

УДК 616-77:577.11:57.085.23

DOI 10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101

ОЦЕНКА IN VITRO АКТИВНОСТИ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ И ХЕМОАТТРАКТАНТНЫХ МОЛЕКУЛ, ИНКОРПОРИРОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА/ВАЛЕРАТА И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Л.В. Антонова^{1✉}, В.Г. Матвеева¹, Е.А. Великанова¹, М.Ю. Ханова¹,
В.В. Севостьянова¹, А.В. Цепкина¹, Я.Л. Эльгудин², Л.С. Барбараш¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», ул. Сосновый бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ²Harrington Heart and Vascular Institute, University Hospitals Cleveland Medical Center, 11100 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44106, Unites States of America

Основные положения

- Проведенное исследование подтвердило возможность создания функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра.
- Дифференцировочные факторы, инкорпорируемые в состав полимерных каркасов в процессе их изготовления методом двухфазного электроспиннинга, сохраняют свою биологическую активность и способны in vitro улучшать адгезию, жизнеспособность, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток.

Актуальность

Для создания функционально активных биodeградируемых матриксов, способных задавать вектор клеточному отклику в организме, были изготовлены нетканые матриксы с ростовыми факторами и хемоаттрактантными молекулами.

Цель

Изучить в эксперименте с эндотелиальными клетками in vitro активность ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорируемых в состав полимерных матриксов на основе полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона.

Материалы и методы

Нетканые матриксы из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона (PHBV/PCL) с изолированным или сочетанным введением в структуру сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF, основного фактора роста фибробластов bFGF и хемоаттрактантной молекулы SDF-1a были изготовлены методом двухфазного электроспиннинга. С использованием культуры эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 изучены адгезия, жизнеспособность и пролиферация клеток, культивируемых на поверхности матриксов, а также васкулогенез, секреторная активность и клеточный индекс клеток в ответ на диффузию в среду культивирования инкорпорируемых в матриксы веществ.

Результаты

При анализе комплекса показателей доказана сохранность активности VEGF, bFGF и SDF-1a, инкорпорируемых в состав матриксов PHBV/PCL, а также преимущество матриксов, содержащих комплекс ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул (GFmix), в плане сбалансированности своего воздействия на адгезию, пролиферацию, жизнеспособность эндотелиальных клеток и активацию васкулогенеза. Диффузия из матриксов комплекса GFmix в культуральную среду стимулировала секрецию эндотелиоцитами IL-10, и VE-кадгерина, что демонстрирует противовоспалительную активность и хороший клеточный контакт. Низкий уровень секретируемого клетками EA.hy 926 VEGF-A в лунках с матриксами, содержащими VEGF и GFmix, мог отражать феномен обратной связи, когда синтез вещества тормозится на фоне его достаточного присутствия в окружающей среде.

Заключение

Ростовые факторы и хемоаттрактантные молекулы, вводимые в состав нетканых полимерных матриксов методом электроспиннинга, сохраняют свою биологическую активность. Сочетание VEGF, bFGF и SDF-1a в составе одного

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна, e-mail: antonova.la@mail.ru, адрес: 650002, Россия, г. Кемерово, ул. Сосновый бульвар, 6

Corresponding author: Antonova Larisa, e-mail: antonova.la@mail.ru, address: Russian Federation, 650002, Kemerovo, 6, Sosnoviy Blvd.

матрикса синхронизирует эффекты клеточного отклика в отличие от изолированного введения данных веществ в состав матриксов.

Ключевые слова Эндотелиальные клетки • Электроспиннинг • Биodeградируемые полимеры • Ростовые факторы • Хемоаттрактантные молекулы • Биологическая активность

Поступила в редакцию: 20.02.2018; поступила после доработки: 11.03.18; принята к печати: 12.03.18

IN VITRO ACTIVITY OF BIOACTIVE MOLECULES INCORPORATED INTO POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)/POLY(ε-CAPROLACTONE) SCAFFOLDS

L.V. Antonova^{1✉}, V.G. Matveeva¹, E.A. Velikanova¹, M.Y. Khanova¹, V.V. Sevostyanova¹, A.V. Tsepokina¹, Ya.L. Elgudin², L.S. Barbarash¹

¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, ²Harrington Heart and Vascular Institute, University Hospitals Cleveland Medical Center, 11100 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44106, Unites States of America

Highlights

- The present study proved the feasibility of developing functional biodegradable small-diameter vascular grafts.
- The differentiation factors incorporated into polymeric scaffolds during their fabrication by emulsion electrospinning retain their bioactivity and may improve the adhesion, viability, migration and proliferation of endothelial cells in vitro.

Background	We fabricated biodegradable, bioactive scaffolds to guide the differentiation of endothelial progenitor cells.
Aim	To study in vitro activity of the bioactive factors incorporated into the poly (3-hydroxubutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(ε-caprolactone) (PHBV/PCL) scaffolds.
Methods	Nonwoven scaffolds were blended of PHBV and PCL utilizing either separate or combined incorporation of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), and stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α) by emulsion electrospinning. We further studied adhesion, viability, and proliferation of EA.hy 926 endothelial cells cultured on these scaffolds and evaluated vasculogenesis, cell index, and secretory profile in response to the addition of abovementioned bioactive factors.
Results	We showed that VEGF, bFGF, and SDF-1α retain their bioactivity upon the incorporation into the PHBV/PCL scaffolds. Scaffolds with all three bioactive factors incorporated demonstrated superior performance in comparison with those containing any of these factors alone. Diffusion of the bioactive factors into the culture medium stimulated the secretion of interleukin-10, and VE-cadherin by endothelial cells that indicated anti-inflammatory response and tight intercellular junctions. We also detected the low level of secreted VEGF-A from the scaffolds with VEGF suggestive of its physiological regulation.
Conclusion	Bioactive factors retain their bioactivity upon the incorporation into the PHBV/PCL scaffolds. Combination of VEGF, bFGF, and SDF-1a improves cellular response compared to the incorporation of any of these factors alone.
Keywords	Endothelial cells • Electrospinning • Biodegradable polymers • Growth factors • Chemoattractants • Bioactivity

Список сокращений

КИ — клеточный индекс eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота
bFGF — основной фактор роста фибробластов HAT — гипоксантин-аминоптерин-тимидин

IL-10	– интерлейкин 10	VEGF	– сосудистый эндотелиальный фактор роста
PCL	– поликапролактон	VE-	– кадгерин
PHBV	– поли (3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат)	кадгерин	– кадгерин сосудистого эндотелия
SDF-1a	– фактор стромальных клеток 1 альфа		

Введение

Динамика стремительного развития тканевой инженерии демонстрирует новые задачи, связанные с возможностью управления процессами ремоделирования в условиях организма. Если раньше протез любого предназначения устранял в зоне своей локации только анатомический дефект, то сегодня основным требованием к создаваемым конструкциям является их функциональная активность. Этот постулат стал основным вектором и при создании функционально активных сосудистых протезов [1]. Масса публикаций доказывает перспективность данного подхода в случае, если конечной целью является формирование нового сосуда на месте функционально активного имплантированного каркаса [2, 3]. Для придания 3D-конструкциям функциональной активности исследователи используют биологически активные вещества, способные управлять клеточным поведением в условиях организма [4, 5]. Однако составляющая сигнальных импульсов в организме настолько сложна и многообразна, что до сих пор продолжается поиск наиболее сбалансированного подхода к наделению тканеинженерных конструкций функциональными свойствами.

