

# НОВЫЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ СОСУДИСТЫЙ МАТРИКС НА ОСНОВЕ РЕГЕНЕРИРОВАННОГО ФИБРОИНА ШЕЛКА: ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro*

DOI: 10.17691/stm2023.15.4.04

УДК 616.1–089.843–004.891.3

Поступила 22.03.2023 г.



**Е.С. Прокудина**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации;

**Е.А. Сенокосова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации;

**Л.В. Антонова**, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации;

**Е.О. Кривкина**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;

**Е.А. Великанова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;

**Т.Н. Акентьева**, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;

**Т.В. Глушкова**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов;

**В.Г. Матвеева**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;

**Н.А. Кочергин**, к.м.н., зав. лабораторией тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации

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

**Цель исследования** — изготовить сосудистую заплату на основе регенерированного фиброина шелка (ФШ) и изучить ее физико-механические характеристики, биосовместимость и матриксные свойства в сравнении с материалом из полигидроксибутирата/валерата/поликапролактона с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста (ПГБВ/ПКЛ/VEGF) и коммерческим лоскутом из бычьего ксеноперикарда (КП) в экспериментах *in vitro*.

**Материалы и методы.** Тканеинженерные матриксы изготавливали методом электроспиннинга. Исследовали структуру поверхности, физико-механические характеристики, гемосовместимость (гемолиз эритроцитов, агрегацию, адгезию и активацию тромбоцитов после контакта с материалом) и матриксные свойства сосудистых заплат (адгезию, жизнеспособность, метаболическую активность клеток EA.hy926 на материале).

**Результаты.** Поверхность матриксов на основе ФШ и тканеинженерных заплат на основе ПГБВ/ПКЛ/VEGF отличалась пористой и волокнистой структурой по сравнению с более плотным и однородным КП-лоскутом. Физико-механические характеристики матриксов из ФШ были приближены к нативным сосудам. Наряду с этим тканеинженерные заплаты продемонстрировали высокие гемосовместимые свойства, которые не отличаются от таковых для коммерческого КП-лоскута. Адгезия, жизнеспособность и метаболическая активность эндотелиальных клеток EA.hy926 также соответствовали ранее разработанному нами матриксу ПГБВ/ПКЛ/VEGF и КП-лоскуту, что говорит о нетоксичности и биосовместимости ФШ-матриксов.

**Заключение.** Матриксы, изготовленные из регенерированного ФШ, продемонстрировали удовлетворительные результаты, сопоставимые с таковыми для ПГБВ/ПКЛ/VEGF и коммерческого КП-лоскута, а в случае адгезии и активации тромбоцитов они превосходили указанные заплаты. В совокупности ФШ можно определить как материал с достаточной биологической совместимостью, что позволяет считать изготовленный из него тканеинженерный матрикс перспективным для имплантации в сосудистую стенку.

**Ключевые слова:** сосудистая заплата; тканевая инженерия; фиброин шелка; электроспиннинг; биосовместимость.

**Как цитировать:** Prokudina E.S., Senokosova E.A., Antonova L.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Akentieva T.N., Glushkova T.V., Matveeva V.G., Kochergin N.A. New tissue-engineered vascular matrix based on regenerated silk fibroin: *in vitro* study. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(4): 41, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.4.04>

**Для контактов:** Прокудина Екатерина Сергеевна, e-mail: goddess27@mail.ru

## New Tissue-Engineered Vascular Matrix Based on Regenerated Silk Fibroin: *in vitro* Study

**E.S. Prokudina**, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization;  
**E.A. Senokosova**, PhD, Researcher, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization;  
**L.V. Antonova**, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization;  
**E.O. Krivkina**, Junior Researcher, Laboratory for Cell Technology;  
**E.A. Velikanova**, PhD, Researcher, Laboratory for Cell Technology;  
**T.N. Akentieva**, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials;  
**T.V. Glushkova**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials;  
**V.G. Matveeva**, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cell Technology;  
**N.A. Kochergin**, MD, PhD, Head of Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization

Research Institute for Complex Issues in Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd., Kemerovo, 650002, Russia

**The aim of the study** was to make a vascular patch based on regenerated silk fibroin (SF) and study its physical and mechanical characteristics, biocompatibility and matrix properties in comparison with polyhydroxybutyrate/valerate/polycaprolactone with incorporated vascular endothelial growth factor (PHBV/PCL/VEGF) and commercial bovine xenopericardium (XP) flap in experiments *in vitro*.

**Materials and Methods.** Tissue-engineered matrices were produced by electrospinning. The surface structure, physical and mechanical characteristics, hemocompatibility (erythrocyte hemolysis, aggregation, adhesion and activation of platelets after contact with the material) and matrix properties of vascular patches (adhesion, viability, metabolic activity of EA.hy926 cells on the material) were studied.

**Results.** The surface of SF-based matrices and PHBV/PCL/VEGF-based tissue engineered patches had a porous and fibrous structure compared to a denser and more uniform XP flap. The physical and mechanical characteristics of SF matrices were close to those of native vessels. Along with this, tissue-engineered patches demonstrated high hemocompatible properties, which do not differ from those for commercial XP flap. Adhesion, viability, and metabolic activity of EA.hy926 endothelial cells also corresponded to the previously developed PHBV/PCL/VEGF matrix and XP flap, which indicates the nontoxicity and biocompatibility of SF matrices.

**Conclusion.** Matrices produced from regenerated SF demonstrated satisfactory results, comparable to those for PHBV/PCL/VEGF and commercial XP flap, and in the case of platelet adhesion and activation, they outperformed these patches. In total, SF can be defined as material having sufficient biological compatibility, which makes it possible to consider a tissue-engineered matrix made from it as promising for implantation into the vascular wall.

**Key words:** vascular patch; tissue engineering; silk fibroin; electrospinning; biocompatibility.

### Введение

Одной из наиболее распространенных патологий сердечно-сосудистой системы является атеросклероз. Образование атеросклеротических бляшек влечет за собой нарушение проходимости сосудов и ухудшение кровоснабжения тканей и органов. Атеросклероз внутренней сонной артерии приводит к каротидному стенозу [1], что в 15% случаев является причиной ишемического инсульта [2].

