому лучше всего соответствуют гибридные материалы. Каркасную функцию, физико-механические свойства, соответствующие сосудам малого диаметра, может создавать основа из биосовместимых синтетических полимеров [14]. Матрицы на основе этих полимеров, полученные методом электроспиннинга, имитируют структуру внеклеточного матрикса, поэтому легче заселяются клетками и интегрируются с прилегающими тканями по сравнению с пленочными образцами. В качестве каркаса протезов сосудов малого диаметра, выполненного методом электроспиннинга, предлагают к разработке различные синтетические полимеры: полиуретаны [15], поли(L-лактид) [16], ароматический полиимид [17], поликапролактон, полиэтилентерефталат (PET), политетрафторэтилен [4], а также их различные комбинации [18, 19]. Однако отсутствие сайтов клеточной адгезии существенно снижает их биосовместимость и приводит к слабому удержанию клеток в условиях напряжения сдвига. Пропитывание или покрытие полимерных каркасов белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген, фибронектин, фибрин, сформирует недостающие

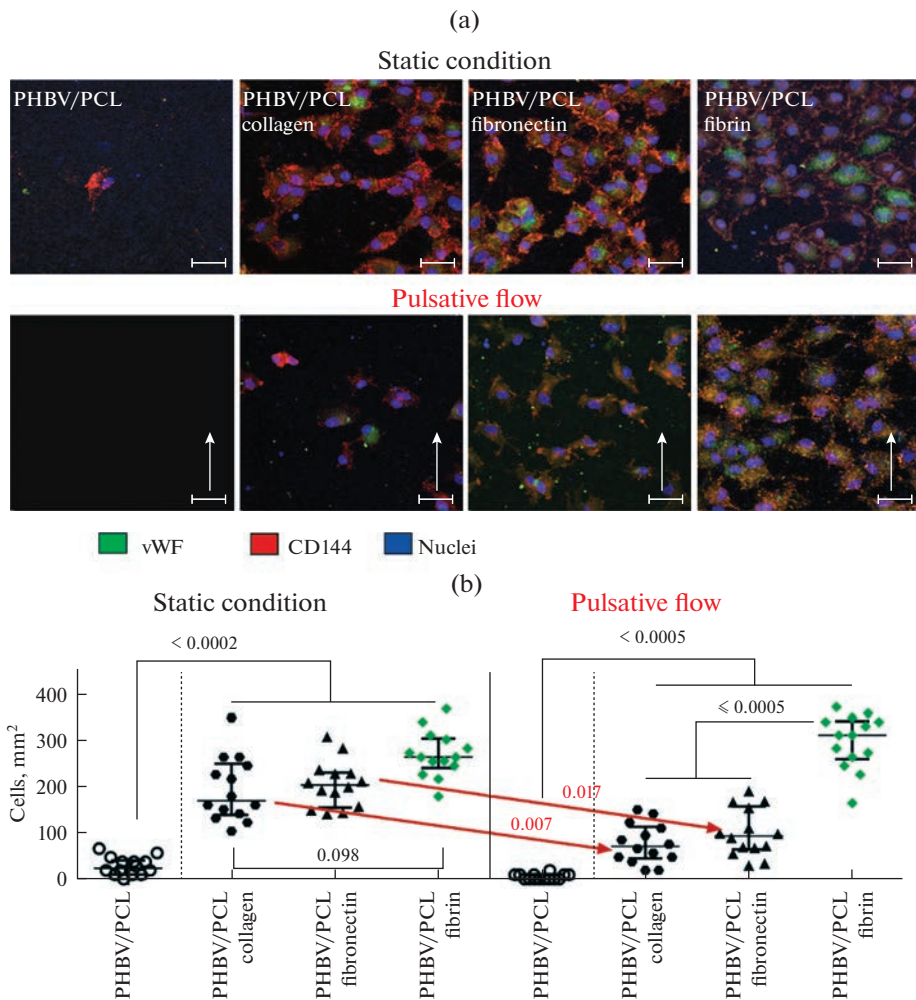


Рис. 4. Результаты эксперимента по удержанию эндотелия в условиях пульсирующего потока. (а) — Типичные фотографии КФЭК на внутренней поверхности протезов из ПГБВ/ПКЛ с покрытием и без через 7 сут культивирования в статических и динамических условиях (биореактор, напряжение сдвига 2.46 дин/см², стрелка показывает направление потока жидкости). Окраска: vWF (зеленая), CD144 (красная), ядра клеток (синяя) (шкала 50 мкм). (б) — Плотность клеток на поверхности протезов в зависимости от условий культивирования.

сайты клеточной адгезии, улучшит биологические функции конструкции, удержит клетки от смывания пульсирующим током крови.

К сожалению, в настоящее время мало публикаций посвящено вопросу удержания клеток в условиях пульсирующего потока. Нам встретилась единственная работа Chlupáč и соавт. [20], в которой представлена сравнительная характеристика различных белков внеклеточного матрикса в отношении эффективности удержания ЭК на поверхности сосудистого протеза в условиях пульсирующего биореактора. Исследователи тестировали коммерческие протезы на основе PET с коллагеном I типа и таких же протезах, дополнительно покрытых ламинином, фибрином и