Для разработки функционально активных сосудистых протезов целесообразно использовать вещества, активирующие привлечение и деление клеток, стимулирующих неоангиогенез. Наиболее перспективными в этом направлении являются сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантная молекула (SDF-1a) [6, 7, 8]. Однако при инкорпорировании биологически активных молекул в трубчатые полимерные каркасы, которые, как правило, изготавливаются с использованием органических растворителей, активность биологически активных компонент может снижаться.

Цель исследования - изучить в эксперименте с эндотелиальными клетками *in vitro* активность ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в состав полимерных матриц на основе полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона.

Материалы и методы

Изготовление полимерных матриц

Нетканые матрицы, содержащие одну биологически активную молекулу, изготавливали методом двухфазного электроспиннинга из смеси 5% поли-

гидроксibuтирата/валерата (PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% поликапролактона (PCL, Sigma-Aldrich, США) в хлороформе на установке электроспиннинга Nanon-01A (МЕСС, Япония) при напряжении 23 kV, скорости подачи раствора 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора 150 мм, диаметр намоточного коллектора – 8 мм, игла – 22G. В качестве биологически активных молекул для инкорпорирования в матрицы использовали рекомбинантные ростовые факторы человека: VEGF (Sigma-Aldrich, США) или bFGF (Sigma-Aldrich, США) или рекомбинантную хемоаттрактантную молекулу SDF-1a (Sigma-Aldrich, США), вводя их в полимерный раствор в соотношении 20:1. Конечная концентрация биомолекул составила 500 нг/мл полимерного раствора.

Нетканые матрицы с комбинацией биологически активных молекул (GFmix) изготавливали следующим образом: внутреннюю 1/3 стенки матрикса - из суспензии PHBV/PCL с раствором VEGF, как описано выше. Далее электроспиннинг продолжали с эмульсией (20:1) из раствора PHBV/PCL с bFGF и SDF-1a в равных количествах в PBS. Конечная концентрация каждого вида биомолекул составила 500 нг/мл полимерного раствора.

Немодифицированные нетканые матрицы изготавливали методом электроспиннинга из смеси 5% полигидроксibuтирата/валерата (PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% поликапролактона (PCL, Sigma-Aldrich, США) в хлороформе без введения в растворитель жидкой фазы с ростовыми факторами и хемоаттрактантными молекулами в следующем режиме: напряжение - 23 kV, скорости подачи раствора – 0,5 мл/ч, расстояние до коллектора – 150 мм, игла – 22G, диаметр намоточного коллектора – 8 мм.

Оценка клеточной адгезии и жизнеспособности

Способность матриц PHBV/PCL с ростовыми факторами/ хемоаттрактантными молекулами и без таковых адгезировать на своей поверхности клетки изучали с использованием эндотелиальных клеток линии EA.hy 926. Культура EA.hy 926, представляющая собой гибридому эндотелиальных клеток пупочной вены и карциномы легкого человека, любезно предоставлена Cora-Jean S. Edgell, University of North Carolina, США. Нетканые матрицы диаметром 15 мм закрепляли с помощью 0,6% раствора агарозы (Helicon, США) и фиксировали на дне стерильных 24-луночных культуральных планшет.

В качестве контролей выступали лунки, содержащие немодифицированные нетканые матрицы, и лунки с клетками, культивированными на поверхности культурального пластика. В каждую лунку вносили по $2,0 \times 10^5$ клеток и культивировали в течение 6 суток в полной культуральной среде DMEM/F12 (Sigma, США), содержащей 1% HEPES буфера, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 1% L-глутамина, 100 МЕ пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,1 мг/мл амфотерицина В и гипоксантин, аминоптерин, тимидин (НАТ) (Sigma, США). Культивирование проводили при 37°C и 5% CO₂ в условиях CO₂ – инкубатора MCO-18AIC (Sanyo, Япония) в течение 6 суток со сменой среды на 2 сутки. Абсолютное количество адгезированных и погибших клеток на 1 мм² поверхности оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). С этой целью за 30 мин до микроскопического исследования в среду культивирования добавляли ядерные флуоресцентные красители Dapi (Sigma-Aldrich, США) в количестве 10 мкг/мл (синее свечение ядер всех адгезированных клеток) и Ethidium Bromide (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,03 мг/мл культуральной среды (оранжевое окрашивание ядер погибших клеток). Относительное количество погибших клеток высчитывали по формуле: $\text{абс. кол-во погибших клеток} \times 100\% / \text{абс. кол-во всех адгезированных клеток}$. Относительное количество жизнеспособных клеток высчитывали по формуле: $\text{абс. кол-во жизнеспособных клеток} \times 100\% / \text{абс. кол-во всех адгезированных клеток}$.

Оценка клеточной пролиферации

Оценку пролиферативной активности адгезированных клеток проводили с помощью набора Click-iTTM Plus EdU Alexa FluorTM 488 Imaging Kit (№C10637, Thermo Fisher Scientific Inc, США) согласно инструкции производителя. Анализ основан на включении EdU (5-этинил-2,-дезоксинуридин) в состав ДНК во время активного синтеза и последующей реакцией с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488. Оценка флуоресцентного сигнала проведена на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Ядра клеток, находящихся в стадии активного деления, приобретали зеленое свечение. Культуру докрашивали ядерным красителем Dapi (Sigma-Aldrich, США) в количестве 10 мкг/мл (синее свечение ядер всех адгезированных клеток) для определения общего количества адгезированных к поверхности клеток. Подсчет клеток осуществляли с помощью программы Image J 1.38 software (National Institutes of Health, Bethesda, США) в 10 различных полях зрения при увеличении $\times 200$ с последующим пересчетом на 1 мм² изучаемой поверхности. Исследования прове-

дены на 10 случайно выбранных полях зрения в образцах каждой группы. Относительное количество пролиферирующих клеток высчитывали по формуле: $\text{абс. кол-во пролиферирующих клеток} \times 100\% / \text{абс. кол-во всех адгезированных клеток}$.

Оценка васкулогенеза

Для изучения васкулогенной активности клеток линии EA.hy 926 в присутствии ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, выбранных для включения в состав полимерных матриц, клетки вносили в количестве 2×10^4 в лунку, содержащую 200 мкл Matrigel (№356234, Corning, США). Сверху добавляли 800 мкл базальной культуральной среды DMEM/F12, содержащей VEGF (Sigma-Aldrich, США) или bFGF (Sigma-Aldrich, США), или рекомбинантную хемоаттрактантную молекулу SDF-1 α человека (Sigma-Aldrich, США), или их сочетание: концентрация каждой компоненты составила 100 нг/мл. В контрольную лунку после внесения Матригеля и клеток добавляли базальную культуральную среду DMEM/F12, не содержащую эмбриональную телячью сыворотку и ростовые факторы с хемоаттрактантными молекулами. Оценку формирования клетками капилляроподобных 3D-структур проводили через 18 часов культивирования. Для визуализации результатов методом световой микроскопии использовали инвертированный микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка изменения клеточного индекса в ответ на диффузию ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные нетканые матрицы

Эксперимент проводили на клеточном анализаторе RTCA xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США), предназначенном для исследования клеточного поведения в режиме реального времени до, в момент и после оказания на клетки любого воздействия. Принцип определения совокупности таких параметров, как клеточная адгезия и морфология, которая косвенно отражает состояние клеточной жизнеспособности и пролиферации, основан на непрерывном измерении электрического сопротивления в образце, находящемся на поверхности электрода, который встроен в реакционный модуль прибора. Мониторинг сопротивления на сенсорной поверхности проводится с помощью рабочей станции RTCA DP Station и управляющего компьютера. Все этапы исследования полностью автоматизированы.

