

## ОЦЕНКА ВАСКУЛОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФИБРИНА

© А. И. Шпичка,<sup>1,\*</sup> А. В. Королева,<sup>2,\*</sup> А. Дайвик,<sup>2</sup> П. С. Тимашев,<sup>3,4</sup>  
Е. Ф. Семенова,<sup>1</sup> И. Я. Моисеева,<sup>1</sup> М. А. Конопляников,<sup>5</sup> Б. Н. Чичков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра общей и клинической фармакологии  
Пензенского государственного университета, Пенза, 440026,

<sup>2</sup>Ганновский лазерный центр, Ганновер, 30419, Германия,

<sup>3</sup>ФНИЦ «Кристаллография и фотоника», Институт фотонных технологий,  
Москва, Троицк, 142092,

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова,  
Институт регенеративной медицины, Москва, 119991, и

<sup>5</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи  
и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, 115682;

\* электронные адреса: ana-shpichka@yandex.ru; a.koroleva@lzh.de

Современные разработки в области тканевой инженерии сталкиваются с проблемой создания кровеносных сосудов, которые могли бы обеспечивать эффективный транспорт питательных веществ и различных метаболитов. Для преодоления указанного ограничения ведутся исследования по созданию заселенных клетками биоконструктов на основе модифицированных природных полимеров, в частности ПЭГилированного фибрина. В связи с этим целью проведенного исследования заключалась в выяснении оптимальных соотношений компонентов гидрогеля из модифицированного фибрина для обеспечения благоприятных условий для проявления васкулогенного потенциала совместной культуры эндотелиальных и мезенхимных стволовых клеток. Нами было показано, что гели ПЭГилированного фибрина способны поддерживать трехмерный рост клеток HUVECs и hASCs. Гидрогель с микропористой нитчатой структурой, полученный из ПЭГилированного 5 : 1 фибриногена и тромбина в концентрации 0.2 U на 1 мг, обеспечивал оптимальные условия для распространения, роста и развития совместно культивируемых клеток обоих типов, а также экспрессии белков, участвующих в ангиогенезе.

Ключевые слова: тканевая инженерия, ПЭГилированный фибрин, гидрогель, васкулогенез, трехмерное совместное культивирование клеток.

Принятые сокращения: ПЭГ — полиэтиленгликоль, hASCs — человеческие стволовые клетки жировой ткани, HUVECs — эндотелиальные клетки пупочной вены человека, PEG-NHS — O,O'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукцинилиламино)этил]поли(этиленгликоль).

Проблема создания кровеносных сосудов при реконструкции мягких тканей является чрезвычайно актуальной, потому что их отсутствие может стать причиной развития многочисленных патологий и существенно ограничивает разработку успешных методов лечения с применением методов тканевой инженерии.

Для получения микроциркуляторной части сосудистого русла внутри заселенных клетками трехмерных биоконструктов были изучены различные макросоединения и клеточные культуры в отношении их васкулогенного потенциала (Koike et al., 2004; Traktuev et al., 2009; Merfeld-Clauss et al., 2010; Montano et al., 2010). Имитирование эмбриональной среды для стимулирования процессов васкулогенеза является одной из наиболее распространенных стратегий. Например, как показали эксперименты по заселению клеток-предшественников внутрь трехмерного экстрацеллюлярного матрикса, ангиобласты и мезенхимные стволовые клетки в этих условиях само-

организовывались в микрососудистую сеть и формировали капилляры (Auerbach, Auerbach, 2002).

Особого внимания заслуживают биоматериалы, из которых состоят трехмерные конструкторы. В первую очередь они должны отвечать трем главным задачам: быть пористыми и обеспечивать обмен веществ во всем объеме материала, создавать микросреду с оптимальными физико-химическими свойствами, обладать участками для интегринзависимой адгезии клеток. На протяжении последнего десятилетия распространение среди биологов получили экстрацеллюлярные матриксы природного происхождения как основной материал для трехмерного совместного культивирования клеток. К ним относятся гели на основе очищенного коллагена I типа, фибрина, реконструированных базальных мембран, например Матригель (Matrigel®). Гидрогели позволяют создать необходимые условия для трехмерного роста клеток за счет наличия как стимулирующих адгезию веществ, так и направлен-

ного фенотипического выравнивания клеток (Auerbach et al., 2003; Hughes et al., 2010).

Благодаря своим уникальным свойствам одним из наиболее подходящих материалов в тканевой инженерии сосудов является фибрин, который образуется в результате каталитического расщепления фибриногена под действием тромбина (Shaikh et al., 2008). Фибриноген относится к протеинам плазмы крови, промышленное производство которого основано главным образом на использовании крови крупного рогатого скота. Физические свойства фибрина легко могут быть изменены разными способами. В частности, его плотность можно регулировать варьированием уровня pH, концентраций фибриногена и ионов кальция, соотношением фибриногена и тромбина, добавлением фактора XIII (Rowe et al., 2007).

Однако конструкторы на основе чистых компонентов экстрацеллюлярного матрикса имеют два основных ограничения: быстрая деградация и непрозрачность. Кроме того, например, Матригель (Matrigel®) содержит в своем составе неохарактеризованные и опухолестимулирующие факторы роста, концентрация которых может варьировать в разных партиях продукта (Auerbach et al., 2003; Hughes et al., 2010). Одним из путей преодоления указанных недостатков стала химическая модификация природных чистых макросоединений.