фибрином/фибронектином. На коммерческом и покрытом ламинином протезах наблюдалась значительная и прогрессирующая потеря клеток. При тех же условиях на поверхности протезов, дополнительно обработанных фибрином и фибрином/фибронектином, количество клеток не только не снижалось, но даже увеличивалось, что исследователи связывают с хорошим удержанием клеток и началом их пролиферации.

Опираясь на эти данные, для сравнения нами были выбрали три варианта БВМ: коллаген I типа, фибронектин и фибрин. Результаты показали, что максимальной биологической активностью и адгезионными свойствами обладало фибриновое покрытие, а наиболее низкие показатели соответствовали коллагену. Об адгезионных свойствах материала может свидетельствовать количество клеток на поверхности, а также площадь, занимаемая фокальными контактами. Контакт клетки с внеклеточным матриксом формируется скоплением интегриновых рецепторов на клеточной мембране, которые взаимодействуют с актиновым цитоскелетом через белки фокальной адгезии [21]. Фокальные контакты, обеспечивающие прикрепление клеток к внеклеточному матриксу, вовлечены во многие сигнальные пути, в том числе в клеточный ответ и адаптацию к механическому стрессу [21]. Белок паксиллин не только формирует связь интегринов с цитоскелетом и служит сигнальным белком, но также является ключевым компонентом механизма механотрансдукции, основанного на взаимодействии клеток с субстратами [22].

Известно, что адгезия ЭК к фибрину и фибронектину проходит с участием интегриновых рецепторов $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$ [23], включенных в механизмы адаптации к гемодинамическим влияниям и регуляции экспрессии генов, активирующих ангиогенез и пролиферацию клеток [24]. Примечательно, что данные интегрины не задействованы в адгезии ЭК к коллагену [23, 25], что также свидетельствует о преимуществе клеточного взаимодействия с фибрином и фибронектином при формировании биомиметической ниши.

Отличительной особенностью фибрина перед другими БВМ является его высокая биодоступность, поскольку он в достаточном количестве и простыми методами может быть получен из периферической крови человека [26]. Совокупность биодоступности и уникальных биологических свойств, способствующих удержанию эндотелиального слоя, делает аутологичный фибрин предпочтительным покрытием для тканеинженерных конструкций, подверженных воздействию пульсирующего потока жидкости, в том числе сосудистых протезов.