Одним из способов восстановления кровотока при значимом стенозе внутренней сонной артерии (70% и более) является каротидная эндартерэктомия [3]. При наличии пролонгированных атеросклеротических бляшек предпочтительно проведение каротидной эндартерэктомии с закрытием артериотомного доступа с помощью сосудистой заплаты [4].

Материал для сосудистой заплаты может быть биологического (природного) происхождения (бычий ксеноперикард (КП), децеллюляризованный матрикс, фибрин, коллаген) или искусственно синтезирован-

ным (полиуретан, поливиниловый спирт, полиэтилен-терефталат, поликапролактон). Кроме того, перспективным научным направлением является создание сосудистых протезов методами тканевой инженерии [5]. Это позволяет изготавливать матрицы с заранее заданными свойствами: структурная стабильность и контролируемая биодеградация, привлечение клеток для заселения поверхности протеза, низкая иммуногенность [6].

Одним из материалов природного происхождения является фиброин шелка (ФС), который получают из шелковых волокон *Bombyx mori* [7, 8]. ФС демонстрирует в экспериментах *in vitro* и *in vivo* высокую способность к адгезии, пролиферации и дифференцировке стволовых клеток [9], используется для стимуляции регенерации тканей [10–12], обладает низкой иммуногенностью и антигенностью [13], а также не требует жестких условий для изготовления биологических матриц [14]. Кроме того, работы последних лет подтверждают перспективность разработки изделий из ФС для нужд сердечно-сосудистой хирургии [15, 16].

**Цель настоящего исследования** — изготовить сосудистую заплату на основе регенерированного фиброина шелка и изучить ее физико-механические характеристики, биосовместимость и матриксные свойства в сравнении с заплатами из полигидроксибутирата/валерата/поликапролактона с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста и лоскутом из бычьего перикарда в экспериментах *in vitro*.

## Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол №6 от 30.06.2022).

**Изготовление сосудистых заплат.** Сосудистые заплаты из 15% раствора регенерированного ФШ были изготовлены методом электроспиннинга на аппарате NANON-01A (MECC CO, Япония). В качестве растворителя использовали гексафторпропанол. Последующую модификацию полученных матриксов проводили в 98% этаноле с целью перевода ФШ из регенерированной (водорастворимой) формы в водонерастворимую посредством образования  $\beta$ -сшивок между молекулами белка [17]. Электроспиннинг матриксов из ФШ осуществляли при следующих параметрах: игла — 22G, расстояние до коллектора — 15 см, напряжение — 20 кВ, скорость вращения коллектора — 200 об./мин, скорость подачи раствора — 1 мл/ч. В качестве коллектора использовали металлический штифт диаметром 8,0 мм.

Изготовление биодegradуемых заплат с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста (vascular endothelial growth factor, VEGF; Sigma-Aldrich, США) проводили методом эмульсионного электроспиннинга из смеси 5% полигидроксибутирата/валерата (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), ПГБВ; Sigma-Aldrich, США) и поликапролактона (poly( $\epsilon$ -caprolactone), ПКЛ; Sigma-Aldrich, США) в трихлорметане в соотношении 1:2, смешивая его с VEGF в физиологическом растворе (10 мкг/мл) в соотношении 20:1 [18]. Оптимальными параметрами электроспиннинга заплат ПГБВ/ПКЛ/VEGF были следующие: игла — 22G, расстояние до коллектора — 15 см, напряжение — 20 кВ, скорость вращения коллектора — 200 об./мин, скорость подачи раствора — 0,5 мл/ч. В качестве коллектора использовали металлический штифт диаметром 8,0 мм. Матрикс разрезали вдоль и снимали со штифта постепенными отслаивающими движениями.

Свойства тканеинженерных матриксов оценивали в сравнении с лоскутами из бычьего КП «КемПериплас-Нео» (ЗАО «НеоКор», Россия), которые используются в качестве заплат в сосудистой хирургии при проведении каротидной эндартерэктомии.

**Исследование поверхностной структуры заплат.** Образцы сосудистых заплат размером 0,25 см<sup>2</sup>

подвергали напылению Ag-Pd с помощью системы EM ACE200 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) для получения покрытия толщиной 15 нм. Структурные особенности поверхности матриксов изучали на сканирующем микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

**Оценка физико-механических свойств заплат.** Вырубку всех образцов осуществляли в продольном направлении ( $n=5$  в каждой группе). Оценку физико-механических свойств сосудистых заплат проводили в соответствии с ГОСТ 270-75 в условиях одноосного растяжения на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия) с использованием датчика с номинальной силой 50 Н; скорость перемещения траверсы при испытании — 50 мм/мин. Прочность материала определяли по максимальному напряжению при растяжении образцов (МПа) и силе, приложенной к образцу до начала его разрушения ( $F_{max}$ , Н). Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (характеризует эластичность материала, %), и модулю Юнга (характеризует жесткость материала, МПа).

Группой сравнения выступали КП-лоскуты. В качестве контроля использовали сонную артерию (*a. carotis*) овцы и внутреннюю грудную артерию человека (*a. mammaria*), которую получали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших добровольное информированное согласие на взятие материала.

**Оценка гемосовместимости сосудистых заплат.** Гемосовместимость тканеинженерных сосудистых заплат определяли по степени гемолиза эритроцитов, агрегации, адгезии и активации тромбоцитов после контакта с исследуемым материалом.