Клетки линии EA.hy 926 высевали в лунки планшета (E-Plate 16, №05469830001, ACEA Biosciences, США) для анализатора xCELLigence в количестве 2×10^4 клеток в лунку. Во вставки для планшетов (E-Plate Insert 16, №05465382001, ACEA Biosciences,

США) помещали образцы полимерных матрицков. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в лунках с пустыми вставками. Две лунки заполняли культуральной средой при отсутствии клеток и использовали как базовый уровень сопротивления культуральной среды. Это значение в дальнейшем вычиталось из значений, полученных в опытных и контрольных образцах. Изменение клеточного импеданса на микроэлектродах выражалось величиной клеточного индекса (КИ), который автоматически вычислялся программой как $(R_n - R_b)/t$, где R_b – исходное значение импеданса в лунке, содержащей только культуральную среду без клеток, R_n – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей тестируемые клетки. Считывание КИ производилось прибором автоматически, общее время эксперимента составило 72 часа.

Оценка секреторной активности клеток

Перед выводом всех образцов из эксперимента, проводимого на клеточном анализаторе, из каждой лунки забирали среду культивирования для последующего определения секреторной активности клеток. Ферменты, ростовые факторы, противовоспалительные цитокины и молекулы клеточной адгезии определяли методом иммуноферментного анализа наборами eNOS Human (DEN00, R&D Systems), VEGF-A Human (BMS277/2, Ebioscience), Human IL10 Platinum ELISA (BMS215/2, Ebioscience), VECadherin Human (BMS253, Ebioscience). Пробоподготовку проводили согласно протоколам фирм производителей. Считывание результатов осуществляли на анализаторе «Униплан» (ЗАО Пикон, Россия).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0». Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Данные, имеющие распределение, отличное от нормального, представлены в виде медианы (Me) и 25 и 75% перцентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни, при условии малой выборки - с поправкой Бонферрони. При сравнении трех и более независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

При изучении результатов культивирования клеток линии EA.hy 926 на матриксах с изолированно или совместно инкорпорированными ростовыми факторами и хемоаттрактантами молекулами были оценены следующие показатели: количество

клеток, адгезированных к поверхности матрицков после 6 суток культивирования в перерасчете на 1 мм² поверхности; процент живых, мертвых и пролиферирующих клеток в перерасчете на 1 мм². В качестве групп сравнения были использованы немодифицированные полимерные матриксы на основе PHBV/PCL, а также культуральный пластик, являющийся золотым стандартом поверхности для культивирования адгезионных клеточных культур. При получении результатов культивирования клеток на поверхности культурального пластика и немодифицированного матрикса PHBV/PCL оценивали те же показатели, что и в опытных группах.

При изучении клеточной адгезии выявлено, что введение в состав нетканых матрицков PHBV/PCL сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF и хемоаттрактантной молекулы SDF-1a, а также комплекса VEGF/bFGF/SDF-1a (GF mix) способствовало увеличению клеточной адгезии EA.hy 926 к поверхности данных матрицков в 3,78 ($p < 0,05$), 3,02 ($p < 0,01$) и 4,08 раза ($p < 0,01$), соответственно, в сравнении с немодифицированными образцами (Рис. 1, а). Однако изолированное введение в состав матрицков основного фактора роста фибробластов bFGF не улучшило адгезии эндотелиоцитов на поверхности данных матрицков: абсолютное количество клеток достоверно не отличалось от такового на немодифицированных полимерных матриксах (Рис. 1, а). Следует отметить, что по абсолютному количеству клеток, адгезированных на 1 мм² поверхности, матриксы с VEGF, SDF-1a и GF mix достоверно не отличались между собой, хотя абсолютное количество клеток EA.hy 926 на матриксах GF mix оказалось максимальным (Рис. 1, а).

При сравнении адгезивности поверхности матрикса с комплексом ростовых факторов с поверхностью культурального пластика выявлено, что на культуральном пластике абсолютное количество клеток уже через 4 суток культивирования в 1,2 раза превысило количество клеток на поверхности матрикса GF mix с 6-суточным культивированием ($p < 0,05$), и в 4,82 раза превысило количество эндотелиоцитов, адгезированных через 6 суток к поверхности немодифицированного PHBV/PCL матрикса ($p < 0,001$) (Рис. 2, а).

Наибольшее относительное количество жизнеспособных клеток среди адгезированных на полимерных модифицированных и немодифицированных матриксах обнаружено на поверхности GF mix (Рис. 1, б). Относительное число жизнеспособных клеток на матриксах VEGF и SDF-1a достоверно не отличалось от такового на матриксах GF mix ($p > 0,05$). Однако наименьшее количество живых клеток среди трех вышеперечисленных матрицков оказалось на матриксах SDF-1a (Рис. 1, б). На матриксах bFGF на долю жизнеспособных адгезированных клеток пришлось 74,561 (45,509; 82,979)%,

что достоверно не отличалось от аналогичного показателя на немодифицированных матриксах (Рис. 1, б).

Жизнеспособность клеток линии EA.hy 926 на поверхности культурального пластика была самой высокой и стремилась к 100% (Рис. 2, б), превысив в 1,28 раза относительное число жизнеспособных клеток на поверхности немодифицированных матриксов PHBV/PCL ($p<0,05$). Доля живых клеток на матриксах GF mix, VEGF, SDF-1a достоверно не отличалась от данного показателя на культуральном пластике (Рис. 2, б), что свидетельствовало о комфортности пребывания клеток на модифицированных поверхностях.

Относительное количество нежизнеспособных клеток пропорционально снижалось при увеличении доли жизнеспособных. Максимальное число мертвых клеток выявлено на поверхности немодифицированных матриксов, составив 23,5 (15,0; 30,34) % (Рис. 1, в; 2, в) и было более чем в 2 раза выше, чем на матриксах VEGF и SDF-1a ($p<0,05$), и в 4 раза выше, чем на матриксах GF mix ($p<0,01$). При этом, процент мертвых клеток на GF mix был самым минимальным и не отличался от данного

показателя от культурального пластика (Рис. 2, в). В сравнении с немодифицированным матриксом доля нежизнеспособных клеток на культуральном пластике была в 17 раз ниже ($p<0,001$). Относительное количество мертвых клеток на поверхности матриксов bFGF достоверно не отличалось от такового на немодифицированных каркасах (Рис. 1, в).

Клеточная пролиферация – показатель, отражающий сохранение клеткой ее функциональных свойств, в том числе способности к делению. Максимальной пролиферативной активностью обладали клетки, культивируемые на поверхности культурального пластика и матриксах GF mix: более 40% клеток на 1 мм² пребывали на различных стадиях пролиферации (Рис. 1, г; Рис. 2, г; Рис. 3). На немодифицированных матриксах и матриксах с VEGF, SDF-1a и bFGF от 30% до 40% клеток демонстрировали пролиферативную активность. Несмотря на то, что достоверной разницы в уровне пролиферации клеток, культивируемых на различных поверхностях, выявить не удалось (Рис. 1 г; 2 г), стоит отметить, что сохранение пролиферативного потенциала в условиях конfluence клеточного

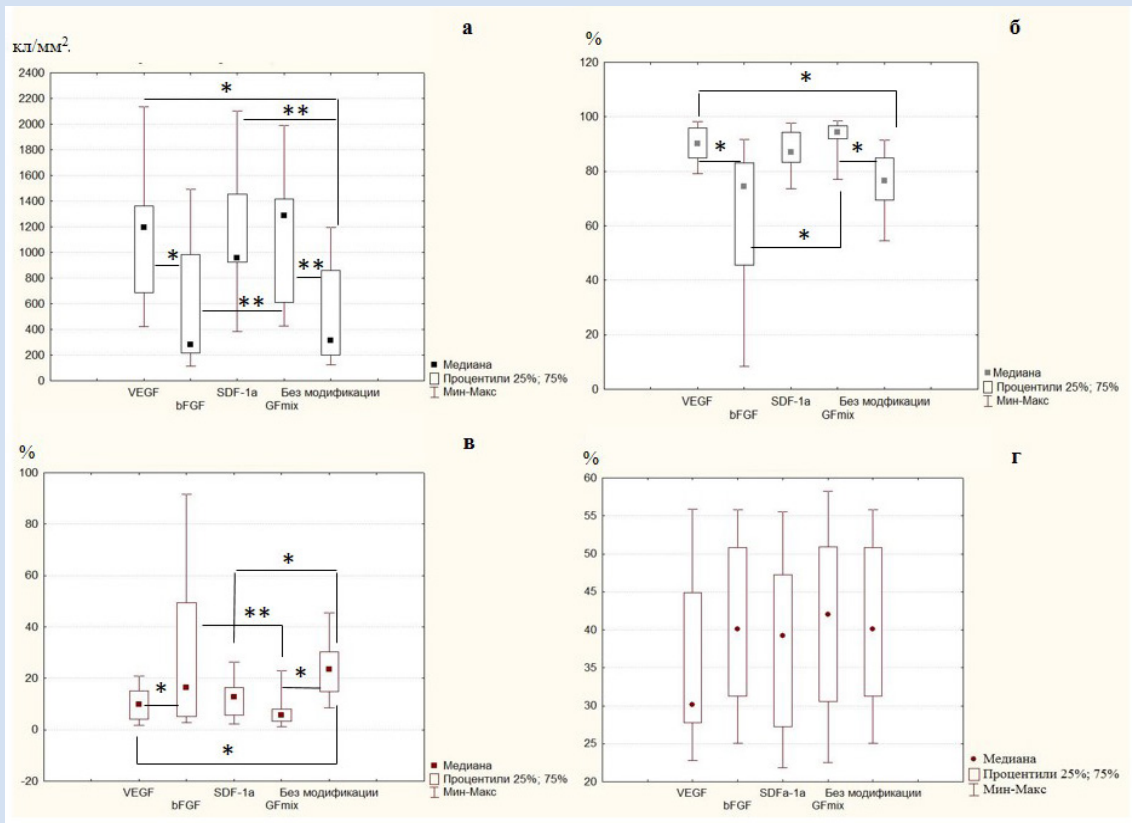


Рисунок 1. Результаты адгезии, жизнеспособности и пролиферации клеток линии EA.hy 926 на матриксах PHBV/PCL без модификации и с различными вариантами инкорпорирования ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул

Figure 1. Adhesion, viability, and proliferation of EA.hy 926 cells cultured on the polymer scaffolds PHBV/PCL with or without incorporated bioactive factors

Примечания: а – абсолютное количество адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; б – относительное количество жизнеспособных адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; в – относительное количество мертвых адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; г – относительное количество пролиферирующих адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$.

Note: a – total cell number per 1 mm² surface; b – percent of viable cells per 1 mm² surface; c – percent of dead cells per 1 mm² surface; d – percent of proliferating cells per 1 mm² surface; * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$.

слоя, что имело место на культуральном пластике и матриксах с высокой степенью клеточной адгезии (GF mix, VEGF, SDF-1a), показатель, демонстрирующий сохранность более выраженного пролиферативного потенциала и клеточного функционала, чем на матриксах с небольшим количеством клеток на поверхности (Рис. 3). Также известно, что достижение клетками конfluence тормозит клеточное деление в силу отсутствия свободной площади для деления и прикрепления. Однако этот постулат касается гладких поверхностей. Нетканые полимерные матриксы, обладающие высокопористой поверхностью, позволили клеткам сохранить свой пролиферативный потенциал вследствие возможности их миграции в более глубокие слои матриксов в процессе увеличения своей популяции (Рис. 3).

Формирование капиллярноподобных 3D-структур из эндотелиальных клеток было более выраженным в лунках с добавлением GF mix и VEGF, однако самый полноценный васкулогенез выявлен при добавлении в среду культивирования комплекса GFmix: 3D-структуры были более плотными, клетки выстраивались в несколько слоев и обра-

зовывали замкнутые сети (Рис. 4). Клетки линии EA.hy 926 в присутствии bFGF и SDF-1a менее интенсивно формировали капиллярноподобные структуры, и через 18 часов культивирования сформированные 3D-структуры были идентичны таковым в контроле, однако не образовывали замкнутых сетей, как в присутствии VEGF и GFmix (Рис. 4).

Клеточный индекс (КИ) – расчётный показатель, косвенно отражающий совокупность скорости пролиферации и жизнеспособность клеток, адгезированных на дне лунки. Вещества, инкорпорированные в состав полимерных матриксов, помещенных во вставку с порами, предположительно, способны диффундировать в культуральную среду и оказывать влияние на рост клеток и их функционал. В процессе эксперимента выявлено, что диффузия VEGF, SDF-1a и GFmix из нетканых матриксов PHBV/PCL, помещенных во вставки, в среду культивирования привела к увеличению КИ клеток EA.hy 926 в 1,3 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$), тогда как между собой КИ в вышеуказанных опытных лунках достоверно не отличались (Рис. 5, а). Клеточный индекс в лунках с PHBV/PCL/bFGF был в 1,2 раза ниже, чем в контроле ($p < 0,01$),

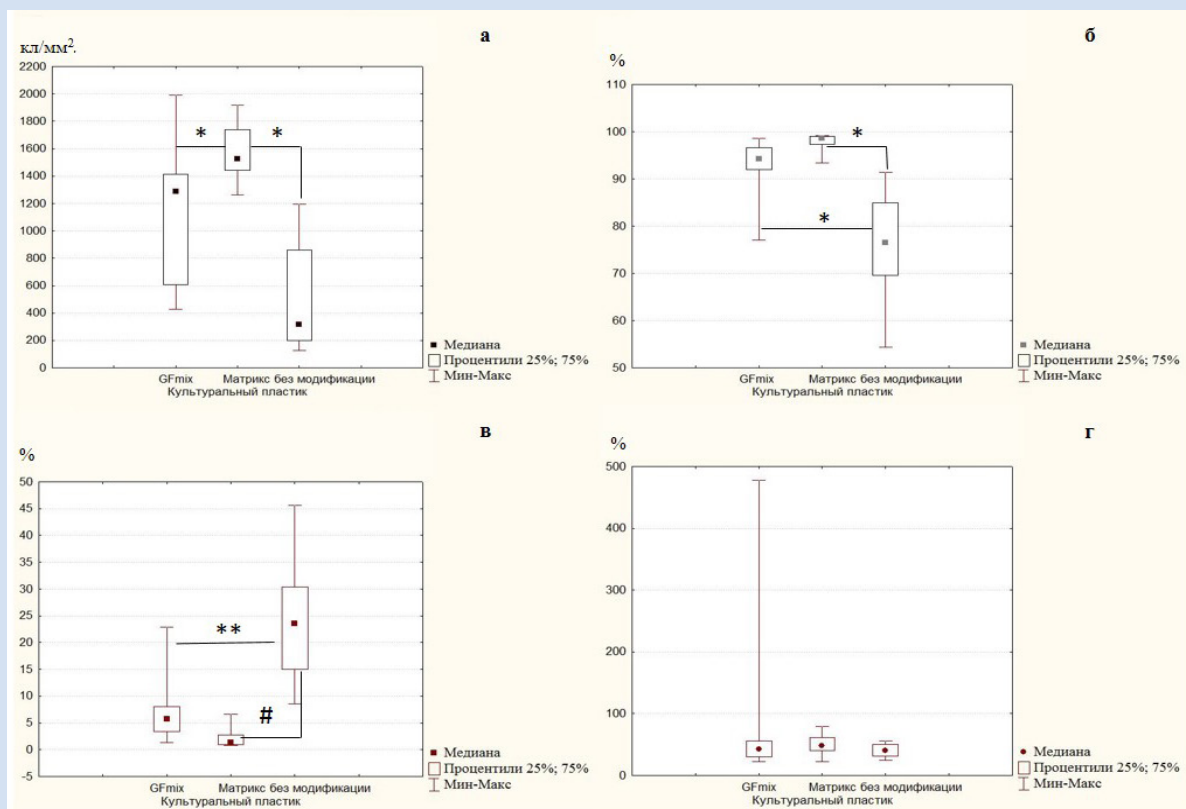


Рисунок 2. Результаты адгезии, жизнеспособности и пролиферации клеток линии EA.hy 926 на матриксах PHBV/PCL, немодифицированных и модифицированных тремя биоактивными молекулами (GF mix), в сравнении с культуральным пластиком

Figure 2. Adhesion, viability, and proliferation of EA.hy 926 cells cultured on the plastic dishes or on the polymer scaffolds PHBV/PCL with all three bioactive factors (GF mix) incorporated or without the bioactive factors

Примечания: а – абсолютное количество адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; б – относительное количество жизнеспособных адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; в – относительное количество мертвых адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; г – относительное количество пролиферирующих адгезированных клеток на 1 мм² поверхности; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; # – $p < 0,001$.

Note: а – total cell number per 1 mm² surface; б – percent of viable cells per 1 mm² surface; в – percent of dead cells per 1 mm² surface; г – percent of proliferating cells per 1 mm² surface; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; # – $p < 0.001$.

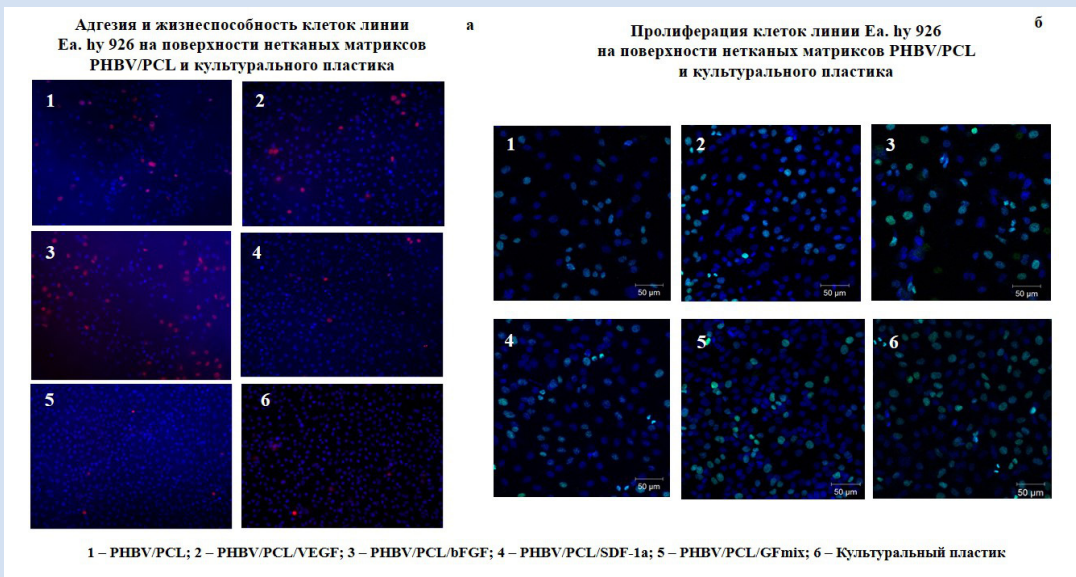


Рисунок 3. Микроскопическая картина адгезии, жизнеспособности и пролиферации клеток линии EA.hy 926, культивируемых на поверхности модифицированных, немодифицированных матриксов PNBV/PCL и культурального пластика

Figure 3. Fluorescence microscopy of EA. hy 926 cells cultured on the plastic dishes or on the polymer scaffolds with all three bioactive factors incorporated or without the bioactive factors

Примечания: а – флуоресцентная микроскопия с предварительной окраской клеток ядерными красителями DAPI (синее свечение – ядра всех адгезированных клеток) и этидиумом бромидом (красное свечение – ядра нежизнеспособных клеток); б – конфокальная лазерная микроскопия с предварительной окраской клеток Alexa Fluor 488 (зеленое свечение – ядра пролиферирующих клеток) и дополнительная окраска клеток ядерным красителем DAPI (синее свечение – ядра всех адгезированных клеток). Ув. x 200.

Note: а – 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (blue, viable cells) combined with ethidium bromide (red, dead cells); б – Alexa Fluor 488 (green, proliferating cells) combined with DAPI staining (blue, viable cells), x200 magnification.

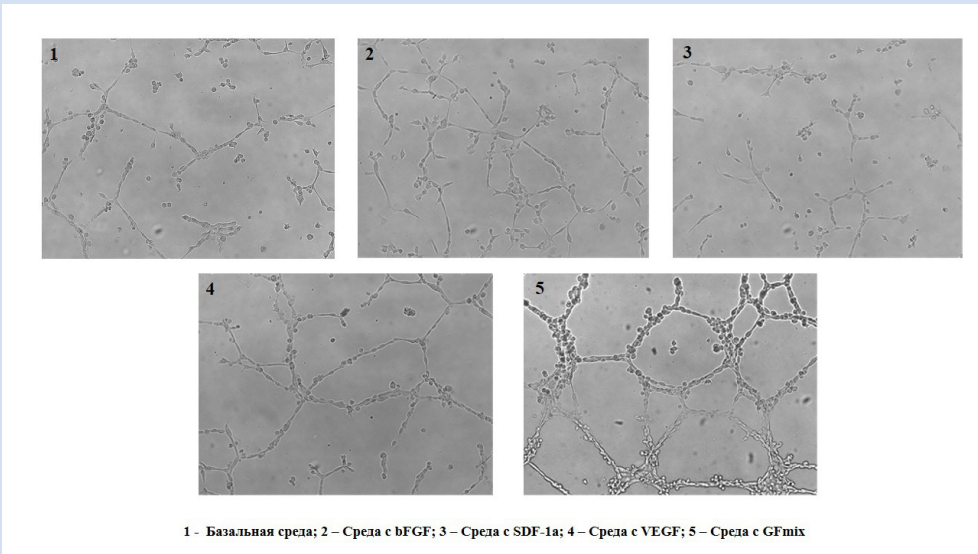


Рисунок 4. Формирование капилляроподобных 3D-структур эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 в Матригеле в присутствии ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул. Ув. x 100

Figure 4. Formation of the capillary-like structures by the EA.hy 926 cells in Matrigel upon the addition of the bioactive factors. x100 magnification

в 1,7 раза ниже, чем в лунках с PNBV/PCL/VEGF, и в 1,6 раза ниже, чем в PNBV/PCL/SDF-1a и PNBV/PCL/GFmix ($p < 0,001$).

Для оценки секреторной активности эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 в ответ на диффузию ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул из нетканых матриксов PNBV/PCL посредством иммуноферментного анализа в среде культивирования клеток изучено количество eNOS,

VEGF-A, IL-10 и VE-кадгерина (Рис. 5, б-д).

Секреция VEGF-A клетками была самой интенсивной в присутствии матриксов с SDF-1a и bFGF (Рис. 5, б), где уровень VEGF-A в среде культивирования клеток был в 2,2 раза выше контроля и в 1,7 раза выше, чем при культивировании клеток в присутствии матриксов с GFmix, ($p < 0,05$). Концентрации VEGF-A в контроле, VEGF и GFmix не отличались между собой (Рис. 5, б).

Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) активнее всего вырабатывалась клетками в присутствии матриксов с SDF-1a (Рис. 5, в), превысив в 1,3 раза значения eNOS в контроле и в присутствии матриксов с VEGF и GFmix, и в 1,4 раза – в опытных лунках с матриксами с bFGF, ($p<0,05$). Достоверной разницы в концентрации eNOS в контроле и лунках с PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/GFmix выявить не удалось (Рис. 5, в).

Максимальные концентрации IL-10 выявлены в лунках с матриксами GFmix, однако они достоверно не отличались от значений IL-10 в контроле и в опытных лунках с матриксами, содержащими VEGF (Рис. 5, г). В сравнении с опытными лунками с PNBV/PCL/bFGF и PNBV/PCL/SDF-1a количество IL-10 в лунках с PNBV/PCL/GFmix оказалось в 1,5 раза больше, ($p<0,05$).

Самые высокие значения VE-кадгерина выявлены в среде с клетками, культивируемыми в присутствии нетканого матрикса с GFmix, что оказалось в 1,7 раза больше, чем в контроле, и в 2 раза больше, чем в лунках с PNBV/PCL/bFGF ($p<0,05$). Достоверной разницы с другими опытными лунками не зафиксировано (Рис. 5, д).

Обсуждение

Под воздействием факторов роста и цитокинов происходит активация и пролиферации эндотелиоцитов. Рост сосудов регулируют ростовые факторы VEGF, bFGF и другие. VEGF считается специфическим митогеном для эндотелиальных клеток, так как избирательно стимулирует пролиферацию эндотелия. В ответ на стимулы VEGF происходят

изменения в цитоскелете эндотелиальных клеток [9, 10]. bFGF, помимо митогенного воздействия на эндотелиальные клетки, может стимулировать аутокринную продукцию VEGF, что вносит дополнительный вклад в стимуляцию ангиогенного потенциала эндотелиоцитов [11, 12]. Рядом авторов было доказано, что ростовые факторы VEGF и bFGF оказывают однонаправленное проангиогенное стимулирующее действие на эндотелиальные клетки человека линии EA.hy 926 и являются мощными индукторами пролиферативной активности данных клеток [13, 14].

При культивировании клеток линии EA.hy 926 на поверхности нетканых PNBV/PCL-матриксов с bFGF мы не увидели влияния bFGF на клеточную адгезию и пролиферацию, однако вклад bFGF в формирование капилляроподобных структур клетками в Матригеле был более выраженным, чем в присутствии SDF-1a, и намечалось формирование сети. Также обращало себя внимание укрупнение размеров клеток. Схожие результаты были получены отечественными и зарубежными авторами, которые также доказали эффект bFGF на васкулогенез при отсутствии влияния данного ростового фактора на пролиферацию эндотелиальных клеток [15, 16].

Стромальный фактор SDF-1a является хемоаттрактантной молекулой и играет важную роль в ангиогенезе посредством привлечения эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга, а также участвует в пролиферации эндотелиальных клеток и препятствует их апоптозу [17, 18]. По результатам проведенных исследований клетки линии EA.hy 926, культивированные на матриксах с

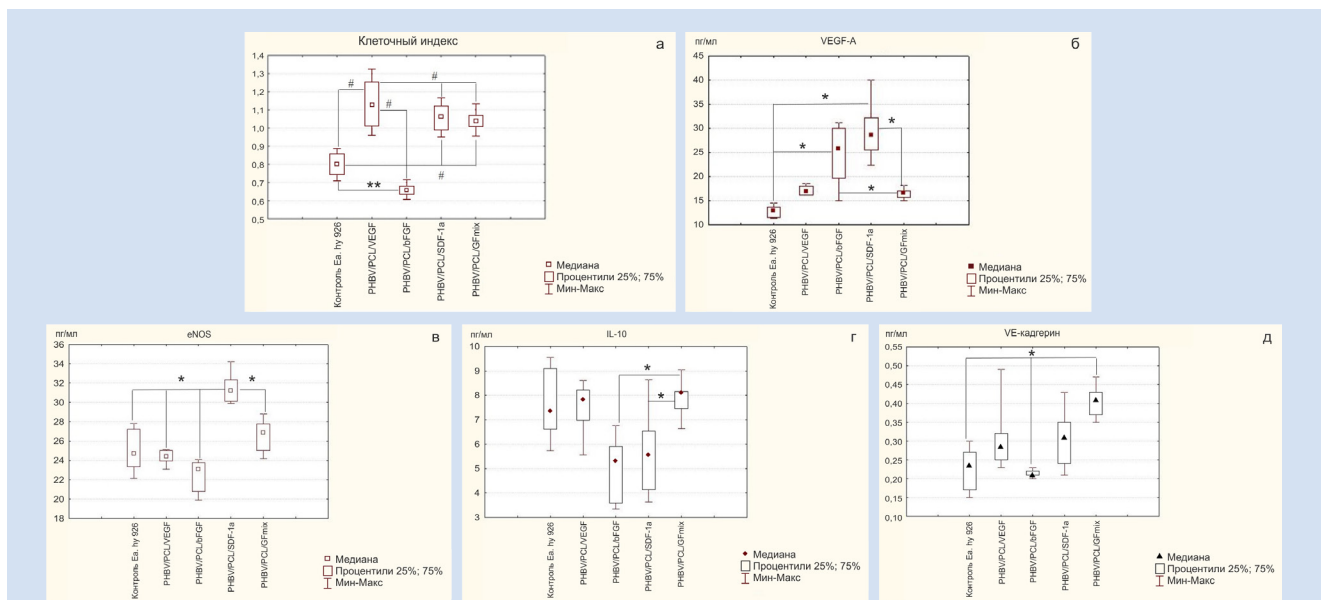


Рисунок 5. Клеточный индекс и секреторная активность клеток линии EA. hy 926 через 72 часа культивирования в присутствии нетканых матриксов с инкорпорированными ростовыми факторами и хемоаттрактантными молекулами
Figure 5. Cell index and secretory profile of EA.hy 926 cells after 72 hours of culture on the polymer scaffolds with incorporated bioactive factors

Примечания: а – Клеточный индекс; б – VEGF-A; в – eNOS; г – IL-10; д – VE-кадгерин; * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; # – $p<0,001$.

Note: a – cell index; b – vascular endothelial growth factor A (VEGF-A); c – endothelial nitric oxide synthase (eNOS); d – interleukin-10 (IL-10); e – vascular endothelial cadherin (VE-cadherin); * – $p<0.05$; ** – $p<0.01$; # – $p<0.001$.

SDF-1a, демонстрировали высокий уровень адгезии и пролиферации, но SDF-1a никак не повысил васкулогенную активность эндотелиальных клеток в Матригеле.

В ходе своей жизнедеятельности эндотелиальные клетки секретируют большое количества биологически активных веществ, выраженность секреции которых напрямую зависит от клеточного микроокружения.

Стимулирование экспрессии эндотелиальными клетками VEGF-A способствует дифференцировке и пролиферации эндотелия, активации синтеза ими оксида азота, усиливает ангиогенный потенциал эндотелиальных клеток и поддерживает цитоархитектонику сосудистой стенки [19]. Также известно, что вазодилатация возможна только за счет действия VEGF-A, который способствует удлинению эндотелиальных клеток [20]. В содружестве с bFGF в кровяных островках эмбриона VEGF-A стимулирует образование рецепторов к VEGF2 на гемангиообластах [21].

Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) постоянно синтезируется эндотелиальными клетками, стимулирует их пролиферацию, защищает от апоптоза и ишемии через выработку оксида азота, генерируя его в реакции, превращающие L-аргинин в L-цитруллин, выполняющий роль вазодилататора [22]. В свою очередь, выработка eNOS может активироваться сосудистым эндотелиальным фактором роста. Так, после стимуляции эндотелиоцитов VEGF происходит реорганизация актиновых филаментов цитоскелета в плотные стресс-волокна, что вызывает сокращение клеток и повышает эндотелиальную проницаемость [9].

Сосудистый эндотелиальный кадгерин (VE-кадгерин) является основным трансмембранным белком адгезионных контактов, способствует устойчивости барьера из эндотелиальных клеток и не экспрессируется ни в каком другом типе клеток, кроме эндотелиальных [23]. Помимо этой функции, VE-кадгерин участвует в регуляции клеточного цикла, контактного торможения пролиферации, клеточной гибели и процессах ангиогенеза. Оксид азота, полученный через eNOS, регулирует деятельность эндотелиального барьера через VE-кадгерин. Отсутствие eNOS уменьшает VEGF-индуцированную проницаемость эндотелия и снижает VEGF-индуцированный VE-кадгерин [10].

Эндотелиальные клетки являются важным источником цитокинов, в том числе IL-10, который способен в низких и средних концентрациях стимулировать формирование капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками человека линии EA.hy 926 [16].

В проведенных экспериментах диффузия комплекса GFmix в среду культивирования эндоте-

лиальных клеток улучшала жизнеспособность и пролиферацию эндотелиоцитов, стимулировала их противовоспалительную активность и усиление адгезивных контактов между собой. Низкий уровень секретлируемого клетками EA.hy 926 VEGF-A в лунках с матриксами, содержащими VEGF и GFmix, может отражать феномен обратной связи, когда синтез вещества тормозится на фоне его достаточного присутствия в окружающей среде. Напротив, в присутствии матриксов с инкорпорированными bFGF и SDF-1a эндотелиальные клетки секретировали достоверно большее количество VEGF-A. Максимальная секреция эндотелиальными клетками eNOS и VEGF-A в присутствии матриксов с bFGF и SDF-1a, предположительно, обусловлена активацией выработки оксида азота эндотелиальной NO-синтазой, что стимулировало клеточную пролиферацию и выработку собственного VEGF-A.

Заключение

Таким образом, ростовые факторы и хемоаттрактантные молекулы, вводимые в состав нетканых полимерных матриксов методом электро-спиннинга, сохраняют свою биологическую активность. При анализе комплекса показателей выявлено значимое преимущество матриксов, содержащих комплекс ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул GFmix в плане сбалансированности своего воздействия на адгезию, пролиферацию, жизнеспособность и секреторную активность эндотелиальных клеток, а также стимуляцию эндотелиоцитами васкулогенеза.

Конфликт интересов

Л.В. Антонова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Ханова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.В. Севостьянова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Цепочкина заявляет об отсутствии конфликта интересов. Я.Л. Эльгудин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.С. Барбараш заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Информация об авторах

Антонова Лариса Валерьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Севостьянова Виктория Владимировна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Цепочкина Анна Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Эльгудин Яков Львович, доктор медицинских наук, профессор факультета хирургии Университета Кейс Вестерн Резерв, заведующий отделением кардио-торакальной хирургии Кливлендского медицинского центра для ветеранов, Кливленд, США.

Барбараш Леонид Семенович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация.

Information about authors

Antonova Larisa V., PhD, the Head of the Laboratory of Cell Technologies, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Matveeva Vera G., PhD, senior researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Velikanova Elena A., PhD, researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Khanova Maryam J., research assistant at the Laboratory of Cell Technologies, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Sevostyanova Viktoria V., PhD, researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Tsepokina Anna V., research assistant at the Laboratory of Genomic Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Elgudin Yakov L., MD, PhD, Assistant Professor, Surgery, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, United States of America; Chief, Division of Cardiothoracic Surgery Louis Stokes Cleveland VA Medical Center Cleveland, Ohio, United States of America.

Barbarash Leonid S., PhD, Professor, Academician of the RAS, chief researcher, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation.

Вклад авторов в статью

АЛВ – проведение культуральных работ, анализ результатов, написание статьи

МВГ – проведение культуральных работ, проведение анализа по оценке васкулогенной активности клеток

ВЕА – проведение анализов по оценке клеточной пролиферации и изменения клеточного индекса

ХМЮ – проведение анализа по оценке адгезии и жизнеспособности клеток

СВВ – изготовление сосудистых графтов

ЦАВ – проведение анализа по оценке секреторной активности клеток

Authors contribution

ALV – culture assays, interpretation of the results, manuscript writing, overall project management

MVG – culture assays, estimation of the vasculogenic activity of cells

VEA – analysis of cell proliferation and cell index changes

KhMYu – analysis of cell adhesion and cell viability

SVV – fabrication of vascular grafts

TsAV – analysis of the secretory activity of cells

ЭЯЛ – анализ полученных данных, написание статьи

БЛС – анализ полученных данных, написание статьи

EYaL – analysis of the obtained data, interpretation of the results, manuscript writing

BLS – interpretation of the results, manuscript writing

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palumbo V.D., Bruno A., Tomasello G., Damiano G., Lo Monte A.I. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int J Artif Organs*. 2014; 37(7): 503-12. doi: 10.5301/ijao.5000343.
2. De Valence S., Tille J., Mugnai D., Mrowczynski W., Gurny R., Möller M. et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*. 2012; 33(1): 38-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.024.
3. Talacua H., Smits A.I., Muylaert D.E., van Rijswijk J.W., Vink A., Verhaar M.C. et al. In Situ Tissue Engineering of Functional Small-Diameter Blood Vessels by Host Circulating Cells Only. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(19-20): 2583-94. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0066.
4. Yu J., Wang A., Tang Z., Henry J., Li-Ping Lee B., Zhu Y. et al. The effect of stromal cell-derived factor-1 α /heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration. *Biomaterials*. 2012; 33(32): 8062-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.042.
5. Zheng W., Wang Z., Song L., Zhao Q., Zhang J., Li D. et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials*. 2012; 33(10): 2880-91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.047.
6. Misteli H., Wolff T., Füglistaler P., Gianni-Barrera R., Gürke L., Heberer M., Banfi A. High-throughput flow cytometry purification of transduced progenitors expressing defined levels of vascular endothelial growth factor induces controlled angiogenesis in vivo. *Stem Cells*. 2010; 11(28): 611-619. doi: 10.1002/stem.291.
7. Yang X., Liaw L., Prudovsky I., Brooks P.C., Vary C., Oxburg L. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep*. 2015; 17: 509. doi:10.1007/s11883-015-0509-6.
8. Ho T. K., Shiwen X., Abraham D., Tsui J., Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiology Research and Practice*. 2012; 2012: 143209. doi: 10.1155/2012/143209.
9. Tran J., Magenau A., Rodriguez M., Rentero C., Royo T., Enrich C. et al. Activation of endothelial nitric oxide (eNOS) occurs through different membrane domains in endothelial cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): e0151556. doi: 10.1371/journal.pone.0151556.
10. Di Lorenzo A., Lin M.I., Murata T., Landskroner-Eiger S., Schleicher M., Kothiya M. et al. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J. Cell Sci*. 2014; 126: 5541-5552. doi: 10.1242/jcs.153601.
11. Murakami M., Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Current Opinion Hematol*. 2008; 15: 215-220. doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97d98.
12. Esser J.S., Rahner S., Deckler M., Bode C., Patterson C., Moser M. Fibroblast growth factor signaling pathway in endothelial cells is activated by BMPER to promote angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: 358-367. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304345.
13. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии Ea. hy 926 и ее модуляция. *Цитология*. 2005; 47 (5): 389-399.
14. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Модификация метода образования капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками человека линии Ea. hy 926. *Медицинская иммунология*. 2006; 8(2-3): 414.
15. Liu F., Li G., Deng L., Kuang B., Li X. The roles of FGF10 in vasculogenesis and angiogenesis. *Biomedical Research*. 2017; 28(3): 1329-1332.
16. Sokolov D.I., Lvova T.Yu., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Sheveleva A.R., Stepanova O.I. et al. Effect of cytokines on the formation tube-like structures by endothelial cells in the presence of trophoblast cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2017; 1: 148-158. doi: 10.1007/s10517-017-3756-4.
17. Zheng H., Fu G., Dai T., Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007; 50(3): 274-280. doi: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f.
18. Neuhaus T., Stier S., Totzke G., Gruenewald E., Fronhoffs S., Sachinidis A., Vetter H., Ko Y.D. Stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif*. 2003; 36 (2): 75-86.
19. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Бельх Е.Г., Яруллина А.И. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобластомах головного мозга. *Вопросы онкологии*. 2017; 63 (1): 19-27.
20. Helmlinger J.M., Li Z., Lathia J.D. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010; 102: 789-795. doi: 10.1038/sj.bjc.6605551
21. Boulanger C.M. Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36: e26-e31. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.306940
22. Ngu H., Feng Y., Lu L., Oswald S.J., Longmore G.D., Yin F.C. Effect of focal adhesion proteins on endothelial cell adhesion, motility and orientation response to cyclic strain. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38(1): 208-222. doi: 10.1007/s10439-009-9826-7
23. Bazzoni G., Dejana E. Endothelial cell-to-cell junction: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004; 84(3): 869-901. doi: 10.1152/physrev.00035.2003.

REFERENCES

1. Palumbo V.D., Bruno A., Tomasello G., Damiano G., Lo Monte A.I. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int J Artif Organs*. 2014; 37(7): 503-12. doi: 10.5301/ijao.5000343.
2. De Valence S., Tille J., Mugnai D., Mrowczynski W., Gurny R., Möller M. et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*. 2012; 33(1): 38-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.024.
3. Talacua H., Smits A.I., Muylaert D.E., van Rijswijk J.W., Vink A., Verhaar M.C. et al. In Situ Tissue Engineering of Functional Small-Diameter Blood Vessels by Host Circulating Cells Only. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(19-20): 2583-94. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0066.
4. Yu J., Wang A., Tang Z., Henry J., Li-Ping Lee B., Zhu Y. et al. The effect of stromal cell-derived factor-1 α /heparin coating of biodegradable vascular grafts on the recruitment of both endothelial and smooth muscle progenitor cells for accelerated regeneration. *Biomaterials*. 2012; 33(32): 8062-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.042.
5. Zheng W., Wang Z., Song L., Zhao Q., Zhang J., Li D. et al. Endothelialization and patency of RGD-functionalized

- vascular grafts in a rabbit carotid artery model. *Biomaterials*. 2012; 33(10): 2880-91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.047.
6. Misteli H., Wolff T., Füglistaler P., Gianni-Barrera R., Gürke L., Heberer M., Banfi A. High-throughput flow cytometry purification of transduced progenitors expressing defined levels of vascular endothelial growth factor induces controlled angiogenesis in vivo. *Stem Cells*. 2010; 11(28): 611-619. doi: 10.1002/stem.291.
 7. Yang X., Liaw L., Prudovsky I., Brooks P.C., Vary C., Oxburg L. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep*. 2015; 17: 509. doi: 10.1007/s11883-015-0509-6.
 8. Ho T. K., Shiwen X., Abraham D., Tsui J., Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiology Research and Practice*. 2012; 2012: 143209. doi: 10.1155/2012/143209.
 9. Tran J., Magenau A., Rodriguez M., Rentero C., Royo T., Enrich C. et al. Activation of endothelial nitric oxide (eNOS) occurs through different membrane domains in endothelial cells. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): e0151556. doi: 10.1371/journal.pone.0151556.
 10. Di Lorenzo A., Lin M.I., Murata T., Landskroner-Eiger S., Schleicher M., Kothiya M. et al. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J. Cell Sci*. 2014; 126: 5541-5552. doi: 10.1242/jcs.153601.
 11. Murakami M., Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Current Opinion Hematol*. 2008; 15: 215-220. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282f97d98.
 12. Esser J.S., Rahner S., Deckler M., Bode C., Patterson C., Moser M. Fibroblast growth factor signaling pathway in endothelial cells is activated by BMPER to promote angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: 358-367. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304345.
 13. Amchislavskii E.I., Sokolov D.I., Sel'kov S.A., Freidlin I.S. Proliferativnaya aktivnost' endotelial'nykh kletok cheloveka linii Ea. hy 926 i ee modulyatsiya. *Tsitologiya* 2005; 47 (5): 389-399 (In Russian).
 14. Amchislavskii E.I., Sokolov D.I., Sel'kov S.A., Freidlin I.S. Modifikatsiya metoda obrazovaniya kapillyaropodobnykh struktur endotelial'nykh kletkami cheloveka linii Ea. hy 926. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006; 8(2-3): 414 (In Russian).
 15. Liu F., Li G., Deng L., Kuang B., Li X. The roles of FGF10 in vasculogenesis and angiogenesis. *Biomedical Research*. 2017; 28(3): 1329-1332.
 16. Sokolov D.I., Lvova T.Yu., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Sheveleva A.R., Stepanova O.I. et al. Effect of cytokines on the formation tube-like structures by endothelial cells in the presence of trophoblast cells. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2017; 1: 148-158. doi: 10.1007/s10517-017-3756-4.
 17. Zheng H., Fu G., Dai T., Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007; 50(3): 274-280. doi: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f.
 18. Neuhaus T., Stier S., Totzke G., Gruenewald E., Fronhoffs S., Sachinidis A., Vetter H., Ko Y.D. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif*. 2003; 36 (2): 75-86.
 19. Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G., Yarullina A.I. Molecular aspects of angiogenesis in brain glioblastomas. *Problems in oncology*. 2017; 63 (1): 19-27.
 20. Helmlinger J.M., Li Z., Lathia J.D. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010; 102: 789-795. doi: 10.1038/sj.bjc.6605551
 21. Boulanger C.M. Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36: e26-e31. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.306940
 22. Ngu H., Feng Y., