

УДК 616-77
DOI 10.17802/2306-1278-2022-11-4S-134-145

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НА СВОЙСТВА ФИБРИНОВЫХ МАТРИЦ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)

В.Г. Матвеева, Е.А. Сенокосова, М.Ю. Ханова, Т.В. Глушкова, Л.В. Антонова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновый бульвар 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Нами предложен и запатентован способ получения полностью аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина, который представляет интерес для реализации персонафицированного подхода в тканевой инженерии. Такой фибрин помимо отсутствия риска переноса инфекции и запуска иммунных реакций обладает большими прочностью и устойчивостью к деградации, а также лучшей гемосовместимостью по сравнению с фибрином, полимеризованным с помощью экзогенного тромбина, что является несомненным преимуществом при его применении в качестве модифицирующего покрытия протезов сосудов малого диаметра.

Актуальность	Аутологичный фибрин может выступать в качестве модифицирующего покрытия для придания биомиметических свойств различным полимерам, используемым в сосудистой инженерии. Традиционно полимеризацию фибриногена выполняют с помощью внесения экзогенного тромбина и хлорида кальция. Запатентованный нами способ получения фибрина без экзогенного тромбина позволяет получить полностью аутологичный материал, не имеющий риска переноса инфекций. Различия в способах полимеризации могут менять свойства фибрина.
Цель	Сравнить наиболее важные для сосудистой инженерии свойства фибрина, полученного различными способами: с использованием эндогенного (ФЭнТр) и экзогенного (ФЭкТр) тромбина <i>in vitro</i> .
Материалы и методы	Преципитат фибриногена выделяли методом этаноловой преципитации с низкой концентрацией этанола. Содержание фибриногена в преципитате нормировали до конечной концентрации в фибрине 30 мг/мл. Полимеризацию ФЭкТр выполняли путем внесения в преципитат 50 МЕ/мл тромбина и 0,2% хлорида кальция, ФЭнТр – только добавлением 0,2% хлорида кальция. Прочностные свойства образцов тестировали на разрывной машине Z (Zwick/Roell). Структуру фибрина изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии, проводили количественный анализ размера пор и волокон, плотность точек ветвления. Количественное содержание XIII фактора в плазме и полученном преципитате определяли методом иммуноферментного анализа. Активность XIII фактора исследовали по формированию γ-γ-сшивок методом SDS-PAGE, устойчивости образцов к протеолитической и фибринолитической деградации. Оценивали способность ФЭнТр и ФЭкТр активировать контактную коагуляцию и агрегацию тромбоцитов.
Результаты	В структуре образцов ФЭнТр преобладали более тонкие волокна, при этом образцы отличались большими прочностью и жесткостью. Описанные особенности могут быть связаны с более эффективной активацией XIII фактора, что подтверждается формированием большего количества γ-γ-димеров в образцах ФЭнТр, а также устойчивостью к протеолитической деградации по сравнению с ФЭкТр. Кроме того, образцы ФЭнТр <i>in vitro</i> меньше активировали тромбоциты по сравнению с ФЭкТр.
Заключение	Способ полимеризации фибрина с помощью эндогенного тромбина позволяет получить полностью аутологичный материал, который, по сравнению с фибрином, полимеризованным традиционным способом, обладает лучшими физико-механическими свойствами, стойкостью к протеолитической деградации и более низкой тромбогенностью.

Ключевые слова Фибрин • Тромбин • Полимеризация • XIII фактор • Сосудистые протезы • Модифицирующее покрытие

Поступила в редакцию: 10.08.2022; поступила после доработки: 12.09.2022; принята к печати: 27.10.2022

INFLUENCE OF THE POLYMERIZATION METHOD ON THE PROPERTIES OF FIBRIN MATRICES

V.G. Matveeva, E.A. Senokosova, M.Yu. Khanova, T.V. Glushkova, L.V. Antonova

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Highlights

- We have proposed and patented a method for obtaining fully autologous fibrin without the use of exogenous thrombin, which can be implemented within the framework of a personalized approach in tissue engineering. Such fibrin, in addition to lower risk of infection and inflammation, possesses greater strength and resistance to degradation, as well as better hemocompatibility compared to fibrin polymerized with exogenous thrombin, which is an undoubted advantage when used as a coating for small-diameter vascular grafts.

Background	Autologous fibrin can be used as a coating to impart biomimetic properties to various polymers used in vascular tissue engineering. Traditionally, fibrinogen polymerization is performed with the addition of exogenous thrombin and calcium chloride. Our patented method of obtaining fibrin without the use of exogenous thrombin allows us to obtain a completely autologous material that does not have the risk of infection. The differences in methods polymerization can change the fibrin properties.
Aim	To compare the most important properties of vascular tissue engineering of fibrin obtained by various methods: using endogenous thrombin and exogenous thrombin <i>in vitro</i> .
Methods	The fibrinogen precipitate was obtained with ethanol precipitation method using low concentration of ethanol. The content of fibrinogen in the precipitate was normalized to a final concentration in fibrin of 30 mg/mL. Polymerization of fibrin polymerized with exogenous thrombin was performed by adding 50 U/mL and 0.2% calcium chloride to the thrombin precipitate, fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin only by adding 0.2% calcium chloride. The strength properties of the samples were tested on a Z tensile tester (Zwick/Roell). The structure of fibrin was studied using scanning electron microscopy, a quantitative analysis of the size of pores and fibers, the density of branching points was carried out. The quantitative content of FXIII in plasma and the resulting precipitate was determined by ELISA. FXIII activity was studied by the formation of γ - γ crosslinks by SDS-PAGE, the resistance of samples to proteolytic and fibrinolytic degradation. The ability of fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin and fibrin polymerized with exogenous thrombin to activate contact coagulation and platelet aggregation was evaluated.
Results	Thinner fibers predominated in the structure of the fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin samples, while the samples were distinguished by greater strength and stiffness. The described features may be associated with a more efficient activation of FXIII, which is confirmed by the formation of a larger number of γ - γ dimers in fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin samples, as well as resistance to proteolytic degradation compared to fibrin polymerized with exogenous thrombin. Moreover, fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin samples <i>in vitro</i> activated platelets less than fibrin polymerized with exogenous thrombin.

Conclusion

The method for obtaining and polymerizing fibrin using endogenous thrombin makes it possible to obtain a completely autologous material that has better physical and mechanical properties, resistance to proteolytic degradation and lower thrombogenicity compared to traditional fibrin polymerization.