ПЭГилирование является одним из наиболее распространенных способов, при котором происходит конъюгация молекулы белка и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Реакция осуществляется за счет взаимодействия терминальных гидроксильных групп ПЭГ с аминогруппами протеина, что приводит к перекрестному сшиванию молекул (Bryant et al., 2003). Гидрогели на основе немодифицированного фибрина подвергаются деградации, сильному ремоделированию *in vitro*, что ведет к сжатию конструкции и потере в весе (Bensaid et al., 2003; Rowe et al., 2007). ПЭГилирование, например фибриногена, позволяет контролировать его физические свойства, распад и дает возможность для более длительного трехмерного морфогенеза тканей в условиях *in vitro*.

В ранних работах (Dikovskiy et al., 2006; Zhang et al., 2006, 2010; Galler et al., 2011) была показана возможность использования трехмерных матриксов на основе ПЭГилированного фибрина для изучения клеточной миграции, пролиферации, дифференциации и тубулогенеза. В частности, были изучены эффекты фибрина, модифицированного согласно различным протоколам, на дифференциацию человеческих мезенхимных стволовых клеток по васкулярному фенотипу (Zhang et al., 2010). Однако возможность использования этого гидрогеля в инженерии сосудов требует дальнейшего изучения, в частности относительно возможности его применения для других типов клеток и их совместных культур. В связи с этим цель проведенного исследования заключается в выяснении оптимальных соотношений компонентов гидрогеля на основе модифицированного фибрина, обеспечивающего наиболее благоприятные условия для проявления васкулогенного потенциала совместной культуры эндотелиальных и стволовых клеток.

## Материал и методика

Приготовление растворов фибриногена и тромбина. Лиофилизированные бычьи фибриноген и тромбин (Sigma-Aldrich, Германия) растворяли в стериль-

ном фосфатном буфере в концентрациях 25 мг/мл и 100 U/мл соответственно. Перед применением растворы протеина и фермента хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ПЭГилирование фибриногена. O,O'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукцинилимино)этил]поли(этиленгликоль) (PEG-NHS; Sigma-Aldrich, Германия) был использован для модификации фибриногена. PEG-NHS растворяли в стерильном фосфатном буфере в концентрации 1.5 мг/мл. К раствору фибриногена добавляли полученный раствор PEG-NHS в молярных соотношениях 10 : 1 и 5 : 1 (PEG-NHS : фибриноген). Реакцию проводили в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Культуры клеток. Человеческие стволовые клетки (hASCs) выделяли из жировой ткани пациентов, полученной при пластической операции, после взятия информированного согласия. Клетки изолировали согласно опубликованному протоколу (Grüne et al., 2011). Человеческие умбиликальные эндотелиальные клетки (HUVECs) были приобретены в фирме Lonza (Швейцария). hASCs и HUVECs культивировали в среде EBM-2 (Lonza, Швейцария) с 1 % фетальной бычьей сыворотки и 1 % пенициллина-стрептомицина. В эксперименте использовали 4—6-й пассажи эндотелиальных клеток и 5—7-й пассажи hASCs.

Инкапсулирование клеток в гидрогеле. В 24-луночном планшете к 200 мкл модифицированного фибриногена добавляли суспензию клеток HUVECs и hASCs (4 : 1) из расчета 150 000 клеток на 100 мкл геля. Исходный раствор тромбина разводили в соотношениях фибриногена и тромбина в геле 1 мг к 1 U и 1 мг к 0.2 U. Полученные растворы тромбина добавляли к смеси фибриногена и суспензии для получения стабильного гидрогеля.

Микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия была выполнена на микроскопе Quanta 400F (Fei Company, США) после предварительной дегидратации образцов гидрогелей с помощью спиртового ряда (30, 50, 70, 90, 95 и 100 % этанола) и нанесения слоя золота 100 нм. Световая микроскопия инкапсулированных в геле клеток была осуществлена на микроскопе Zeiss (Германия) при увеличениях 10, 20 и  $32\times$ .

Конфокальная микроскопия была выполнена на микроскопе Inverted Confocal LSM Zeiss 780 (Zeiss, Германия). Предварительно HUVECs и hASCs были промаркированы с помощью Vibrant®DiO и Vibrant®DiI (Life Technologies, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Иммунофлуоресцентное окрашивание было выполнено непрямым двухстадийным методом. Гели были зафиксированы в течение 1 ч 4%-ным параформальдегидом и пермеабелизованы 1%-ным Triton X-100 в фосфатном буфере. Для предотвращения неспецифического связывания антител гели обрабатывали 2%-ным раствором альбумина из бычьей сыворотки в фосфатном буфере в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем инкубировали их с первичными антителами: кроличьими поликлональными к PECAM/CD31 (1 : 50) и MMP14 (1 : 500) (Abcam, Великобритания), мышинными моноклональными к  $\alpha$ -актину гладкомышечных клеток ( $\alpha$ SMA, 1 : 1000), ламинину (1 : 250) (Sigma-Aldrich, Германия) и коллагену типа IV (1 : 50) (Progen, Германия), растворенными в 1%-ном Triton X-100 в фосфатном буфере в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . После отмывки гели инкубировали со вторичными козлиными антителами против иммуноглобулинов кролика и мыши, конъюгированными с флуорофорами Alexa Fluor 488 (Dianova, Германия) и Alexa Fluor®555 (Life Technologies, Германия) соответственно, в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Клеточное ядро окрашивали Hoechst 33342.

Затем гели отмывали 3 раза и до микроскопии хранили в фосфатном буфере.