**Оценка степени гемолиза эритроцитов.** Степень гемолиза эритроцитов устанавливали после контакта исследуемого материала со свежей цитратной кровью. Образцы заплат ( $n=6$ ) размером 25 см<sup>2</sup> инкубировали в кюветах с 10 мл физиологического раствора в термостате при 37°C в течение 2 ч. Далее в каждую кювету вносили по 200 мкл свежей цитратной крови, перемешивали и продолжали выдерживать в термостате при 37°C в течение 60 мин. Физиологический раствор и дистиллированную воду использовали в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно. После завершения инкубации раствор из кювет отбирали в пробирки и центрифугировали при 2800 об./мин в течение 10 мин с целью осаждения эритроцитов. На спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Fisher Scientific, США) измеряли оптическую плотность надосадочных растворов при длине волны 545 нм. Степень гемолиза ( $H$ , %) определяли по формуле  $(Dt - Dne) / (Dpe - Dne) \cdot 100\%$ , где  $Dt$  — оптическая плотность пробы, инкубируемой с экспериментальным образцом;  $Dne$  — оптическая плотность отрицательного

контроля (пробы с физиологическим раствором);  $D_{ре}$  — оптическая плотность положительного контроля (пробы после 100% гемолиза) [19, 20]. В качестве положительного контроля (полное отсутствие гемолиза) принимали среднее значение оптической плотности при измерении проб физиологического раствора с кровью (было равно 0). В качестве отрицательного контроля принимали среднее значение оптической плотности проб после инкубации крови с дистиллированной водой (100% гемолиз).

**Оценка агрегации тромбоцитов.** Оценку агрегации тромбоцитов проводили после контакта донорской плазмы с исследуемым материалом в соответствии со стандартом ISO 10993.4. К свежей донорской крови добавляли 3,8% раствор цитрата натрия (в соотношении 9:1) и затем центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин. Полученную обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) использовали в качестве положительного контроля реакции агрегации тромбоцитов. Для калибровки прибора применяли бедную тромбоцитами плазму, которую получали в результате повторного центрифугирования ОТП при 4000 об./мин в течение 20 мин. Исследуемые образцы помещали в кюветы с ОТП на 3 мин, затем добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ (АГРЕНАМ, АГ-6; НПО «РЕНАМ», Россия) в концентрации 20 мкМ/л. Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью полуавтоматического 4-канального анализатора АРАСТ 4004 (LABiТес, Германия). Спустя 5 мин регистрировали максимальный процент агрегации тромбоцитов (%).

**Оценка адгезии тромбоцитов.** Степень адгезии тромбоцитов определяли после инкубации исследуемых образцов размером 0,25 см<sup>2</sup> с 300 мкл ОТП в течение 1 ч при 37°C. С целью удаления неадгезированных тромбоцитов препараты промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ; pH=7,4), затем фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин. Далее образцы инкубировали с кроличьими антителами к CD41 (ab134131; Abcam, Великобритания) и мышинными антителами к CD62P (ab54427; Abcam, Великобритания) в течение 12 ч при 4°C. После этого матрицы отмывали ФСБ с добавлением 0,1% Tween 20. Затем образцы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (A11034; Thermo Fisher Scientific, США) и антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 555 (A31570; Thermo Fisher Scientific, США). Срезы повторно отмывали ФСБ с добавлением 0,1% Tween 20. Для анализа препаратов использовали конфокальный микроскоп (LSM700; Carl Zeiss, Германия).

**Изучение матричных свойств.** Адгезионные свойства матриц исследовали по площади, занимаемой белком фокальной адгезии Talin. Для этого подготовленные образцы фиксировали в течение 10 мин в 4% растворе параформальдегида, пермеабилizировали 0,1% Triton X100 15 мин. Неспецифическое

связывание блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы инкубировали с первичными антителами кролика Talin (abcam, ab71333; Abcam, Великобритания) при 4°C в течение ночи. После отмывания в ФСБ образцы инкубировали 1,5 ч со вторичными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (A21206; Thermo Fisher Scientific, США) и Phalloidin Alexa Fluor 568 (A12380; Invitrogen, США). Далее образцы повторно отмывали ФСБ от несвязавшихся вторичных антител и контрастировали ядра с помощью 10 мг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid) (D9542; Sigma-Aldrich, США) в течение 40 мин. Готовые образцы отмывали и монтировали под покровные стекла в ProLong medium (P36930, Life Technologies, США) и исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism (Graph Pad Software). Соответствие распределения полученных данных нормальному оценивали с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение двух независимых групп выполняли с использованием критерия Манна–Уитни. Для оценки межгрупповых различий у трех и более групп применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, при попарном сравнении групп — критерий Данна. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ , при попарном сравнении групп —  $p < 0,05/k$ , где  $k$  — количество сравниваемых групп. Данные представляли в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Me [25%; 75%]).

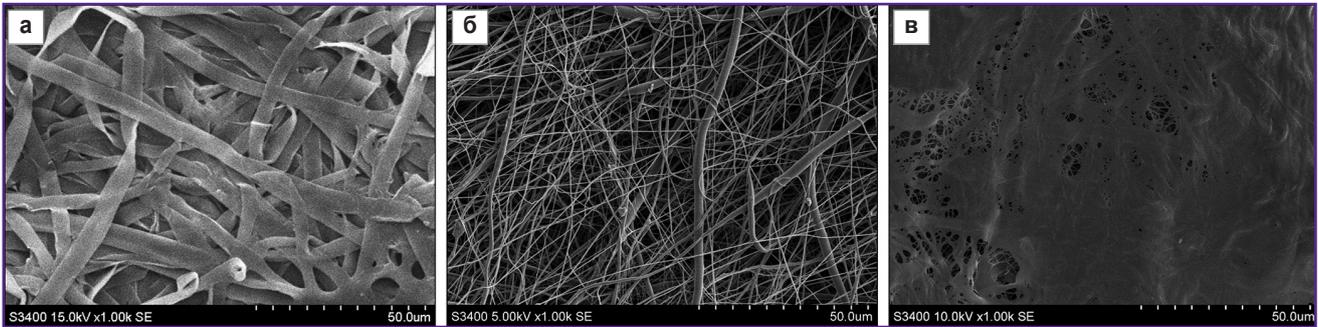
## Результаты и обсуждение

**Структурные особенности сосудистых заплат.** Сканирующая электронная микроскопия образцов из ФШ показала, что их внутренняя поверхность представлена тесно переплетенными между собой плоскими волокнами; присутствовали участки спаек волокон, а также небольшое количество неглубоких пор (рис. 1, а). Средний диаметр волокон на поверхности —  $4,80 \pm 1,39$  мкм.