Keywords

Fibrin • Thrombin • Polymerization • Factor XIII • Vascular prostheses • Coating

Received: 10.08.2022; received in revised form: 12.09.2022; accepted: 27.10.2022

Список сокращений

АЧТВ – активированное частичное
тромбопластиновое время

ФЭКТр – фибрин, полимеризованный с
помощью экзогенного тромбина

ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помо-
щью активации эндогенного тромбина

FXIII – XIII фактор

Введение

Отсутствие на рынке медицинских изделий эффективных протезов сосудов малого диаметра актуализирует поиск решений данной проблемы и делает их чрезвычайно важными для сердечно-сосудистой хирургии. Среди обилия материалов и подходов наиболее успешными являются разработки, связанные с имитацией структуры и функции нативной сосудистой стенки [1, 2]. Данный подход позволяет поддерживать физиологические реакции, стимулировать интеграцию сосудистого протеза с окружающими тканями, что снижает риск осложнений после имплантации.

К сосудистым протезам предъявляется ряд требований, которые включают биосовместимость и биоактивность, соответствие физико-механическим характеристикам, низкую тромбогенность, отсутствие воспалительной и иммунной реакции организма на имплантат, а также потенциальную возможность передачи инфекции [3]. Синтетические полимеры в составе протезов (биоразлагаемые полиэферы, полисложноэфирные амиды, полиуретаны) позволяют в большей степени управлять механическими свойствами скаффолда [4]. Однако биосовместимость этих материалов довольно низкая, поскольку на поверхности отсутствуют сайты для адгезии клеток. Кроме того, при деградации возможно образование токсичных продуктов, вызывающих воспалительные и иммунные реакции [5].

Для нивелирования указанных недостатков предлагаются различные способы модификации полимерной матрицы, в том числе создание на поверхности изолирующего биоактивного слоя. Модифицирующее покрытие, или пропитывание каркасов биополимерами, формирует сайты клеточной адгезии и придает материалу биомиметические свойства. Наиболее популярными вариантами биополимеров для сосудистой инженерии являются коллаген, фибронектин, эластин, желатин, фибрин [6, 7]. Фибрин обладает рядом преимуществ,

которые связаны не только с его уникальными биологическими характеристиками, но и биодоступностью [8]. Аутологичный фибрин методологически просто в короткие сроки и в достаточном количестве можно получать из собственной крови пациента. Такой материал лишен риска переноса вирусных инфекций и иммунологических реакций организма. Волокна фибрина содержат сайты, необходимые для адгезии, миграции и пролиферации клеток, создают условия для формирования полноценной ткани [8]. Кроме того, фибрин отличается высоким сродством к различным биологическим поверхностям, способен формировать искусственную биомиметическую нишу с высоким регенеративным потенциалом [9] и повышать устойчивость клеток к смыванию потоком жидкости [10].

Фибрин представляет собой конечный продукт свертывания крови. Его полимеризация происходит под действием тромбина в присутствии ионов кальция. В большинстве протоколов для получения тканеинженерных продуктов полимеризацию фибриногена выполняют путем внесения экзогенного тромбина, выделенного из плазмы крови животных или человека. Несмотря на принимаемые производителем меры по снижению риска вирусного заражения препаратов из компонентов крови, опасность переноса инфекций сохраняется. Кроме того, введенный в организм реципиента чужеродный тромбин способен вызывать иммунную реакцию, формирование аутореактивных антител к собственному тромбину, а также сенсibilизацию и аллергические реакции [11, 12]. Нами предложен способ получения аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина, который исключает указанные недостатки [13]. Полимеризация фибриногена происходит путем активации эндогенного тромбина, который присутствует непосредственно в преципитате. Полученный таким образом полностью аутологичный фибрин может быть использован в качестве покрытия при создании тканеинже-

нерных персонифицированных конструкций.

Различия в способе получения фибрина могут вызвать изменения его свойств. С позиции дальнейшего применения фибрина для создания модифицирующего покрытия сосудистых протезов важно изучение структурных и прочностных характеристик, особенностей деградации и влияния на гемостаз.

Цель исследования – оценить и сравнить свойства фибрина, полимеризованного с использованием экзо- и эндогенного тромбина.

Материалы и методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 22 от 10 декабря 2015 г.). Использована донорская кровь от пациентов, подписавших информированное согласие на использование биоматериала в научных целях.

Получение фибрина

Получение преципитата

Аутологичный фибриноген выделяли из плазмы крови методом этаноловой преципитации с низким содержанием этанола. Для получения преципитата использовали донорскую кровь с цитратом натрия 3,8%, которую центрифугировали при 2 000 G в течение 10 мин. Плазму отбирали и при постоянном перемешивании в плазму вносили ледяной 18% этанол на Нерес-буфере (pH 7.4, Gibco, США) до соотношения 1:1. Полученный раствор плазмы в этаноле инкубировали в течение часа при температуре 0 °C и постоянном встряхивании на шейкере, далее центрифугировали при 1 200 G и 4 °C в течение 30 мин. Надосадок удаляли, а преципитат растворяли в Нерес-буфере до получения конечной концентрации фибриногена в фибрине 30 мг/мл.

Полимеризация фибриногена

Полимеризацию фибриногена выполняли двумя способами: традиционно – с использованием 50 МЕ/мл экзогенного тромбина (Sigma-Aldrich, США) и 0,2% раствора кальция хлорида (Sigma-Aldrich, США) (далее по тексту ФЭкТр); без экзогенного тромбина путем добавления 0,2% раствора кальция хлорида (Sigma-Aldrich, США) (далее по тексту ФЭнТр) – патент РФ № 2758260 [13]. Для подавления фибринолиза в раствор для полимеризации вносили аprotинин в конечной концентрации 100 КИЕ/мл. Смесь преципитата и раствор для полимеризации перемешивали, заливали в соответствующую форму и оставляли для полимеризации на 1–1,5 ч при комнатной температуре.

Изучение механических свойств

Оценку механических свойств образцов осуществляли в соответствии с ISO 37:2017 в условиях одноосного растяжения на универсальной

испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), используя датчик с номинальной силой 50 Н. Испытания проводили в термокамере при температуре 37 °C, скорость перемещения траверсы при испытании составила 50 мм/мин. Образцы для исследования готовили на вырубном прессе ZCP 020 (Zwick/Roell, Германия) с использованием ножа специальной формы. Толщину образцов измеряли толщиномером ТР (ЗАО «Красный инструментальщик», Россия) с пределом допустимой погрешности $\pm 0,01$ мм и прижимным усилием 1,5 Н. Предел прочности определяли по максимальному напряжению при растяжении (МПа), упруго-деформативные свойства – по относительному удлинению, до начала разрушения (%), модулю Юнга (МПа), исследовали в пределах малых деформаций. В качестве эталонного контроля использовали а. маммагiа, т. к. именно она является аутососудом выбора при коронарном шунтировании.

Количественное содержание XIII фактора

В соответствии с протоколом к набору Human Factor XIII ELISA kit (ab108836) (Abcam, Великобритания), выполняли количественное определение XIII фактора (FXIII) непосредственно в плазме крови для приготовления преципитата и в полученном преципитате.

Изучение структуры фибриновых матриц

Структуру фибриновых матриц изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Полученные образцы фиксировали в 1% растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в течение суток, отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера (Gibco, США) и в дистиллированной воде. После этого образцы замораживали и лиофилизировали в установке Freezone 2.5 (Labconco, США) при температуре -40 °C и давлении $<0,133$ мбар. Подготовленные образцы монтировали на специальные столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее (Au/Pd) покрытие толщиной 7 нм в установке EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия). Структуру оценивали на микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Для измерения диаметра волокон и размера пор использовали программное обеспечение сканирующей электронной микроскопии. Для каждого образца проводили не менее 50 измерений. Подсчет точек разветвления волокон (точки, в которых три или более волокна соединяются вместе) выполняли в программе ImageJ (Wayne Rasband, NIH, США). На изображении точки были отмечены курсором и подсчитаны. Плотность ветвления рассчитана как число точек ветвления волокна на 1 мкм^2 .

Анализ поперечных сшивок фибрина с помощью SDS-PAGE

В пластиковых пробирках полимеризовали по 100 мкл образцов ФЭнТр и ФЭкТр. В качестве контроля использовали преципитат с добавлением гепарина («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). Для денатурации фибрина и восстановления дисульфидных связей белков к 100 мкл образцов фибрина и контроля добавляли 300 мкл восстанавливающего буфера (0,05 М трис-HCl (Helicon, Россия) pH 8,5, содержащего 8 М мочевины (Amresco, США), 2% SDS (Sigma-Aldrich, США) и 2% β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США)), нагревали до 100 °С в течение 20 мин на твердотельном термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия), после добавляли 300 мкл дистиллированной воды. Для визуализации образцов при проведении электрофореза применен ведущий краситель – 0,1% бромфеноловый синий (Thermo Fisher Scientific, США). Окрашенные образцы в объеме 10 мкл вносили в 1,5 мм полиакриламидный гель NuPAGE 4–12% Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific, США). В роли маркера молекулярных масс выступил Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, США). Электрофорез проводили при напряжении 150 В в течение 2 ч с использованием буфера для разделения белков NuPAGE MES SDS (Thermo Fisher Scientific, США), антиоксиданта NuPAGE и камеры для вертикального электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific, США). Далее гели окрашивали Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich, США) 2,5 г/л в 45% метаноле, 10% уксусной кислоте в течение часа при комнатной температуре с покачиванием. Процедуру вымывания не связавшегося с белком красителя проводили трехкратно в 5% уксусной кислоте при кипячении, далее в 3% уксусной кислоте в течение ночи при комнатной температуре с покачиванием. Анализ ширины и интенсивности окраски полос выполняли в программе ImageJ, данные представлены в условных единицах (УЕ).

Изучение деградации фибрина

Исследовали фибринолитическую (воздействие плазмина) и протеолитическую (воздействие трипсина) деградацию фибрина. Для этого в одинаковых пробирках полимеризовали по 1 мл ФЭнТр и ФЭкТр. Апротинин в данном исследовании не использовали. На готовые образцы аккуратно вносили по 1 мл раствора 0,1 Е/мл плазмина или 0,1% трипсина, приготовленных на физиологическом растворе с добавлением 0,02% азида натрия (для предотвращения контаминации микроорганизмами), и инкубировали при температуре 37 °С до полного растворения. Раствор с активаторами деградации меняли каждые 3 дня. Оценку фибринолиза фибриновых сгустков проводили визуально по процентному уменьшению объема сгустков.

Изучение тромбогенности материала

Влияние фибрина на коагуляционный гемостаз

В качестве теста контактной активации коагуляционного звена гемостаза использовали активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). АЧТВ исследовали в обедненной тромбоцитами плазме крови донора после контакта с ФЭкТр ($n = 7$) и ФЭнТр ($n = 7$) в течение 30 мин при 37 °С. Контролем служила интактная плазма ($n = 7$).

Влияние фибрина на тромбоцитарный гемостаз

Способность образцов активировать тромбоцитарную агрегацию изучена после контакта обогащенной тромбоцитами плазмы крови донора с поверхностью ФЭнТр ($n = 6$) и ФЭкТр ($n = 6$) в течение 5 мин при температуре 37 °С. Интактную плазму использовали в качестве контроля ($n = 6$). Проводили измерение спонтанной и активированной индуктором агрегации тромбоцитов (4 мкМ/л аденозиндифосфата).

Статистический и графический анализ результатов

Обработку результатов выполняли в программе Prism 6 (GraphPad Software, США). Количественные данные носили неправильное распределение, поэтому представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартилей (Median (Q1; Q3)). Достоверность различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни. Сравнение между несколькими группами проводили методом ANOVA и коррекцией результатов с учетом множественности сравнения методом FDR. Наличие статистической значимости для всех исследований – при $p < 0,05$.

Результаты

Механические свойства фибриновых матриц

Следует отметить, что предел прочности при растяжении, модуль Юнга (жесткость) и относительное удлинение при разрыве для любого из вариантов фибриновых матриц значительно отличались от а. marmaria (табл. 1). Тем не менее предел прочности и модуль Юнга для матриц ФЭнТр были выше по сравнению с ФЭкТр. Большей пластичностью обладали образцы ФЭнТр, поскольку относительное удлинение при разрыве для образцов ФЭнТр было выше, чем для ФЭкТр.

В рамках данного эксперимента описанные различия могут быть связаны со структурными особенностями матриц.

Микроструктура фибриновых матриц

Все образцы фибрина имели волокнисто-пористую структуру сформированную сетью разветвленных переплетающихся волокон. Однако отмечены микроструктурные различия сетей ФЭкТр и

ФЭнТр. Фибриновая сеть эндогенного тромбина состояла из более тонких волокон (123 (101; 148,3) нм) и мелких пор (528 (387; 793) нм) по сравнению с экзогенным тромбином (151 (123; 190,3) и 626,5 (493,8; 873) нм соответственно) (рис. 1, А–D).

На механическую прочность и жесткость фибриновых образцов значимо влияло количество сшивок между волокнами фибрина, что отражает показатель плотности точек ветвления волокон фибрина в образцах. Действительно, плотность точек ветвления в структуре ФЭнТр была выше (8,39 (7,19; 8,68) мкм²), чем в образцах ФЭкТр (5,54 (5,64; 6,51) мкм²).

Сохранение FXIII в полученном преципитате

Сшивание фибриновых нитей в физиологических условиях происходит под влиянием FXIII. Выполнен подсчет процента осажденного FXIII в составе полученного нами преципитата от исходного содержания в плазме крови. Количество FXIII в плазме крови, использованной для приготовления

преципитата, составило 21,1–22,2 мкг/мл. После выделения преципитата и доведения количества фибриногена до 30 мг/мл содержание FXIII в преципитате составило 96,0–106,5 мкг/мл. Нормирование количества FXIII в преципитате к исходному объему плазмы (один объем преципитата получен из пяти объемов плазмы) показало сохранение 90,8–95,8% FXIII в преципитате от общего содержания в плазме.

Количественное содержание FXIII в параллельных образцах ФЭнТр и ФЭкТр было одинаковым, поскольку для заливки использовали один и тот же преципитат. Однако активация FXIII в одном случае происходила только эндогенным тромбином, в другом – комбинацией эндо- и экзогенного тромбина, что может влиять на активность FXIII. Показателем активности FXIII может выступать количество специфических сшивок γ-γ-цепей в образцах фибрина [14].

Детекция γ-γ-сшивок с помощью SDS-PAGE

В контрольном образце, содержащем неполимеризованный фибриноген, присутствовали мономеры Аα-, Вβ- и γ-цепей. Наличие А- и В-фибринопептидов в составе α- и β-цепей контроля можно заметить по небольшому смещению их бенда в сторону меньшей молекулярной массы в полимеризованных образцах. В образцах ФЭнТр и ФЭкТр мономеры γ-цепей не обнаружены, но отмечено появление γ-γ-димеров (рис. 2, А).

Количественный анализ бендов показал (рис. 2, В), что образцам ФЭнТр соответствуют большая площадь (145,5 (140,8; 158) УЕ) и более интенсивная окраска полосы γ-γ-димеров (141,8 (137,8; 148,5) УЕ) в сравнении с ФЭкТр (130 (127,3; 0134,5) и 114 (104,9; 126,7) УЕ соответственно). Эти результаты подтверждают присутствие большего количества γ-γ-сшивок в структуре ФЭнТр.

Дегградация фибриновых матриц

Для изучения скорости дегградации залиты образцы фибрина без использования ингибитора про-

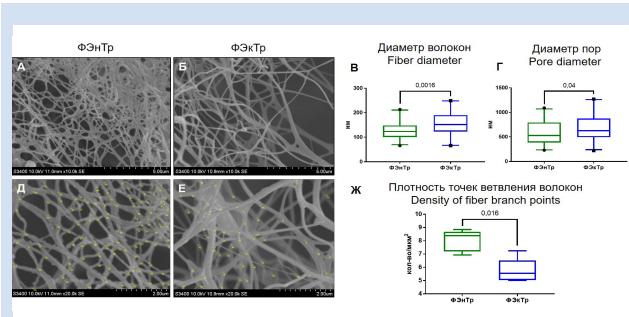


Рисунок 1. Типичные снимки со сканирующей электронной микроскопии: А, В – микроструктура фибрина (ув. 10 000); С, D – точки ветвления фибриновых волокон (ув. 20 000); Е–G – количественный анализ структурных показателей у различных вариантов фибрина
Примечание: ФЭкТр – фибрин, полимеризованный с помощью экзогенного тромбина; ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помощью активации эндогенного тромбина.
Figure 1. Typical SEM images: A, B – microstructure of fibrin (magnitude 10,000); C, D – branching points of fibrin fibers (magnitude 20,000); E–G – quantitative analysis of fibrin structural parameters
Примечание: Here and in Fig. 2, 3: ФЭкТр – fibrin polymerized with exogenous thrombin; ФЭнТр – fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin.

Таблица 1. Показатели прочности образцов различных групп фибрина и a. mammaria Table 1. Strength of samples of different groups of fibrin and a. mammaria			
Показатель / Parameter	a. mammaria, n = 8	ФЭнТр / Fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin, n = 6	ФЭкТр / Fibrin polymerized with exogenous thrombin, n = 6
Предел прочности, мПа / Tensile strength, mPa	2,13 (0,14; 2,66)	0,99 (0,91; 1,08)*	0,17 (0,14; 0,23)*#
Модуль Юнга, мПа / Young's modulus, mPa	2,685 (1,943; 3,243)	0,214 (0,203; 0,218)*	0,063 (0,056; 0,073)*#
Относительное удлинение при разрыве / Elongation at break, %	29,79 (24,01; 42,07)	251,2 (241,9; 262,8)*	174,6 (161,7; 180,1)*#

Примечания: * p<0,05 по сравнению с a. mammaria; # p<0,05 по сравнению с ФЭнТр; ФЭкТр – фибрин, полимеризованный с помощью экзогенного тромбина; ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помощью активации эндогенного тромбина.
Notes: * p<0.05 compared to a. mammaria; # p<0.05 compared to fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

теаз апротинина. Фибринолитическую деградацию фибрина стимулировали с помощью плазмينا, протеолитическую – под действием трипсина.

Под действием 0,1 Е/мл плазмина деградация фибрина происходила интенсивнее, чем при воздействии трипсина, и полностью завершилась через 48 ч (рис. 3, А). Мы не регистрировали различий в устойчивости к плазмину образцов ФЭнТр и ФЭкТр. Иная ситуация наблюдалась в отношении трипсиновой деградации. 0,1% трипсину понадобилось 64 ч для полной деградации ФЭкТр и 86 ч – для ФЭнТр (рис. 3, В). Так, образцы ФЭнТр демонстрировали большую устойчивость к протеолитической деградации, чем ФЭкТр.

Тромбогенность фибриновых матриц

Изучена способность различных вариантов фибрина к контактной активации коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза в условиях *in vitro*. Укорочение АЧТВ после контакта с образцами ФЭнТр и ФЭкТр по сравнению с контролем (табл. 2) свидетельствует об активации ими коагуляцион-

ного звена гемостаза. При этом значимых различий показателей АЧТВ между группами ФЭнТр и ФЭкТр не выявлено.

В отношении влияния на тромбоцитарный гемостаз стоит отметить, то образцы ФЭнТр практически не активировали тромбоцитарную агрегацию. Об этом свидетельствует отсутствие различий максимальной агрегации и площади под кривой по сравнению с контрольной группой (интактная тромбоцитарная плазма) (см. табл. 2). При этом матрицы ФЭкТр демонстрировали значимую контактную активацию тромбоцитов по сравнению с ФЭнТр и контролем.

Обсуждение

Первый этап получения фибрина включает выделение преципитата из плазмы. Выбор метода этаноловой преципитации с низким содержанием этанола обусловлен возможностью в короткие сроки (2–2,5 ч) получить преципитат с максимальным сохранением содержания фибриногена, а также физико-механических и биологических свойств будущего фибрина [15, 16]. По данным различных исследователей, в преципитате сохраняется до 80% от его содержания в плазме крови. Для сравнения, в случае получения преципитата методом криопреципитации этап за- и разморозки занимает до 30 ч,

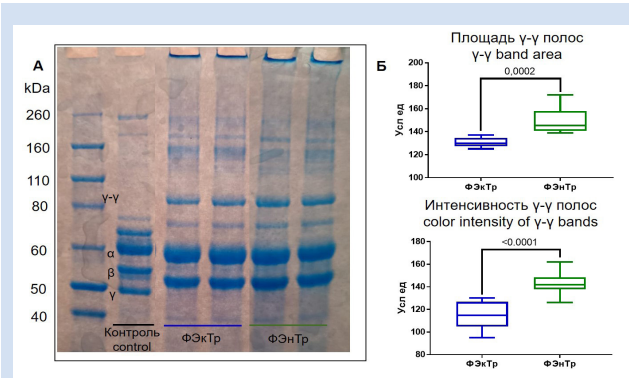


Рисунок 2. SDS-PAGE образцов фибрина, полученных различными способами: А – контроль, неполимеризованный образец; В – количественная характеристика бендов γ-γ-димеров
Примечание: ФЭкТр – фибрин, полимеризованный с помощью экзогенного тромбина; ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помощью активации эндогенного тромбина.
Figure 2. SDS-PAGE of fibrin samples obtained by various methods (A – control, unpolymerized sample); B – quantitative characterization of γ-γ dimer bands

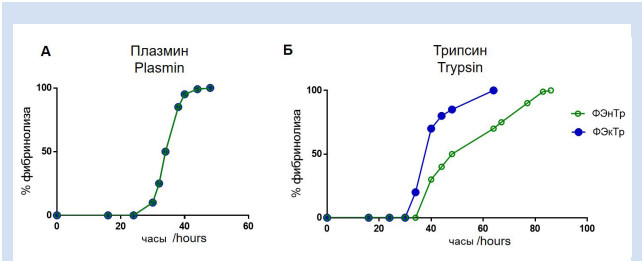


Рисунок 3. Деградация образцов фибрина под воздействием: 0,1 Е/мл плазмина (А) и 0,1% трипсина (В)
Примечание: ФЭкТр – фибрин, полимеризованный с помощью экзогенного тромбина; ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помощью активации эндогенного тромбина.
Figure 3. Fibrin degradation under the influence of: A. plasmin 0.1 U/mL, B. trypsin 0.1%.

Таблица 2. Показатели контактной активации коагуляционного и тромбоцитарного звеньев гемостаза образцами различных групп фибрина
Table 2. Contact activation of the coagulation and platelet hemostasis by different fibrin groups

Показатель / Parameter	Контроль / Control, n = 7	ФЭнТр / Fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin, n = 6	ФЭкТр / Fibrin polymerized with exogenous thrombin, n = 6
АЧТВ, с / APPT, s	33,8 (33,5; 34,0)	27,3 (26,6; 28,0)*	26,2 (25,8; 26,5)*
Максимальная агрегация тромбоцитов / Maximum platelet aggregation, %	76,8 (75,6; 78,6)	76,81 (70,7; 80,7)	89,9 (84,4; 92,1)*#
Площадь под кривой агрегации тромбоцитов / Area under the platelet aggregation curve, %	54,1 (51,9; 56,8)	55,8 (45,2; 63,3)	66,9 (62,4; 69,8)*#

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с ФЭнТр; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ФЭкТр – фибрин, полимеризованный с помощью экзогенного тромбина; ФЭнТр – фибрин, полимеризованный с помощью активации эндогенного тромбина.
Note: * $p < 0.05$ compared with control; # $p < 0.05$ in comparison with fibrin polymerized by activation of endogenous thrombin; APTT – activated partial thromboplastin time.

при этом итоговый выход фибриногена, по данным различных авторов, составляет от 24 до 36% от содержания в плазме [17]. Преципитация аммония сульфатом дает удовлетворительный выход фибриногена ($54,8 \pm 5,3$; $69,5 \pm 9,9$), однако присутствие солей сульфата аммония вызывает закисление среды и негативно влияет на клеточную жизнедеятельность. Метод преципитации полиэтиленгликолем при удовлетворительном выходе фибриногена ($61,3 \pm 9,4\%$) демонстрирует наиболее низкие прочностные показатели, а заселение клетками не способствует их улучшению, что объясняется негативным влиянием полиэтиленгликоля на синтез клетками белков внеклеточного матрикса [15, 16].

Помимо фибриногена в преципитате содержатся другие белки, в том числе FXIII, $\alpha 2$ -антиплазмин, $\alpha 2$ -макроглобулин, растворимая форма фибронектина [18], что является крайне полезным для стабилизации и сохранения сгустка фибрина. Согласно полученным нами данным, выбранный метод преципитации позволяет сохранить в преципитате более 90% FXIII. Для полимеризации ФЭкТр и ФЭнТр мы использовали один и тот же преципитат, следовательно, концентрация FXIII была одинаковой. Заметим, что функциональность FXIII зависит не только от концентрации, но и его активности.

Активация FXIII происходит под действием тромбина в присутствии ионов кальция. Тромбин запускает протеолитическое расщепление гетеротетрамера FXIII на субъединицы А и В. Далее в присутствии ионов кальция субъединицы А претерпевают конформационные изменения, в результате формируется активный FXIII (FXIIIa). FXIIIa представляет собой фермент транслутаминазу, которая сшивает фибриновые волокна, образуя межмолекулярные ковалентные связи γ -глутамил – ϵ -лизил между С-концевыми частями γ - и α -цепей [14, 19]. При этом образуются γ - γ -димеры и α - α -полимеры. Плотная ковалентная сшивка внутри и между протофибриллами делает процесс полимеризации необратимым и стабилизирует полимеры фибрина, придавая им механическую прочность и устойчивость к лизису [20]. По данным различных авторов, поперечное сшивание волокон фибрина FXIII способно в 2–5 раз повысить прочность сгустка по сравнению с несшитым фибрином [21, 22]. В условиях нашего эксперимента при одинаковой концентрации FXIII в преципитате готовые образцы фибрина значительно отличались по структурным и прочностным характеристикам. Возможная причина может быть связана с активностью FXIIIa. Мы предполагаем, что FXIII более эффективно активируется эндогенным тромбином в случае полимеризации ФЭнТр, чем комбинацией эндо- и экзогенного тромбина в образцах ФЭкТр.

В пользу этой гипотезы свидетельствуют следующие аргументы. Во-первых, визуализация ма-

триксов с помощью сканирующей электронной микроскопии показала, что матрицы ФЭнТр состоят из более тонких по сравнению с ФЭкТр волокон (см. рис. 1), при этом образцы ФЭнТр обладали более высокой прочностью и жесткостью (см. табл. 1). Полученная закономерность находит объяснение в работе W. Li и коллег, которые доказали, что жесткость фибриновых волокон находится в обратной зависимости от их диаметра [23]. Это связано с неоднородностью упаковки протофибрилл в волокна фибрина. Более тонкое волокно имеет большие жесткость и прочность, поскольку плотность упаковки протофибрилл в волокне выше. В уплотнении и созревании волокон фибрина важную роль играет перекрестное сшивание волокон, опосредованное FXIII [24]. E.L. Nethershaw и соавт. показал, что уплотнение протофибрилл в волокне в присутствии FXIII происходит за счет образования поперечных связей между протофибриллами внутри волокна [24]. Созревание фибриновых волокон в сшитых сгустках включает быстрое сшивание γ -цепей и более медленную олигомеризацию α -цепей, которая сопровождает латеральную агрегацию протофибрилл. При этом именно γ - γ -димеризация обеспечивает условия для формирования γ - γ -сшивок более высокого порядка, которые максимально увеличивают жесткость и прочность сгустка [14, 16]. Эти данные литературы согласуются с нашими результатами, которые являются вторым аргументом: в структуре ФЭнТр присутствует большее количество γ - γ -димеров (ширина и интенсивность полосы) при более высокой прочности/жесткости образцов по сравнению с ФЭкТр. В-третьих, большая жесткость матриц ФЭнТр сочетается с более высокой плотностью точек ветвления волокон и меньшим диаметром пор по сравнению с ФЭкТр. При прочих равных условиях жесткость фибриновой матрицы повышается при увеличении плотности точек ветвления и снижении диаметра пор, в формировании которых участвует FXIIIa [22].

Известно, что наличие дополнительных поперечных сшивок в фибрине повышает не только прочность образцов, но и устойчивость к деградации, в том числе к фибрино- и протеолитической [24, 25]. Сшитые FXIII сети фибрина содержат более тонкие/компактные волокна и меньший размер пор, что делает их более устойчивыми к фибрино- и протеолиту в сравнении с несшитыми сетями, состоящими из более крупных пор и более толстых волокон [26]. С одной стороны, тонкие, плотно упакованные волокна фибрина демонстрируют пониженное связывание tPA и плазминогена, что обуславливает снижение скорости превращения плазминогена в плазмин [27]. С другой стороны, FXIIIa снижает активность плазмينا за счет перекрестного связывания $\alpha 2$ -антиплазмينا с α -цепью фибрина [28]. Однако структурные изменения оказывают менее значимое влия-

ние на фибринолитические процессы по сравнению с ретракцией или физическим уплотнением фибриновых сгустков в присутствии FXIII. Ретракция/уплотнение сближают волокна фибрина, создавая условия для их дополнительного сшивания FXIIIa и включения $\alpha 2$ -антиплазмина в структуру волокна. D.C. Rijken и коллеги показали, что лизис уплотненных сгустков сильно ингибируется FXIIIa, поскольку он предотвращает вытеснение $\alpha 2$ -антиплазмина из сгустка во время уплотнения почти в 10 раз [25]. Другой механизм, снижающий деградацию фибрина при ретракции/уплотнении, связан с уменьшением проницаемости и замедлением диффузии фибринолитических белков в сгусток [24].

В представленном исследовании мы не получили значимых различий в фибринолитической устойчивости образцов с различными вариантами полимеризации. Это может быть связано с недостаточной чувствительностью метода плазминовой деградации для детекции минимальных различий в количестве γ - γ -димеров, зарегистрированных с использованием SDS-PAGE (см. рис. 2). Согласно литературным данным, γ - γ -димеризация происходит на ранней стадии образования сгустка и сама по себе значимо не увеличивает время фибринолиза [25]. Более наглядно различия в стабилизации фибринового сгустка FXIII продемонстрировала протеолитическая деградация. Так, в условиях воздействия трипсина деградация сгустков ФЭнТр проходила медленнее, чем у ФЭкТр (см. рис. 3).

Полученные нами данные подтверждают гипотезу о более эффективной полимеризации и активации FXIII в случае использования предложенного нами метода по сравнению с классическим. Об этом свидетельствуют большее количество γ - γ -сшивков, более тонкие волокна и большая плотность точек ветвления, меньший диаметр пор, что в свою очередь обуславливает уплотнение и упрочнение волокон с лучшей устойчивостью к протеолитической деградации у образцов ФЭнТр. Мы полагаем, что столь эффективная полимеризация и активация FXIII в образцах ФЭнТр может быть связана с частичным конкурентным вытеснением из реакций более специфичного эндогенного тромбина менее специфичным экзогенным. Действительно, в полимеризации ФЭнТр участвует исключительно аутологичный тромбин, тогда как реакция полимеризации ФЭкТр проходит в присутствии как экзогенного, так и аутологичного эндогенного тромбина, что не исключает конкурентное влияние двух видов тромбина.

Успех имплантации сердечно-сосудистых протезов во многом зависит от низкой тромбогенности

материала, контактирующего с кровью. Поэтому к преимуществам ФЭнТр можно отнести более низкую, по сравнению с ФЭкТр, активацию тромбоцитов (см. табл. 2). Полимеризация ФЭкТр сопряжена с использованием более высокой концентрации тромбина, поскольку помимо присутствующего в преципитате эндогенного тромбина дополнительно вносится экзогенный. Возможно, более высокая тромбогенность ФЭкТр связана с остаточным, не израсходованным в процессе полимеризации тромбином, который высвобождаясь из фибринового сгустка способен запускать нежелательную стимуляцию тромбоцитов.

Данное исследование выполнено в формате *in vitro* и является первым шагом, определяющим целесообразность тестирования предложенного способа полимеризации на лабораторных животных.

Заключение

Способ получения аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина позволяет исключить возможность переноса инфекционных заболеваний, снизить риск сенсibilизации, активации иммунного и воспалительного ответа у реципиента. Кроме этих очевидных преимуществ полученный фибрин приобретает высокую прочность и жесткость, устойчивость к деградации и характеризуется меньшей тромбогенностью. С учетом вышесказанного данный способ полимеризации будет предпочтительным при модификации или создании внутреннего покрытия протезов сосудов малого диаметра и других медицинских изделий, контактирующих с кровью.

Конфликт интересов

В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Сенокосова заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Ханова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.В. Антонова заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

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 персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

Информация об авторах

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории клеточных

Author Information Form

Matveeva Vera G., PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental

технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Сенокосова Евгения Андреевна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-9430-937X

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8826-9244

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Антонова Лариса Валерьевна, доктор медицинских наук заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Senokosova Evgenia A., PhD, Researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-9430-937X

Khanova Maryam Y., Junior Researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8826-9244

Glushkova Tatyana V., PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Novel Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Antonova Larisa V., PhD, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

Вклад авторов в статью

МВГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СЕА – получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ХМЮ – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГТВ – получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

АЛВ – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

MVG – contribution to the concept and design of the study, data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

SEA – data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KhMYu – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GTV – data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

ALV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fang S., Ellman D.G., Andersen D.C. Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells*. 2021; 10: 713. doi: 10.3390/cells10030713.

2. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Ханова М.Ю., Севостьянова В.В., Цепкина А.В., Эльгудин Я.Л., Барбараш Л.С. Оценка in vitro активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матриксы на основе полигидроксидибутрата/валерата и поликапролактона. Комплексные пробле-

мы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018; 7(2): 89-101. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101

3. Song H.G., Rumma R.T., Ozaki C.K., Edelman E.R., Chen C.S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018; 22 (3): 340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.00910.

4. Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016; 22 (1): 68-100. doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100

5. Mariani E., Lisignoli G., Borzi R.M., Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (3): 636. doi: 10.3390/ijms20030636.
6. Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C., Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering (Basel)* 2020; 7(4): 160. doi: 10.3390/bioengineering7040160.
7. Egorikhina M.N., Aleynik D.Ya., Rubtsova Y.P., Levin G.Ya., Charykova I.N., Semenycheva L.L., Bugrova M.L., Zakharychev E.A. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics. *Bioact. Mater.* 2019; 4: 334-345. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.003.
8. Podolnikova N.P., Yakovlev S., Yakubenko V.P., Wang X., Gorkun O.V., Ugarova T.P. The interaction of integrin α IIb β 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the α IIb β -propeller domain. *J Biol Chem.* 2014; 289 (4): 2371-2383. doi: 10.1074/jbc.M113.518126.
9. Egorikhina M.N., Rubtsova Y.P., Charykova I.N., Bugrova M.L., Bronnikova I.I., Mukhina P.A., Sosnina L.N., Aleynik D.Y. Biopolymer Hydrogel Scaffold as an Artificial Cell Niche for Mesenchymal Stem Cells. *Polymers (Basel)*. 2020; 12(11): 2550. doi: 10.3390/polym12112550.
10. 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. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res.* 2014; 63 (2): 167-177. doi: 10.33549/physiolres.932577.
11. Lo C.Y., Jones C., Glader B., Zehnder J.L. Development of antibodies to human thrombin and factor V in a pediatric patient exposed to topical bovine thrombin. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 55 (6): 1195-1197. doi: 10.1002/pbc.22699.
12. Diesen D.L., Lawson J.H. Bovine thrombin: history, use, and risk in the surgical patient. *Vascular.* 2008, Suppl 1: S29-36. Erratum in: *Vascular.* 2009; 17 (3): 181. PMID: 18544303
13. Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина. патент RU 2758260 C1. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Дата регистрации: 27.10.2021.
14. Standeven K.F., Carter A.M., Grant P.J., Weisel J.W., Chernysh I., Masova L., Lord S.T., Ariens R.A. Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood.* 2007; 110 (3): 902-907. doi: 10.1182/blood-2007-01-066837.
15. Weis-Fogh U.S. Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in a tissue adhesive system. *Eur Surg Res.* 1988; 20 (5-6): 381-389. doi: 10.1159/000128789.
16. Dietrich M., Heselhaus J., Wozniak J., Weinandy S., Mela P., Tschoeke B., Schmitz-Rode T., Jockenhoevel S. Fibrin-based tissue engineering: comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013; 19 (3): 216-226. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0473.
17. Casali B., Rodeghiero F., Toso A., Palmieri B., Immovilli R., Ghedini C., Rivasi P. Fibrin glue from single-donation autologous plasmapheresis. *Transfusion.* 1992; 32(7): 641-643. doi: 10.1046/j.1537-2995.1992.32792391037.x.
18. Ismail A.E. Purification of fibrinogen from human plasma. Chemical & Biomolecular Engineering Theses 2012, Dissertations, & Student Research 13. Available at: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=chemengtheses> (accessed 09.10.2021)
19. Ariens R.A.S., Lai T.S., Weisel J.W., Greenberg C.S., Grant P.J. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002; 100: 743-754. doi: 10.1182/blood.V100.3.743.
20. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013; 121(10): 1712-1719. doi:10.1182/blood-2012-09-306639
21. Collet J.P., Shuman H., Ledger R.E., Lee S., Weisel J.W. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102, (26): 9133-9137. doi: 10.1073/pnas.0504120102.
22. Ryan E.A., Mockros L.F., Stern A.M., Lorand L. Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology. *Biophys. J* 1999; 77 (5): 2827-2836. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77114-6.
23. Li W., Sigley J., Pieters M., Helms C.C., Nagaswami C., Weisel J.W., Guthold M. Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophys J.* 2016; 110 (6): 1400-1410. doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.021.
24. Hethershaw E.L., Cilia La Corte A.L., Duval C., Ali M., Grant P.J., Ariens R.A., Philippou H. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2014; 12: 197-205. doi: 10.1111/jth.12455.
25. Rijken D.C., Abdul S., Malfliet J.J., Leebeek F.W., Uitte de Willige S. Compaction of fibrin clots reveals the antifibrinolytic effect of factor XIII. *J Thromb Haemost.* 2016; 14 (7): 1453-1461. doi: 10.1111/jth.13354.
26. Collet J.P., Park D., Lesty C., Soria J., Soria C., Montalescot G., Weisel J.W. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1354.
27. Mutch N.J., Engel R., de Uitte W.S., Philippou H., Ariens R.A. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood* 2010; 115 (19): 3980-3988. doi: 10.1182/blood-2009-11-254029.
28. Fraser S.R., Booth N.A., Mutch N.J. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood* 2011; 117: 6371-6374. doi: 10.1182/blood-2011-02-333203.

REFERENCES

1. Fang S., Ellman D.G., Andersen D.C. Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their In Vivo Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells.* 2021; 10: 713. doi: 10.3390/cells10030713.
2. Antonova L.V., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Khanova M.Y., Sevostyanova V.V., Tsepokina A.V., Elgudin Y.L., Barbarash L.S. In vitro activity of bioactive molecules incorporated into poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/ poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2018;7(2):89-101. (In Russian) <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101>
3. Song H.G., Rumma R.T., Ozaki C.K., Edelman E.R., Chen C.S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell.* 2018; 22 (3): 340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.00910.
4. Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016; 22 (1): 68-100. doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100
5. Mariani E., Lisignoli G., Borzi R.M., Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (3): 636. doi: 10.3390/ijms20030636.
6. Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C.,

Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering* (Basel) 2020; 7(4): 160. doi: 10.3390/bioengineering7040160.

7. Egorikhina M.N., Aleynik D.Ya., Rubtsova Y.P., Levin G.Ya., Charykova I.N., Semenycheva L.L., Bugrova M.L., Zakharychev E.A. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics. *Bioact. Mater.* 2019; 4: 334-345. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.003.

8. Podolnikova N.P., Yakovlev S., Yakubenko V.P., Wang X., Gorkun O.V., Ugarova T.P. The interaction of integrin α IIb β 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the α IIb β -propeller domain. *J Biol Chem.* 2014; 289 (4): 2371-2383. doi: 10.1074/jbc.M113.518126.

9. Egorikhina M.N., Rubtsova Y.P., Charykova I.N., Bugrova M.L., Bronnikova I.I., Mukhina P.A., Sosnina L.N., Aleynik D.Y. Biopolymer Hydrogel Scaffold as an Artificial Cell Niche for Mesenchymal Stem Cells. *Polymers* (Basel). 2020; 12(11): 2550. doi: 10.3390/polym12112550.

10. 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. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res.* 2014; 63 (2): 167-177. doi: 10.33549/physiolres.932577.

11. Lo C.Y., Jones C., Glader B., Zehnder J.L. Development of antibodies to human thrombin and factor V in a pediatric patient exposed to topical bovine thrombin. *Pediatr Blood Cancer.* 2010; 55 (6): 1195-1197. doi: 10.1002/pbc.22699.

12. Diesen D.L., Lawson J.H. Bovine thrombin: history, use, and risk in the surgical patient. *Vascular.* 2008, Suppl 1: S29-36. Erratum in: *Vascular.* 2009; 17 (3): 181. PMID: 18544303

13. Method for the manufacture of autologous fibrin with controlled fibrinogen content without the use of exogenous thrombin. patent RU 2758260 C1. Antonova L.V., Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Date of registration: 27.10.2021 (in Russian)

14. Standeven K.F., Carter A.M., Grant P.J., Weisel J.W., Chernysh I., Masova L., Lord S.T., Ariens R.A. Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood.* 2007; 110 (3): 902-907. doi: 10.1182/blood-2007-01-066837.

15. Weis-Fogh U.S. Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in a tissue adhesive system. *Eur Surg Res.* 1988; 20 (5-6): 381-389. doi: 10.1159/000128789.

16. Dietrich M., Heselhuis J., Wozniak J., Weinandy S., Mela P., Tschoeke B., Schmitz-Rode T., Jockenhoel S. Fibrin-based tissue engineering: comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013; 19 (3): 216-226. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0473.

17. Casali B., Rodeghiero F., Toso A., Palmieri B., Immovilli R., Ghedini C., Rivasi P. Fibrin glue from single-donation autologous plasmapheresis. *Transfusion.* 1992; 32(7): 641-643. doi: 10.1046/j.1537-2995.1992.32792391037.x.

18. Ismail A.E. Purification of fibrinogen from human plasma. *Chemical & Biomolecular Engineering Theses* 2012, Dissertations, & Student Research 13. Available at: <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=chemengtheses> (accessed 09.10.2021)

19. Ariens R.A.S., Lai T.S., Weisel J.W., Greenberg C.S., Grant P.J. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood* 2002; 100: 743-754. doi: 10.1182/blood.V100.3.743.

20. Weisel J.W., Litvinov R.I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013; 121(10): 1712-1719. doi:10.1182/blood-2012-09-306639

21. Collet J.P., Shuman H., Ledger R.E., Lee S., Weisel J.W. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102, (26): 9133-9137. doi: 10.1073/pnas.0504120102.

22. Ryan E.A., Mockros L.F., Stern A.M., Lorand L. Influence of a natural and a synthetic inhibitor of factor XIIIa on fibrin clot rheology. *Biophys. J* 1999; 77 (5): 2827-2836. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77114-6.

23. Li W., Sigley J., Pieters M., Helms C.C., Nagaswami C., Weisel J.W., Guthold M. Fibrin Fiber Stiffness Is Strongly Affected by Fiber Diameter, but Not by Fibrinogen Glycation. *Biophys. J.* 2016; 110 (6): 1400-1410. doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.021.

24. Hethershaw E.L., Cilia La Corte A.L., Duval C., Ali M., Grant P.J., Ariens R.A., Philippou H. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2014; 12: 197-205. doi: 10.1111/jth.12455.

25. Rijken D.C., Abdul S., Malfliet J.J., Leebeek F.W., Uitte de Willige S. Compaction of fibrin clots reveals the antifibrinolytic effect of factor XIII. *J Thromb Haemost.* 2016; 14 (7): 1453-1461. doi: 10.1111/jth.13354.

26. Collet J.P., Park D., Lesty C., Soria J., Soria C., Montalescot G., Weisel J.W. Influence of fibrin network conformation and fibrin fiber diameter on fibrinolysis speed: dynamic and structural approaches by confocal microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1354-1361. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1354.

27. Mutch N.J., Engel R., de Uitte W.S., Philippou H., Ariens R.A. Polyphosphate modifies the fibrin network and down-regulates fibrinolysis by attenuating binding of tPA and plasminogen to fibrin. *Blood* 2010; 115 (19): 3980-3988. doi: 10.1182/blood-2009-11-254029.

28. Fraser S.R., Booth N.A., Mutch N.J. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood* 2011; 117: 6371-6374. doi: 10.1182/blood-2011-02-333203.

Для цитирования: Матвеева В.Г., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Глушкова Т.В., Антонова Л.В. Влияние способа полимеризации на свойства фибриновых матриц (пилотное исследование *in vitro*). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(4S): 134-145. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4S-134-145

To cite: Matveeva V.G., Senokosova E.A., Khanova M.Yu., Glushkova T.V., Antonova L.V. Influence of the polymerization method on the properties of fibrin matrices. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(4S): 134-145. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4S-134-145