**Вестерн-блоттинг.** Протеины были выделены из клеток, культивируемых в форме монослоя и в геле, с помощью ледяного RIPA литического буфера (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.1 % лаурилсульфата натрия и 1 % деоксихолата натрия) и ультразвука. Общее содержание белков в полученном лизате определяли измерением бичинхоиноновой кислоты (Roth, Германия). На 10%-ный полиакриламидный гель помещали эквивалентные количества общего белка (10 мкг), которые разделяли методом SDS-PAGE. После электрофореза протеины переносили на поливинилиденную мембрану (Roth, Германия) полусухим блоттингом. Мембрану обрабатывали в течение 1 ч  $1 \times$  Roti® Block (Roth, Германия) при комнатной температуре. Затем на нее наносили кроличьи антитела MT1-MMP к человеческим антителам (1 : 1000; Abcam, Великобритания) и выдерживали в течение ночи при 4 °C. После промывания мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Детектирование вторичных антител производили по увеличению хемилюминесценции с помощью субстрата Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific, Германия). Интенсивность полос в сканированном материале анализировали методом денситометрии с использованием программного обеспечения Image J (National Institutes of Health, США).

## Результаты

При ПЭГилировании независимо от молярного отношения получаемый гидрогель из модифицированного фибрина отличался прозрачностью по сравнению с чистым фибриновым гелем (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид гидрогелей на основе немодифицированного (слева) и ПЭГилированного (справа) фибрина.

При проведении сканирующей электронной микроскопии были выявлены существенные различия в морфологии нитей различных гелей на основе ПЭГилированного фибрина (рис. 2). В сравнении с матриксом из немодифицированного фибрина структура всех ПЭГилированных гидрогелей при добавлении PEG-NHS претерпевает сильные изменения. Степень ПЭГилирования, так же как и концентрация тромбина, используемая для получения гелей, влияли на плотность протеинового гидрогеля. Гели, приготовленные из ПЭГилированного в соотношении 10 : 1 фибриногена, в случае обеих концентраций тромбина (1 мг к 1 U и 1 мг к 0.2 U) имели очень плотно упакованную нитчатую структуру без пор. ПЭГилирование 5 : 1 привело к формированию более рыхлой сети с неоднородным распределением пор разных размеров. Гель, приготовленный из ПЭГилированного 5 : 1 фибрина с соотношением протеина и тромбина 1 мг : 1 U, имел более микропористую структуру с внутренней нитчатой сетью. Полученные результаты микроскопии объясняют наши наблюдения поведения клеток внутри гидрогеля, при которых рост HUVECs и hASCs был ингибирован

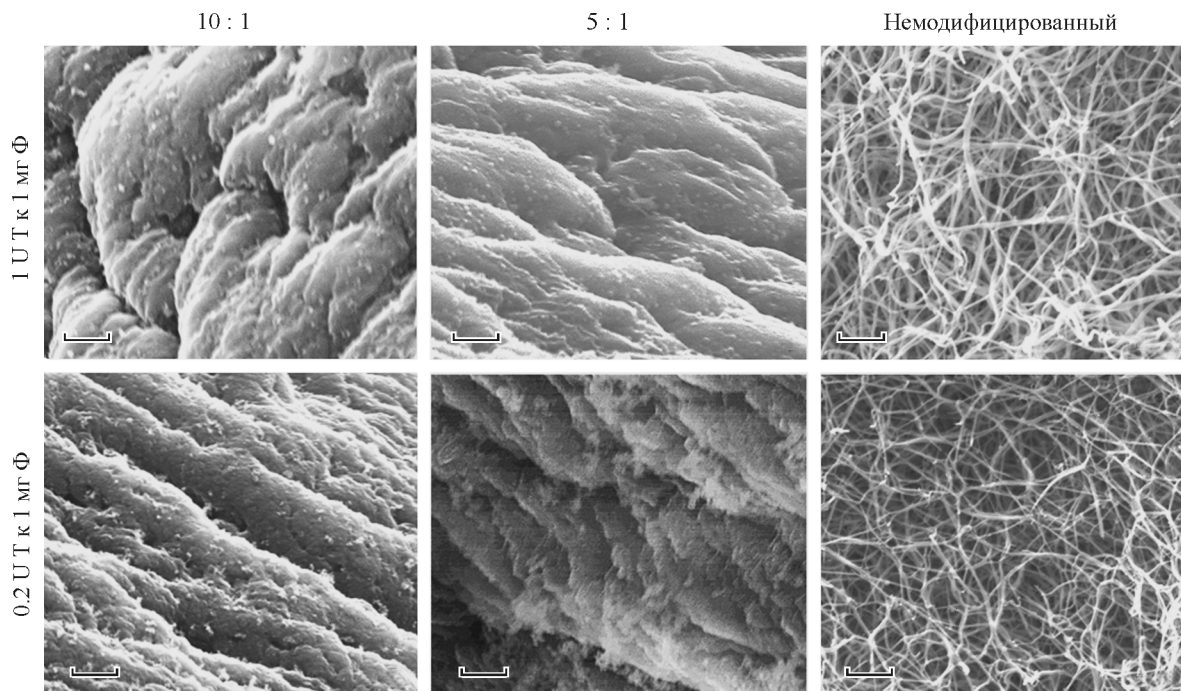


Рис. 2. Микроструктура гелей на основе немодифицированного и ПЭГилированного 10 : 1 и 5 : 1 фибрина с добавлением тромбина в концентрациях 1 U и 0.2 U на 1 мг протеина.