Исследование поверхности матриц ПГБВ/ПКЛ/VEGF также показало их высокопористую волокнистую структуру, представленную разнонаправленными фибриллами толщиной  $1,47 \pm 0,67$  мкм (рис. 1, б).

Сканирующая электронная микроскопия КП-посудов показала сохранность их нативной структуры, наблюдалась рельефность поверхности, обусловленная извитым расположением волокон коллагена. Наличие единичных пор на поверхности можно объяснить плотным расположением коллагеновых фибрилл (рис. 1, в).

Таким образом, образцы из ФШ и ПГБВ/ПКЛ/VEGF обладали более «рыхлой» и пористой структурой по



**Рис. 1. Ультраструктура материалов:**

*а* — внутренняя поверхность матрикса из фиброина шелка; *б* — внутренняя поверхность матрикса из полигидроксибутирата/валерата/поликапролактона с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста (ПГБВ/ПКЛ/VEGF); *в* — серозная сторона лоскута из бычьего ксеноперикарда. Сканирующая электронная микроскопия,  $\times 1000$

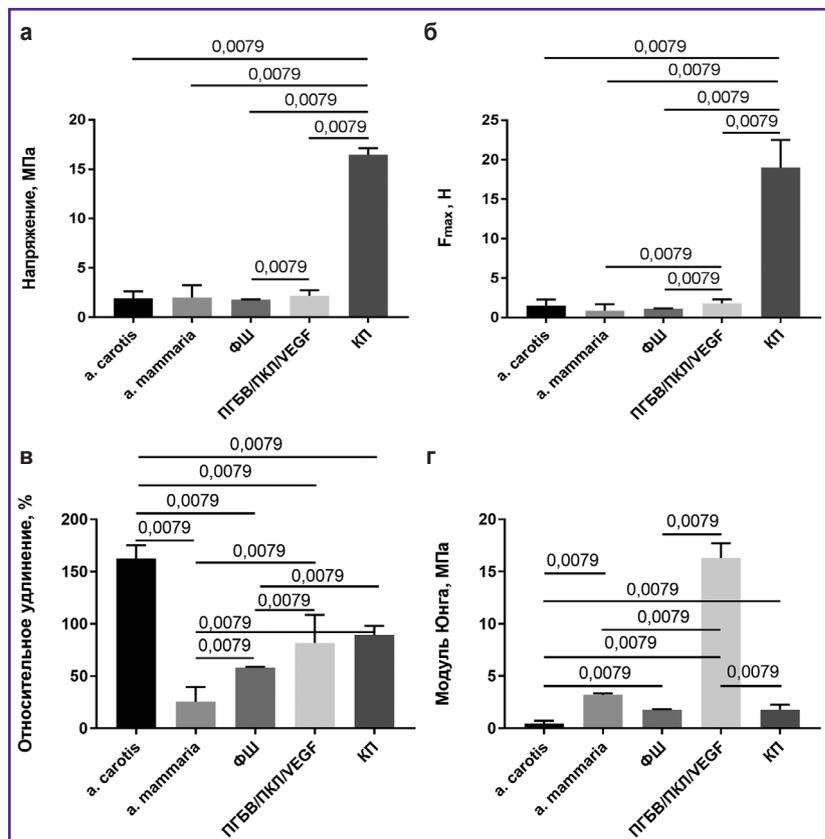
сравнению с КП-лоскутом. Такая особенность ультраструктуры тканеинженерных матриксов может давать преимущество при заселении их эндотелиальными клетками после имплантации в сосудистую стенку [21].

**Физико-механические характеристики сосудистых заплат.** Заплаты из ФШ по прочности схожи с нативными сосудами — *a. mammaria* человека и *a. carotis* овцы ( $p < 0,01$ ) (рис. 2, *а, б*). Эластичность матриксов из ФШ была в 2,8 раза ниже, чем у сонной артерии, при этом в 2,3 раза превосходила эластичность внутренней грудной артерии ( $p < 0,01$ ) (рис. 2, *в*). Жесткость заплат из ФШ находилась в промежутке между значениями данного показателя у нативных сосудов ( $p < 0,01$ ) (рис. 2, *г*). Вероятно, такие физико-механические характеристики ФШ обусловлены особенностями его полукристаллической ультраструктуры [22].

Прочность матриксов ПГБВ/ПКЛ/VEGF соответствовала таковой у *a. carotis* овцы и *a. mammaria* человека (см. рис. 2, *а*). Однако сила, прикладываемая к образцу до начала его разрушения, у заплат ПГБВ/ПКЛ/VEGF оказалась в 2 раза выше, чем у внутренней грудной артерии ( $p < 0,01$ ) (см. рис. 2, *б*). Матриксы из ПГБВ/ПКЛ/VEGF были почти в 2 раза менее эластичными, чем *a. carotis* ( $p < 0,01$ ), и в 3 раза более растяжимыми, чем *a. mammaria* ( $p < 0,01$ ) (см. рис. 2, *в*). При этом жесткость ПГБВ/ПКЛ/VEGF-материала была самой высокой среди всех образцов (см. рис. 2, *г*).

Физико-механические характеристики КП-лоскутов отличались от таковых

у нативных сосудов (см. рис. 2). Прочность и устойчивость к разрыву у КП была максимальной среди всех исследуемых материалов (см. рис. 2, *а, б*). Схожие результаты были получены при оценке прочности



**Рис. 2. Физико-механические характеристики тканеинженерных сосудистых заплат:**

*а* — напряжение, характеризует прочность материала; *б* —  $F_{max}$  — сила, необходимая для разрыва материала; *в* — относительное удлинение, характеризует эластичность материала; *г* — модуль Юнга, характеризует жесткость материала. ФШ — фиброин шелка, КП — бычий ксеноперикард, ПГБВ/ПКЛ/VEGF — полигидроксибутират/валерат/поликапролактон с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста

биологических заплат в кардиохирургических операциях [23]. Эластичность КП-лоскутов была почти в 2 раза ниже, чем у сонной артерии овцы, и в 3,5 раза выше, чем у внутренней грудной артерии человека ( $p < 0,01$ ) (см. рис. 2, в). Жесткость КП-лоскута была в 9 раз ниже, чем у ПГБВ/ПКЛ/VEGF-заплат ( $p < 0,01$ ) (см. рис. 2, в).

В целом физико-механические испытания показали, что матриксы из ФШ по своим характеристикам наиболее приближены к свойствам нативных артерий, что может способствовать адекватной интеграции материала при дальнейшей имплантации заплат в сосудистую стенку.

**Результаты оценки гемолиза эритроцитов.**

Степень гемолиза эритроцитов после контакта крови с матриксами из ФШ и ПГБВ/ПКЛ/VEGF была незначительной и статистически значимо не отличалась между группами (см. таблицу), что указывает на высокую гемосовместимость исследуемых материалов [24].

Гемолиз эритроцитов после контакта с КП-лоскутом был выше, чем после контакта с ФШ и ПГБВ/ПКЛ/VEGF — в 3,3 и 10,0 раз соответственно ( $p < 0,017$ ) (см. таблицу), однако не превышал максимально допустимых значений [24].

**Результаты гемолиза и агрегации тромбоцитов (n=6 в каждой группе), Me [25%; 75%]**

Образец	Степень гемолиза эритроцитов, %	Максимум агрегации тромбоцитов, %
Фиброин шелка	0,006 [0,004; 0,024]	86,41 [84,45; 90,03]
ПГБВ/ПКЛ/VEGF	0,002 [0,001; 0,002]	86,02 [83,02; 87,62]
Бычий ксеноперикард	0,020 [0,016; 0,025]*	85,03 [83,57; 87,16]
Обогащенная тромбоцитами плазма	—	83,97 [81,75; 86,14]

\*  $p < 0,017$  в сравнении с ПГБВ/ПКЛ/VEGF (полигидроксibuтиратом/валератом/поликапролактоном с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста).

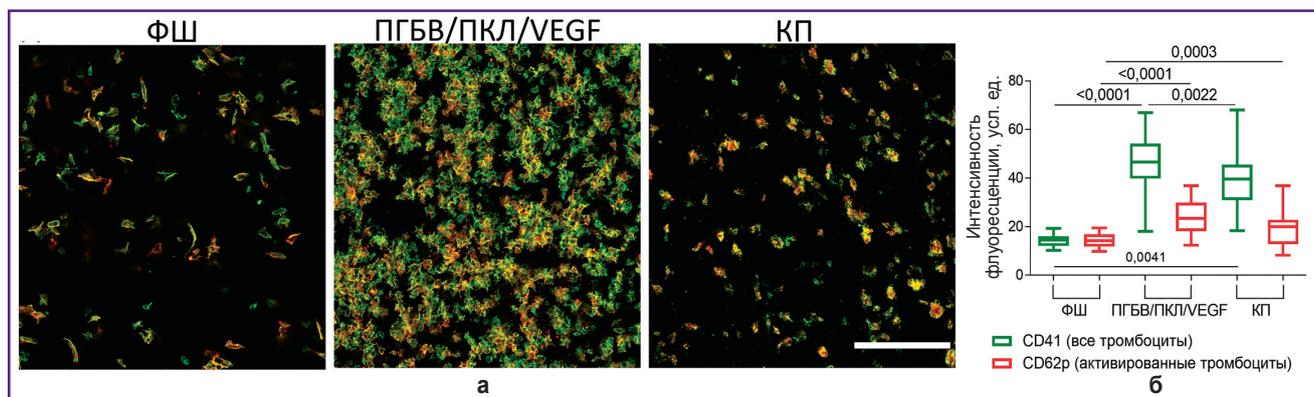
**Результаты оценки агрегации тромбоцитов.** После контакта плазмы с исследуемыми образцами статистически значимых межгрупповых различий в агрегации тромбоцитов не выявлено. Все материалы вызывали незначительную агрегацию тромбоцитов, которая не отличалась от таковой у ОТП (см. таблицу).

**Результаты оценки адгезии и активации тромбоцитов.** На матриксах из ФШ регистрируется наименьшая адгезия тромбоцитов. Аналогичная картина наблюдалась и для КП-лоскутов. На ПГБВ/ПКЛ/VEGF-заплатах адгезия тромбоцитов была более выраженной (рис. 3, а). Наряду с этим на ФШ-матриксах наблюдалась наименьшая активация адгезированных тромбоцитов, уровень которой статистически значимо отличался от таковой для ПГБВ/ПКЛ/VEGF-матриксков и КП-лоскутов ( $p < 0,017$ ) (рис. 3, б).

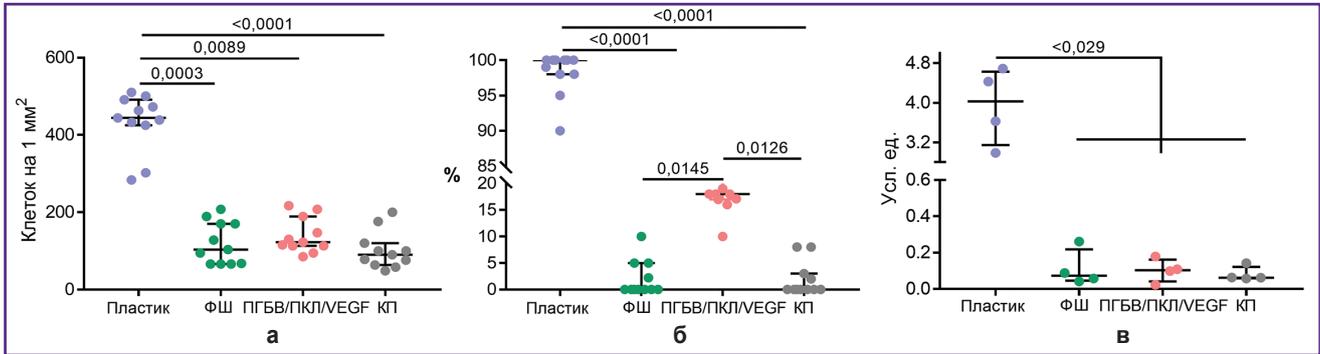
На основе полученных данных можно сделать вывод об оптимальной гемосовместимости матриксков из ФШ, которая соответствует таковой для заплат на основе ПГБВ/ПКЛ/VEGF и КП, а в случае адгезии и активации тромбоцитов гемосовместимость ФШ-образцов даже превосходит другие препараты.

**Результаты оценки матриксных свойств сосудистых заплат.**

Культивирование EA.hy926-клеток на поверхности изучаемых матриксков в течение 3 сут показало идентичную биологическую привлекательность всех изучаемых материалов. Так, общее количество адгезированных клеток на всех видах матриксков в среднем по медианам находилось на уровне 105,7 кл./мм<sup>2</sup>, что в 4 раза ниже плотности заселения EA.hy926 на культуральном пластике — 444,2 [425,3; 491,4] кл./мм<sup>2</sup>,  $p < 0,05$  (рис. 4, а). Жизнеспособность эндотелиальных клеток также не достигла высоких значений и варьировала от 0 до 33% (рис. 4, б). Жизнеспособность неотъем-

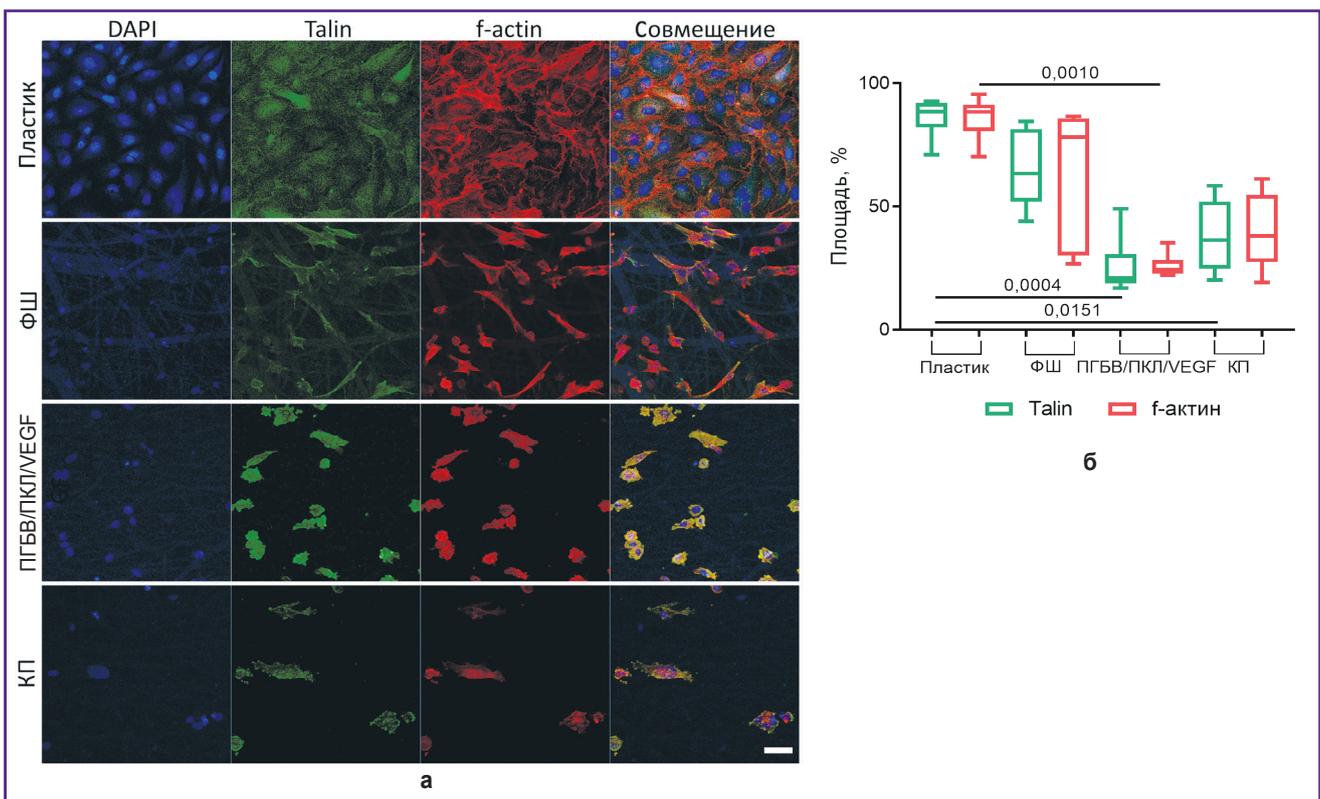


**Рис. 3. Конфокальная микроскопия тромбоцитов: зеленый — CD41; красный — CD62p; желтый — наложение окрасок, бар — 50 мкм (а), и интенсивность сигнала CD41 и CD62p (б)**  
 ФШ — фиброин шелка, КП — бычий ксеноперикард, ПГБВ/ПКЛ/VEGF — полигидроксibuтират/валерат/поликапролактон с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста



**Рис. 4. Матричные свойства сосудистых заплат:**

а — плотность клеток на 1 мм<sup>2</sup>; б — жизнеспособность; в — метаболическая активность. ФШ — фиброин шелка, КП — бычий ксеноперикард, ПГБВ/ПКЛ/VEGF — полигидроксибутират/валерат/поликапролактон с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста



**Рис. 5. Конфокальная микроскопия клеток EA.hu926: синий — DAPI; зеленый — Talin; красный — f-актин, бар — 50 мкм (а), и площадь Talin и f-актина (б)**

ФШ — фиброин шелка, КП — бычий ксеноперикард, ПГБВ/ПКЛ/VEGF — полигидроксибутират/валерат/поликапролактон с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста

лема от метаболической активности клеток, которая держалась на равном для всех видов матриц уровне — 0,1 усл. ед. (рис. 4, в).

Иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиальных клеток на белок фокальной адгезии Talin и белок цитоскелета f-актин показало особенности ландшафта каждого исследуемого материала (рис. 5, а). На культуральном пластике был получен

эталонный монослой клеток, которые стремились к своей правильной гексагональной форме и плотно контактировали между собой. Схожая картина наблюдается на ранних этапах эндотелизации сосудистых протезов [25].

Площадь фокальной адгезии белка Talin для культурального пластика была наибольшей и соответствовала плотности белка цитоскелета — f-актина (рис. 5, б).

На всех видах матриксов не обнаружен монослой клеток. На ФШ активация интегриновых рецепторов и формирование очагов фокальной адгезии были максимальными в сравнении с другими матриксами: отмечена наибольшая площадь Talin и f-актина. На поверхности ФШ обнаружены очаги скопления клеток веретенообразной формы с малым количеством контактов, однако вместе с тем присутствовали конгломераты ошаренных клеток. На ПГБВ/ПКЛ/VEGF и КП форма и характер распределения флуоресцирующих белков были схожи: от округлой до более равно вытянутой во всех направлениях. Межклеточных контактов немногим больше на ПГБВ/ПКЛ/VEGF (видимо, вследствие выделения из полимерных нитей сосудистого фактора роста).

В целом можно заключить, что матриксные свойства и адгезионность нового разрабатываемого материала на основе 15% ФШ находятся на уровне разработанного нами ранее искусственного ПГБВ/ПКЛ/VEGF-материала, а также децеллюризованного коммерческого бычьего КП.

### Заключение

В настоящем исследовании проведена комплексная сравнительная оценка в экспериментах *in vitro* физико-механических характеристик и биосовместимости тканеинженерных сосудистых заплат. По большинству исследуемых показателей матрикса, изготовленные из 15% фиброина шелка, продемонстрировали удовлетворительные результаты, сопоставимые с таковыми для ранее разработанного материала ПГБВ/ПКЛ/VEGF, а также коммерческого КП-лоскута, а в случае адгезии и активации тромбоцитов — превосходили указанные заплаты.

В совокупности фиброин шелка можно определить как материал с достаточной биологической совместимостью, что позволяет считать изготовленный из него тканеинженерный матрикс перспективным для имплантации в стенку кровеносных сосудов. Однако необходимы дальнейшие исследования этих матриксов в качестве сосудистых заплат.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ №0419-2022-0003 «Разработка новых изделий медицинского назначения для сердечно-сосудистой хирургии. Переход к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Создание систем обработки больших объемов данных, машинного обучения и искусственного интеллекта» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Литература/References

1. Fukuda S., Shimogonya Y., Yonemoto N., Fukuda M., Watanabe A., Fujiwara K., Enomoto R., Hasegawa K., Yasoda A., Tsukahara T.; NHO Carotid CFD Study Group. Hemodynamic risk factors for the development of carotid stenosis in patients with unilateral carotid stenosis. *World Neurosurg* 2022; 160: e353–e371, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2022.01.019>.
2. Messas E., Goudot G., Halliday A., Sitruk J., Mirault T., Khider L., Saldmann F., Mazzolai L., Aboyans V. Management of carotid stenosis for primary and secondary prevention of stroke: state-of-the-art 2020: a critical review. *Eur Heart J Suppl* 2020; 22(Suppl M): M35–M42, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/suaa162>.
3. AbuRahma A.F., Avgerinos E.D., Chang R.W., Darling R.C. III, Duncan A.A., Forbes T.L., Malas M.B., Murad M.H., Perler B.A., Powell R.J., Rockman C.B., Zhou W. Society for Vascular Surgery clinical practice guidelines for management of extracranial cerebrovascular disease. *J Vasc Surg* 2022; 75(1S): 4S–22S, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2021.04.073>.
4. Suroto N.S., Rantam F.A., Al Fauzi A., Widiyanti P., Turchan A., Pangaribuan V. Selection criteria for patch angioplasty material in carotid endarterectomy. *Surg Neurol Int* 2022; 13: 362, [https://doi.org/10.25259/sni\\_470\\_2022](https://doi.org/10.25259/sni_470_2022).
5. Antonova L.V., Krivkina E.O., Sevostianova V.V., Mironov A.V., Rezvova M.A., Shabaev A.R., Tkachenko V.O., Krutitskiy S.S., Khanova M.Y., Sergeeva T.Y., Matveeva V.G., Glushkova T.V., Kutikhin A.G., Mukhamadiyarov R.A., Deeva N.S., Akentieva T.N., Sinititskiy M.Y., Velikanova E.A., Barbarash L.S. Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model. *Polymers (Basel)* 2021; 13(16): 2637, <https://doi.org/10.3390/polym13162637>.
6. Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Глушкова Т.В., Матвеева В.Г. Создание персонализированного клеточнозаселенного сосудистого протеза *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2021; 10(2): 89–93, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93>.
7. Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Glushkova T.V., Matveeva V.G. Development of personalized cell-populated vascular graft *in vitro*. *Kompleksnyye problemy serdecno-sosudistykh zaboolevanij* 2021; 10(2): 89–93, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2021-10-2S-89-93>.
8. Fang G., Sapru S., Behera S., Yao J., Shao Z., Kundu S.C., Chen X. Exploration of the tight structural-mechanical relationship in mulberry and non-mulberry silkworm silks. *J Mater Chem B* 2016; 4(24): 4337–4347, <https://doi.org/10.1039/c6tb01049k>.
9. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мойсенович М.М., Богуш В.Г., Агапов И.И. Сравнительный анализ трехмерной наноструктуры пористых биodeградируемых матриксов из рекомбинантного спидроина и фиброина шелка для регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2015; 17(2): 37–44, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-2-37-44>.
10. Агапова О.И., Ефимов А.Е., Мойсенович М.М., Богущ В.Г., Агапов И.И. Comparative analysis of three-dimensional nanostructure of porous biocompatible scaffolds made of recombinant spidroin and silk fibroin for regenerative medicine. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov* 2015; 17(2): 37–44, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-2-37-44>.

9. Cetin Y., Sahin M.G., Kok F.N. Application potential of three-dimensional silk fibroin scaffold using mesenchymal stem cells for cardiac regeneration. *J Biomater Appl* 2021; 36(4): 740–753, <https://doi.org/10.1177/088532822111018529>.
10. Gavrilova N.A., Borzenok S.A., Revishchin A.V., Tishchenko O.E., Ostrovkiy D.S., Bobrova M.M., Safonova L.A., Efimov A.E., Agapova O.I., Agammedov M.B., Pavlova G.V., Agapov I.I. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process. *Int J Biol Macromol* 2021; 185: 264–276, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.040>.
11. Partlow B.P., Hanna C.W., Rnjak-Kovacina J., Moreau J.E., Applegate M.B., Burke K.A., Marelli B., Mitropoulos A.N., Omenetto F.G., Kaplan D.L. Highly tunable elastomeric silk biomaterials. *Adv Funct Mater* 2014; 24(29): 4615–4624, <https://doi.org/10.1002/adfm.201400526>.
12. Агаммедов М.Б., Островский Д.С., Соболев В.П., Ушакова Л.И., Агапов И.И., Гаврилова Н.А., Борзенков С.А. Патогенетические особенности восстановления поверхностных повреждений роговицы при помощи биодegradуемых конструкций на основе фибрина шелка. *Патогенез* 2022; 20(4): 63–68, <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2022.04.63-68>.
- Agammedov M.B., Ostrovsky D.S., Sobolev V.P., Ushakova L.I., Agapov I.I., Gavrilova N.A., Borzenok S.A. Pathogenetic and regenerative features of corneal damage repair with biodegradable materials based on silk fibroin. *Patogenez* 2022; 20(4): 63–68, <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2022.04.63-68>.
13. Meinel L., Hofmann S., Karageorgiou V., Kirker-Head C., McCool J., Gronowicz G., Zichner L., Langer R., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D.L. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2005; 26(2): 147–155, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.047>.
14. Sun W., Gregory D.A., Tomeh M.A., Zhao X. Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2021; 22(3): 1499, <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>.
15. Alessandrino A., Chiarini A., Biagiotti M., Dal Prà I., Bassani G.A., Vincoli V., Settembrini P., Pierimarchi P., Freddi G., Armato U. Three-layered silk fibroin tubular scaffold for the repair and regeneration of small caliber blood vessels: from design to in vivo pilot tests. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 356, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00356>.
16. Chan A.H.P., Filipe E.C., Tan R.P., Santos M., Yang N., Hung J., Feng J., Nazir S., Benn A.J., Ng M.K.C., Rnjak-Kovacina J., Wise S.G. Altered processing enhances the efficacy of small-diameter silk fibroin vascular grafts. *Sci Rep* 2019; 9(1): 17461, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53972-y>.
17. Dingle Y.T.L., Bonzanni M., Liudanskaya V., Nieland T.J.F., Kaplan D.L. Integrated functional neuronal network analysis of 3D silk-collagen scaffold-based mouse cortical culture. *STAR Protoc* 2021; 2(1): 100292, <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100292>.
18. Антонова Л.В., Миронов А.В., Шабаетов А.П., Сильников В.Н., Кривкина Е.О., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Севостьянова В.В., Глушкова Т.В., Мухамадияров Р.А., Барбараш Л.С. Тканеинженерные сосудистые заплатки — сравнительная характеристика и результаты преclinical испытаний на модели овцы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2022; 24(4): 94–108, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-4-94-108>.
- Antonova L.V., Mironov A.V., Shabaev A.R., Silnikov V.N., Krivkina E.O., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Senokosova E.A., Khanova M.Yu., Sevostyanova V.V., Glushkova T.V., Mukhamadiyarov R.A., Barbarash L.S. Tissue-engineered vascular patches: comparative characteristics and preclinical test results in a sheep model. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov* 2022; 24(4): 94–108, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-4-94-108>.
19. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А., Кривкина Е.О., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Технология изготовления функционально активных биодegradуемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием. Патент РФ 2702239. 2019.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Rezvova M.A., Krivkina E.O., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Technology of producing functionally active biodegradable small-diameter vascular prostheses with drug coating. Patent RU 2702239. 2019.
20. Ye X., Wang Z., Zhang X., Zhou M., Cai L. Hemocompatibility research on the micro-structure surface of a bionic heart valve. *Biomed Mater Eng* 2014; 24(6): 2361–2369, <https://doi.org/10.3233/bme-141049>.
21. Wang Z., Lin M., Xie Q., Sun H., Huang Y., Zhang D., Yu Z., Bi X., Chen J., Wang J., Shi W., Gu P., Fan X. Electrospun silk fibroin/poly(lactide-co-ε-caprolactone) nanofibrous scaffolds for bone regeneration. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 1483–1500, <https://doi.org/10.2147/ijn.s97445>.
22. Zhang X., Xiao L., Ding Z., Lu Q., Kaplan D.L. Fragile-tough mechanical reversion of silk materials via tuning supramolecular assembly. *ACS Biomater Sci Eng* 2021; 7(6): 2337–2345, <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.1c00181>.
23. Di Nardo A., Louvelle L., Romero D.A., Doyle M., Forbes T.L., Amon C.H. A comparison of vessel patch materials in tetralogy of Fallot patients using virtual surgery techniques. *Ann Biomed Eng* 2023; 1, <https://doi.org/10.1007/s10439-023-03144-x>.
24. Jolee Bartrom B.S. *ASTM hemolysis*. NAMSA, 2008; p. 1–12.
25. Sevostianova V.V., Antonova L.V., Mironov A.V., Yuzhalin A.E., Silnikov V.N., Glus
26. hkova T.V., Godovikova T.S., Krivkina E.O., Bolbasov E., Akentyeva T.N., Khanova M.Y., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Tarasov R.S., Barbarash L.S. Biodegradable patches for arterial reconstruction modified with RGD peptides: results of an experimental study. *ACS Omega* 2020; 5(34): 21700–21711, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02593>.