В работе использовались более низкие показатели напряжения сдвига (2.46 дин/см^2) по сравнению с физиологическим диапазоном в артериях различной локализации ($5\text{--}12 \text{ дин/см}^2$), но в пределах значений, характерных для венозных сосудов ($1\text{--}6 \text{ дин/см}^2$) [27–29]. Выбор связан с моделированием элементов preconditionирования ЭК в условиях постепенного увеличения напряжения сдвига до значений, соответствующих венозным сосудам, с дальнейшей перспективой имплантации заселенного сосудистого протеза с подготовленными ЭК в артериальное сосудистое русло.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение покрытий на основе коллагена, фибронектина и фибрина показало преимущества фибрина в отношении биологической привлекательности, адгезионных свойств и сохранения эндотелиального слоя на поверхности в условиях пульсирующего потока.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (номер протокола №4/1 от 18 апреля 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 “Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.В.Г., В.Е.А.), сбор и обработка данных (М.В.Г., В.Е.А.), написание манускрипта (М.В.Г.), обсуждение и редактирование манускрипта (М.В.Г., А.Л.В., Б.Л.С.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fang S, Ellman DG, Andersen DC (2021) Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells* 10(3): 713. <https://doi.org/10.3390/cells10030713>
2. Táborská J, Riedelová Z, Brynda E, Májek P, Riedel T (2021) Endothelialization of an ePTFE vessel prosthesis modified with an antithrombogenic fibrin/heparin coating enriched with bound growth factors. *RSC Adv* 11: 5903. <https://doi.org/10.1039/D1RA00053E>
3. Bian Q, Chen J, Weng Y, Li S (2022) Endothelialization strategy of implant materials surface: The newest research in recent 5 years. *J Appl Biomater Funct Mater* 20: 22808000221105332. <https://doi.org/10.1177/22808000221105332>
4. Wong CS, Sgarioto M, Owida AA, Yang W, Rosenfeldt FL, Morsi YS (2006) Polyethyleneterephthalate provides superior retention of endothelial cells during shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. *Heart Lung Circ* 15: 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2006.08.002>
5. Schneider PA, Hanson SR, Price TM (1988) Durability of confluent endothelial cell monolayers on small-caliber vascular prostheses in vitro. *Surgery* 103: 456–462.
6. Sgarioto M, Vigneron P, Patterson J, Malherbe F, Nagel MD, Egles C (2012) Collagen type I together with fibronectin provide a better support for endothelialization. *C R Biol* 335(8): 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.07.003>
7. Asadishekari M, Mpoyi EN, Li Y, Eslami J, Walker M, Cantini M, Gourdon D (2022) Three-Dimensional Tunable Fibronectin-Collagen Platforms for Control of Cell Adhesion and Matrix Deposition. *Front Phys* 10: 806554. <https://doi.org/10.3389/fphy.2022.806554>
8. Wacker M, Riedel J, Walles H, Scherner M, Awad G, Varghese S, Schürlein S, Garke B, Veluswamy P, Wipermann J, Hülsmann J (2021) Comparative Evaluation on Impacts of Fibronectin, Heparin-Chitosan, and Albumin Coating of Bacterial Nanocellulose Small-Diameter Vascular Grafts on Endothelialization *In Vitro*. *Nanomaterials* 11: 1952. <https://doi.org/10.3390/nano11081952>

9. *Gui L, Boyle MJ, Kamin YM, Niklason LE* (2014) Construction of tissue-engineered small-diameter vascular grafts in fibrin scaffolds in 30 days. *Tissue Eng Part A* 20(9–10): 1499–1507. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0263>
10. *Yang L, Li X, Wu Y, Du P, Sun L, Yu Z, Song S, Yin J, Ma X, Jing C, Zhao J, Chen H, Dong Y, Zhang Q, Zhao L* (2020) Preparation of PU/Fibrin Vascular Scaffold with Good Biomechanical Properties and Evaluation of Its Performance in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 15: 8697–8715. <https://doi.org/10.2147/IJN.S274459>
11. *Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova E* (2020) Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells Yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells* 9(4): 876. <https://doi.org/10.3390/cells9040876>
12. *Dong JD, Gu YQ, Li CM, Wang CR, Feng ZG, Qiu RX, Chen B, Li JX, Zhang SW, Wang ZG, Zhang J* (2009) Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts. *Acta Pharmacol Sin* 30(5): 530–536. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.40>
13. *Poon C* (2022) Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices. *J Mech Behav Biomed Mater* 126: 105024. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.105024>
14. *Wang D, Xu Y, Li Q, Turng LS* (2020) Artificial small-diameter blood vessels: materials, fabrication, surface modification, mechanical properties, and bioactive functionalities. *J Mater Chem B* 8(9): 1801–1822. <https://doi.org/10.1039/c9tb01849b>
15. *Chernonosova V, Gostev A, Murashov I, Chelobanov B, Karpenko A, Laktionov P* (2021) Assessment of electrospun pellethane-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Materials (Basel)*. 14(13): 3678. <https://doi.org/10.3390/ma14133678>
16. *Попов ГИ, Попрядухин ПВ, Юкина ГЮ, Сухорукова ЕГ, Иванькова ЕМ, Вавилов ВН, Юдин ВЕ* (2020) Морфологическое исследование биорезорбируемой трубчатой матрицы малого диаметра из поли(L-лактида) для тканеинженерного сосудистого имплантата. *Цитология* 62 (1): 38–46. [*Popov GI, Popryadukhin PV, Yukinac GY, Sukhorukova EG, Ivankova E.M, Vavilova VN, Yudin VE* (2020) Morphological study of a bioresorbable tubular matrix of a small diameter from a poly(l-lactide) for a tissue-engineered vascular implant. *Cytology* 62(1): 38–46. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S004137712001006X>
17. *Чирятева АЕ, Завражных НА, Попрядухин ПВ, Юкина ГЮ, Кривенцов АВ, Иванькова ЕМ, Юдин ВЕ* (2022) Нетканые сосудистые протезы малого диаметра на основе нановолокон из ароматического полиимиды. *Биофизика* 67(4): 827–832. [*Chiriateva AE, Zavrazhnykh NA, Popryadukhin PV, Yukina GYu, Kriventsov AV, Ivankova EM, Yudin VE* (2022) Small diameter non-woven vascular prostheses based on aromatic polyimide nanofibers. *Biophysics* 67(4): 827–832. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0006302922040226>
18. *Jirofti N, Mohebbi-Kalhor D, Samimi A, Hadjizadeh A, Kazemzadeh GH* (2020) Fabrication and characterization of a novel compliant small-diameter PET/PU/PCL triad-hybrid vascular graft. *Biomed Mater* 15(5): 055004. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab8743>
19. *Khanova MYu, Velikanova EA, Matveeva VG, Krivkina EO, Glushkova TV, Sevostianova VV, Kutikhin AG, Antonova LV* (2021) Endothelial cell monolayer formation on a small-diameter vascular graft surface under pulsatile flow conditions. *Rus J Transplantol Artif Organs* 23(3): 101–114. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-101-114>
20. *Chlupáč J, Filová E, Riedel T, Houska M, Brynda E, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Daculsi R, Bourget C, Bordenave L, Bačáková L* (2014) Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res* 63(2): 167–177. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932577>
21. *Burridge K* (2017) Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J* 284(20): 3355–3361. <https://doi.org/10.1111/febs.14195>
22. *Ripamonti M, Wehrle-Haller B, de Curtis I* (2022) Paxillin: A Hub for Mechano-Transduction from the β 3 Integrin-Talin-Kindlin Axis. *Front Cell Dev Biol* 10: 852016. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852016>

23. Post A, Wang E, Cosgriff-Hernandez E (2019) A Review of Integrin-Mediated Endothelial Cell Phenotype in the Design of Cardiovascular Devices. *Ann Biomed Eng* 47: 366.
<https://doi.org/10.1007/s10439-018-02171-3>
24. Schaufler V, Czichos-Medda H, Hirschfeld-Warnecken V, Neubauer S, Rechenmacher F, Medda R, Kessler H, Geiger B, Spatz JP, Cavalcanti-Adam EA (2016) 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. *Cell Adhesion & Migration* 10(5): 505–515.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1163453>
25. Hunter EJ, Hamaia SW, Kim PSK, Malcor JD, Farndale RW (2022) The effects of inhibition and siRNA knockdown of collagen-binding integrins on human umbilical vein endothelial cell migration and tube formation. *Sci Rep* 12: 21601.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-25937-1>
26. Матвеева ВГ, Ханова МЮ, Антонова ЛВ, Барбараш ЛС (2020) Фибрин — перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии. *Вестн трансплантол и искусств органов* 22(1): 196–208. [Matveeva VG, Khanova MU, Antonova LV, Barbarash LS (2020) Fibrin — a promising material for vascular tissue engineering. *Rus J Transplantol and Artif Organs* 22(1): 196–208. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-196-208>
27. Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffignal T (2020) Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol* 11: 861.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00861>
28. Chandran Latha K, Sreekumar A, Beena V, Lakkappa RB, Kalyani R, Nair R, Kalpana SR, Kartha CC, Surendran S (2021) Shear stress alterations activate BMP4/pSMAD5 signaling and induce endothelial mesenchymal transition in varicose veins. *Cells* 10: 3563.
<https://doi.org/10.3390/cells10123563>
29. Papaioannou TG, Stefanadis C (2005) Vascular wall shear stress: Basic principles and methods. *Hell J Cardiol* 46: 9–15.

Fibrin Coating Contributes to the Retention of the Endothelial Layer in Pulsating Flow

V. G. Matveeva^{a, *}, E. A. Velikanova^a, L. V. Antonova^a, and L. S. Barbarash^a

^aResearch Institute of Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

*e-mail: matveeva_vg@mail.ru

The presence of a modifying coating based on extracellular matrix proteins on the inner surface of vascular prostheses is known to enhance endothelial cell adhesion and prevent detachment under pulsating flow conditions. This coating effectively reduces the risk of thrombosis and plays a critical role in determining implantation outcomes. Although proteins like collagen, fibrin, and fibrinogen are commonly used as coatings to improve cell adhesion, their relative effectiveness remains uncertain. Objective: This study aims to identify the optimal coating, based on extracellular matrix proteins, that preserves prosthesis functionality and maintains endothelial layer integrity under pulsating flow conditions. Methods: Scaffolds and vascular prostheses were fabricated using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) through an electrospinning process. These structures were then modified with collagen I, fibronectin, or fibrin. Endothelial colony-forming cells (ECFCs) were seeded onto the protein-modified electrospun samples and cultured under both static and dynamic conditions. After a 3-day incubation period under static conditions, cell viability, metabolic and proliferative activity, as well as adhesive properties, were evaluated. Adhesive properties were assessed by analyzing the area occupied by the focal adhesion protein paxillin. Cell retention was determined by comparing cell density on the inner surface of 4 mm diameter vascular prostheses after a 7-day incubation period, both under pulsating flow conditions and static conditions. Results: Cell metabolic activity, viability, number, proliferation, and the area occupied by the focal adhesion protein paxillin were found to be significantly higher in samples coated with fibrin compared to those coated with collagen I

and fibrinogen. The cell density (cells/cm²) of ECFCs on the inner surface of fibrin-coated prostheses showed no significant difference between dynamic and static conditions. In contrast, collagen and fibronectin coatings resulted in approximately half the cell density under pulsating flow conditions compared to static conditions. Conclusion: The fibrin coating demonstrated superior biological activity, adhesive properties, and preservation of the endothelial layer under both static and pulsating flow conditions, as compared to collagen I and fibronectin coatings. Consequently, the utilization of fibrin coating emerges as a promising option for modifying the inner surface of vascular prostheses.

Keywords: fibrin, coating, vascular prostheses, pulsating flow, cell retention