T — тромбин, Ф — фибриноген. Масштабные отрезки — 1 мкм.



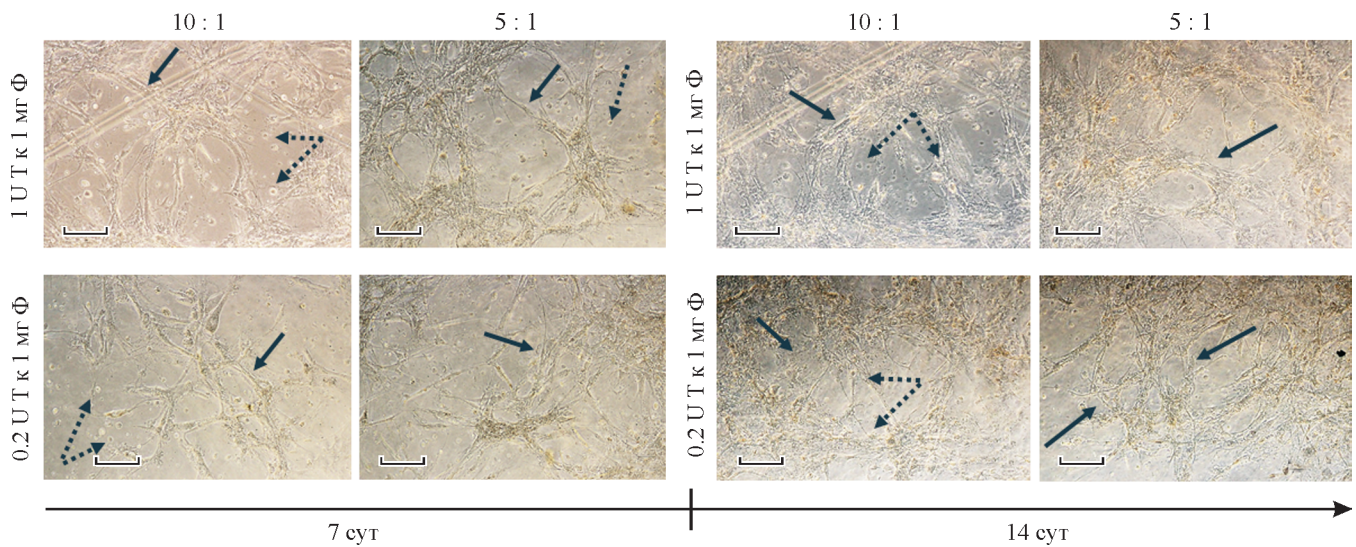


Рис. 3. Совместная культура HUVECs и hASCs, инкапсулированная в гидрогеле на основе модифицированного фибрина через 7 и 14 сут культивирования.

Световая микроскопия. Т — тромбин, Ф — фибриноген, *стрелки* — клеточные отростки, *пунктирные стрелки* — клетки округлой формы. Масштабные отрезки — 100 мкм.

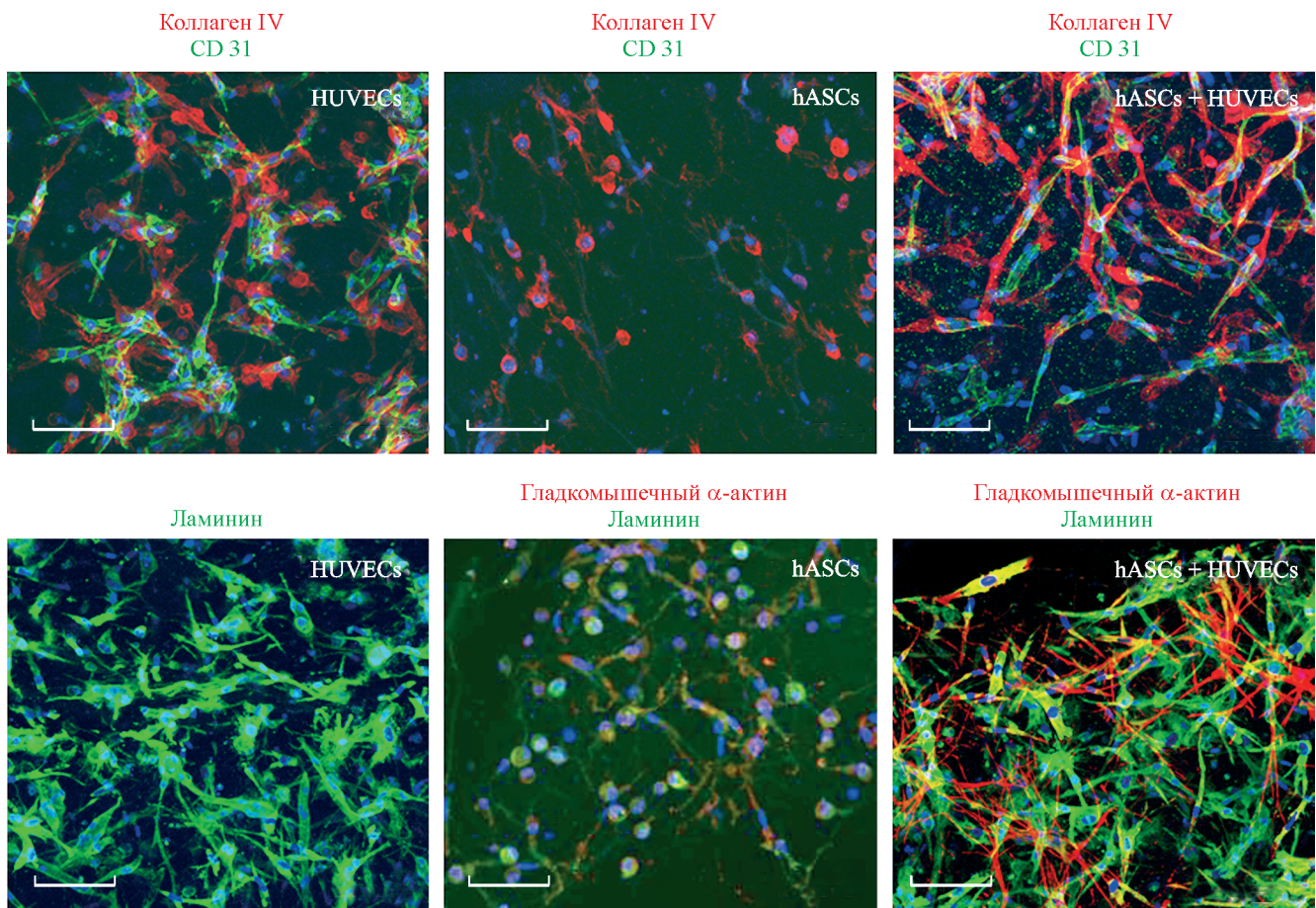


Рис. 4. Экспрессия внутриклеточных (гладкомышечный  $\alpha$ -актин) и внеклеточных мембранно-связанных (коллаген IV типа, ламинин и CD31) белков в монокультурах HUVECs и hASCs и их совместной культуре внутри ПЭГилированных фибриновых гидрогелей.

Непрямое иммунофлуоресцентное мечение. Ядра окрашены Hoechst 33342 (*синяя флуоресценция*). Масштабные отрезки — 100 мкм.



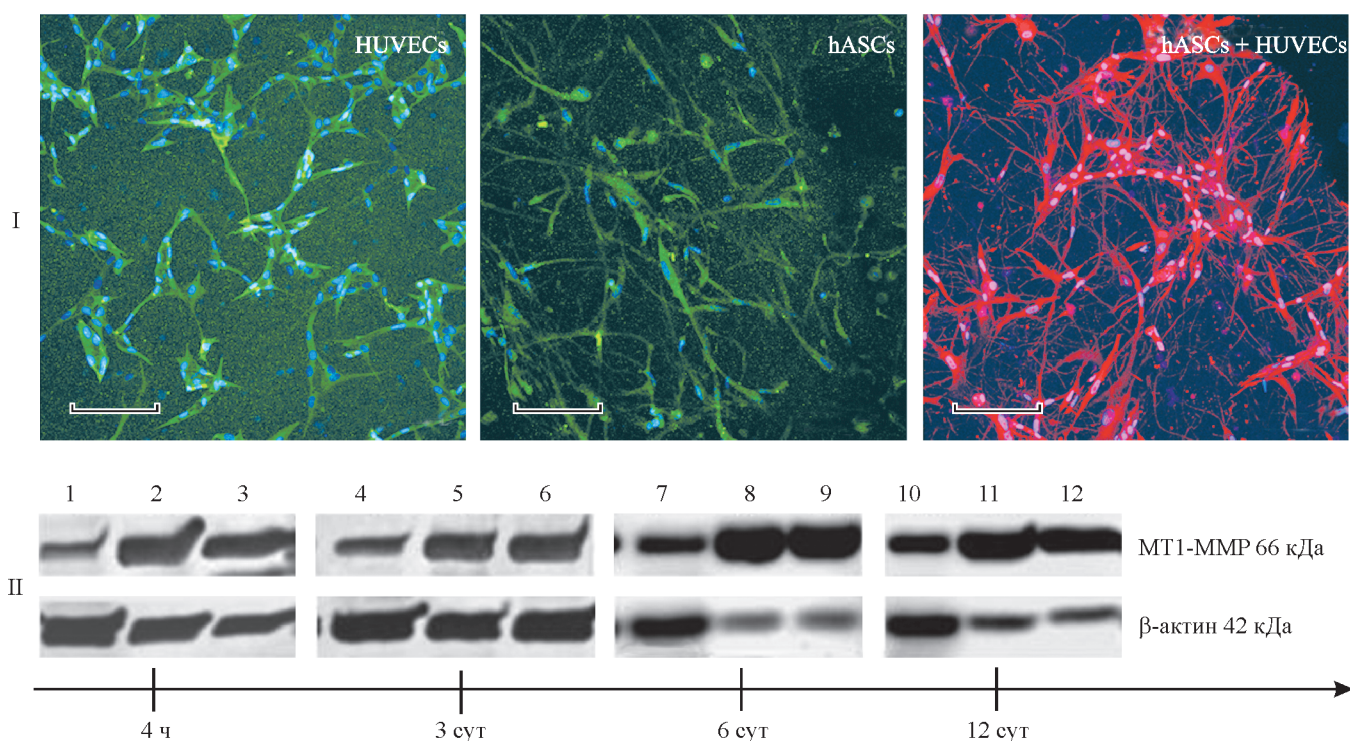


Рис. 5. Экспрессия металлопротеиназы MT1-MMP HUVECs и hASCs, инкапсулированными в ПЭГилированном фибриновом гидрогеле.

I — иммунофлуоресцентное выявление металлопротеиназы MT1-MMP (зеленая и красная флуоресценция) в трехмерных монокультурах HUVECs и hASCs и в их совместной культуре. Ядра окрашены Hoechst 33342 (синяя флуоресценция). Масштабные отрезки — 100 мкм. II — Вестерн-блот-анализ экспрессии MT1-MMP (66 кДа) в культурах HUVECs и hASCs в условиях монослойного культивирования (1, 4, 7, 10) и в трехмерных гидрогелях на основе модифицированного (2, 5, 8, 11) и немодифицированного (3, 6, 9, 12) фибрина.

сильно модифицированными фибриновыми гелями и увеличенными концентрациями тромбина.

Для оценки влияния геля на основе ПЭГилированного фибрина на поведение клеток в условиях *in vitro* в него были инкапсулированы HUVECs и hASCs (рис. 3). Наблюдение проводили в течение 14 сут. Гели с повышенной плотностью, приготовленные из ПЭГилированного 10 : 1 фибриногена и с соотношениями протеина и тромбина 1 : 1 и 1 : 0,2, не обеспечивали трехмерного роста клеток. HUVECs и hASCs, культивируемые внутри таких гелей, не могли в достаточной мере распластаться, клетки имели сферическую форму и практически не формировали отростков. Гель, приготовленный из ПЭГилированного 5 : 1 фибриногена и с соотношением протеина и тромбина 1 : 1, частично обеспечивал распластывание и разрастание hASCs, но не эндотелиальных клеток. В отличие от них гель, полученный из ПЭГилированного 5 : 1 фибриногена и с соотношением протеина и тромбина 1 : 0,2, обеспечивал рост и распластывание HUVECs и hASCs с формированием отростков и межклеточных контактов.

В монокультуре hASCs, культивируемой внутри гидрогеля на основе модифицированного фибрина, не было обнаружено значительной экспрессии коллагена IV типа, но в небольшом количестве отмечено его присутствие в монокультуре HUVECs (рис. 4). Экспрессия этого протеина HUVECs значительно усиливалась в совместной культуре, особенно в местах контакта с hASCs (рис. 4). Одиночная культура hASCs в фибриновом гидрогеле показала достаточно низкую экспрессию гладкомышечного  $\alpha$ -актина, который имел диффузное распространение внутри геля и не формировал фибриллярных струк-

тур (рис. 4). Однако в совместной культуре были отмечены значительное увеличение экспрессии гладкомышечного  $\alpha$ -актина и формирование его фибрилл в hASCs при прямом контакте или близком расположении к HUVECs (рис. 4). Кроме того, в совместной культуре HUVECs и hASCs был обнаружен ламинин, который при накоплении выявлялся по всему объему эндотелиальных клеток.

Влияние ПЭГилированных фибриновых гидрогелей на экспрессию металлопротеиназы матрикса MT1 было изучено как в монокультурах HUVECs и hASCs, так и в их совместной культуре (рис. 5). Согласно литературным данным, эндотелиальные клетки способны синтезировать такие металлопротеиназы матрикса, как MMP-2, MMP-9, MMP-19, MT1-MMP и MP3-MMP, которые участвуют в регуляции ангиогенеза (Lafleur et al., 2002; Taraboletti et al., 2002). Матриксная металлопротеиназа I типа (MT1-MMP) участвует в развитии отростков у эндотелиальных клеток и необходима для формирования капилляров (Lafleur et al., 2002; Taraboletti et al., 2002). Экспрессия MT1-MMP в монокультурах HUVECs и hASCs, культивируемых внутри ПЭГилированного фибринового гидрогеля, была значительно ниже, чем в их совместной культуре. Наиболее яркая флуоресценция была отмечена в геле, содержащем оба типа клеток (рис. 5). Вестерн-блот-анализ MT1-MMP показал, что через 4 ч после инокулирования клетки, культивируемые в гидрогелях, обладали более высокой активностью в отношении синтеза этого фермента по сравнению с клеточным монослоем. Уровень экспрессии MT1-MMP в трехмерной культуре, выращенной в ПЭГилированном фибриновом геле, значительно увеличивался начиная с 6-х сут (рис. 5).

## Обсуждение

В представленной работе изучены ключевые параметры получения гидрогеля на основе модифицированного фибрина, обуславливающие формирование определенной микросреды, которая способствует проявлению васкулогенного потенциала эндотелиальных и стволовых клеток. В геле, подобном экстрацеллюлярному клеточному матриксу, на форму клеток и цитоскелета влияют такие структурные особенности гидрогеля, как размер нитей, их взаимосвязь, плотность и молярное соотношение при ПЭГилировании. Механические взаимодействия между клетками и их окружением обеспечивают важный набор сигналов, которые контролируют форму клеток и их функцию (Hoffman et al., 2011). Представленное разнообразие структур компонентов экстрацеллюлярной среды делает удивительным факт того, что клеточная адгезия в трехмерном пространстве сильно различается (Bensaid et al., 2003; Bryant et al., 2003; Dikovski et al., 2006; Hughes et al., 2010). Процедура ПЭГилирования была применена с целью контроля стабильности гелей на основе фибрина при длительном культивировании клеток *in vitro*. При выборе оптимальных параметров осуществления ковалентного связывания ПЭГ с протеиновой молекулой возможно сохранение функциональной активности синтезированных конъюгатов, например, ферментативной активности или распознавания рецепторов (Veronese, 2001).

ПЭГилирование фибриногена PEG-NHS не влияло на его способность подвергаться ферментативному перекрестному сшиванию в результате реакции с тромбином. ПЭГилированный фибрин с разными молярными соотношениями был использован для инкапсулирования HUVECs и hASCs с целью оценки оптимального состава геля для клеточного роста. На основании имеющихся в литературе данных (Zhang et al., 2006; Galler et al., 2011) для модификации фибриногена были выбраны соотношения 10 : 1 и 5 : 1. В отличие от чистого фибрина гели ПЭГилированного фибрина остаются полностью прозрачными после сшивания с тромбином, что представляет физико-оптическое преимущество (рис. 1) и делает возможным микроскопический анализ клеток, культивируемых внутри фибринового гидрогеля.

Изменение плотности гидрогеля из ПЭГилированного фибрина может соотноситься с поведением клеток внутри его. Фибриллярная природа фибрина позволяет корректировать клеточную адгезию и осуществлять механическую передачу сигналов. Наноразмерный характер нитей полимера является важным свойством, благодаря которому микросреда может влиять на функцию клеток. HUVECs и hASCs, культивируемые в геле из чистого, немодифицированного фибрина, могли относительно быстро удлиняться и устанавливать межклеточные контакты, при этом продолжая пролиферировать, мигрировать и разрушать фибриновый матрикс. Однако было выявлено, что фибрин, ПЭГилированный в соотношении 10 : 1, не мог обеспечить трехмерный рост изучаемой совместной культуры. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии (рис. 2), гель на основе ПЭГилированного 10 : 1 фибрина имеет очень плотно упакованную структуру, которая, вероятно, ингибирует пространственное распространение, рост и миграцию клеток. В геле из фибрина, ПЭГилированного в соотношении 5 : 1 и приготовленного с 1 U тромбина на 1 мг протеина, происходило незначительное распространение HUVECs и hASCs. Дальнейшее снижение концентрации тромбина приводит

ло к меньшей плотности гелей, которые могли обеспечить трехмерный рост эндотелиальных и стволовых клеток.

Гель на основе фибрина является одним из барьеров, который должны преодолеть ангиогенные эндотелиальные клетки при формировании кровеносных сосудов. Инвазия и тубулогенез происходят только при экспрессии полной мембрано-связанной формы матриксной металлопротеиназы I типа (MT1-MMP) (Chun et al., 2004). Недавно опубликованные исследования выявили комбинаторную протеолитическую программу MT1-MPP, которая регулирует в эндотелиальных клетках хемотаксис, подвижность, адгезию, что и является ключевыми факторами при ангиогенезе (Koziol et al., 2012). Активный перичеллюлярный фибринолизин MT1-MPP дает возможность эндотелиальным клеткам проникать и распространяться внутри фибринового гидрогеля и формировать тубулярные структуры. В проведенном исследовании в гидрогеле на основе модифицированного фибрина высокий уровень экспрессии MT1-MPP был отмечен в совместной культуре HUVECs и hASCs, но не в их монокультурах. Данное наблюдение дополнительно подтверждает зависимость процесса клеточно-опосредованного васкулогенеза от совместного культивирования со стромальными клетками (hASCs).

Ранее было показано, что совместные культуры hASCs и эндотелиальных клеток (в соотношениях 1 : 3 и 1 : 7) при двухмерном и трехмерном культивировании в Матригеле (Matrigel®) образовывали стабильную сосудистую сеть, где внутренние слои были сформированы эндотелиальными клетками, а внешние — hASCs. Это явление было связано с увеличением экспрессии таких белков экстрацеллюлярного матрикса, как ламинин, коллаген IV типа и гладкомышечный  $\alpha$ -актин (Koike et al., 2004; Montano et al., 2010). В нашем исследовании были использованы hASCs и HUVECs в соотношении 1 : 4 соответственно для инкапсулирования в гидрогеле на основе ПЭГилированного фибрина. Было подтверждено, что значительное увеличение экспрессии коллагена IV типа, ламинина и гладкомышечного  $\alpha$ -актина связано с совместным культивированием изучаемых типов клеток в гидрогеле на основе ПЭГилированного фибрина (рис. 4).

Таким образом, проведенное исследование показало, что гидрогели на основе ПЭГилированного фибрина способны поддерживать трехмерный рост совместной культуры HUVECs и hASCs. Гель с микропористой нитчатой структурой, полученный из ПЭГилированного 5 : 1 фибриногена и тромбина в концентрации 0.2 U на 1 мг протеина, обеспечивал наиболее благоприятные условия микросреды для распространения, роста и развития совместно культивируемых hASCs и HUVECs, а также экспрессии ими белков, участвующих в ангиогенезе. Результаты данного исследования могут быть использованы в разработке микрофлюидных трехмерных конструктов, заселенных клетками, с целью их дальнейшего применения в тканевой инженерии и диагностических системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы DAAD и Министерства образования и науки РФ «Михаил Ломоносов» (проект НМ 3738; инкапсулирование клеток и изучение их морфологии в трехмерной культуре, конфокальная микроскопия, Вестерн-блоттинг) и Российского научного фонда (проект 16-15-10432; разработка протокола модификации фибриногена, сканирующая электронная микроскопия).



## Список литературы

- Auerbach R., Auerbach W. 2002. Vasculogenesis and angiogenesis. In: Fan T., Kohn E. (Eds.). New Angiother. Totowa; New York: Humana Press Inc. 1—6.
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., Akhtar N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. Clin. Chem. 49 : 32—40.
- Bensaid W., Triffitt J., Blanchat C., Oudina K., Sedel L., Petite H. 2003. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. Biomaterials. 24 : 2497—2502.
- Bryant S. J., Durand K. I., Anseth K. S. 2003. Manipulations in hydrogel chemistry control photoencapsulated chondrocyte behavior and their extracellular matrix production. J. Biomed. Mater. Res. A. 67 : 1430—1436.
- Chun T.-H., Sabeh F., Ota I., Murphy H., McDonagh K. T., Holmbeck K. 2004. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. J. Cell Biol. 167 : 757—767.
- Dikovski D., Bianco-Peled H., Seliktar D. 2006. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. Biomaterials. 27 : 1496—1506.
- Galler K. M., Cavender A. C., Koekue U., Suggs L. J., Schmalz G., D'Souza R. M. 2011. Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel. Regen. Med. 6 : 191—200.
- Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B. N. 2011. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. Biofabrication. 3 : 015005.
- Hoffman B. D., Grashoff C., Schwartz M. 2011. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. Nature. 475 : 316—323.
- Hughes C. S., Postovit L. M., Lajoie G. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. Proteomics. 10 : 1886—1890.
- Koike N., Fukumura D., Gralla O., Au P., Schnechner J., Jaun R. 2004. Creation of long-lasting blood vessels. Nature Br. Commun. 428 : 138—139.
- Koziol A., Gonzalo P., Mota A., Pollán A., Lorenzo C., Colomé N. 2012. The protease MT1-MMP drives a combinatorial proteolytic program in activated endothelial cells. FASEB J. 26 : 4481—4494.
- Laflleur M., Handsley M. M., Knäuper V., Murphy G., Edwards D. R. 2002. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). J. Cell Sci. 115 : 3427—3438.
- Merfeld-Clauss S., Gollahali N., March K. I., Traktuev D. O. 2010. Adipose tissue progenitor cells directly interact with the endothelial cells to induce vascular network formation. Tissue Eng. Part A. 16 : 2953—2966.
- Montano I., Chiestl C., Schneider J., Pontiggia L., Luginbuehl J., Biedermann T. 2010. Formation of human capillaries *in vitro*: the engineering of prevascularized matrices. Tissue Eng. Part A. 16 : 269—282.
- Rowe S. L., Lee S., Stegemann J. P. 2007. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. Acta Biomater. 3 : 59—67.
- Shaikh F. M., Callan A., Kavanagh E. G., Burke P. E., Grace P. A., McGloughlin T. M. 2008. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. Cell Tissue Org. 188 : 333—346.
- Taraboletti G., D'Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V. 2002. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. Amer. J. Pathol. 160 : 673—680.
- Traktuev D. O., Prater D. N., Merfeld-Clauss S., Sanjeevaiah A. R., Saadatizadeh M. R., Murphy M. 2009. Robust functional vascular network formation *in vivo* by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. Circ. Res. 104 : 1410—1420.
- Veronese F. M. 2001. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. Biomaterials. 22 : 405—417.
- Zhang G., Drinnan C. T., Geuss L. R., Suggs L. J. 2010. Vascular differentiation of bone marrow stem cells is directed by a tunable three-dimensional matrix. Acta Biomater. 6 : 3395—3403.
- Zhang G., Wang X., Wang Z., Zhang J., Suggs L. 2006. A PEGylated fibrin patch for mesenchymal stem cell delivery. Tissue Eng. 12 : 9—19.

Поступила 6 V 2016

## EVALUATION OF VASCULOGENIC POTENTIAL OF MODIFIED FIBRIN HYDROGEL

A. I. Shpichka,<sup>1,\*</sup> A. V. Koroleva,<sup>2,\*</sup> A. Deiwick,<sup>2</sup> P. S. Timashev,<sup>3,4</sup> E. F. Semenova,<sup>1</sup> I. Ya. Moiseeva,<sup>1</sup>  
M. A. Konoplyannikov,<sup>5</sup> B. N. Chichkov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Penza State University, Department of General and Clinical Pharmacology, Penza, 440026, Russia,

<sup>2</sup> Laser Zentrum Hannover, Hannover, 30419, Germany,

<sup>3</sup> Federal Scientific Center «Crystallography and Photonics», Institute of Photonic Technologies, Moscow, Troitsk, 142092, Russia,

<sup>4</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Moscow, 119991, Russia, and

<sup>5</sup> Federal Scientific-Clinical Center on Specialized Medical Aid and Technologies, Moscow, 115682, Russia;

\* e-mails: ana-shpichka@yandex.ru; a.koroleva@lzh.de

In recent years, engineering of blood vessels, which can provide the effective transport of nutrients and various metabolites, is one of the major challenges in tissue reconstruction. Many researches are carried out to develop cell-seeded bioconstructs based on natural polymers, particularly on PEGylated fibrin. Therefore, the aim of this study was to reveal the optimal component ratio for modified fibrin hydrogels in order to provide favorable conditions for vascular development of endothelial and mesenchymal stem cell co-culture. It has been found out that the PEGylated fibrin hydrogels can support 3D cell growth in HUVECs and hASCs co-culture. The microporous filamentous hydrogel prepared from PEGylated 5 : 1 fibrinogen and using the 1 : 0.2 protein to thrombin ratio had the most favorable microenvironment for cell distribution, growth and development in the studied co-culture that resulted in high levels of expression of proteins required for angiogenesis.

**Key words:** tissue engineering, PEGylated fibrin, hydrogel, vasculogenesis, 3D cell co-cultivation.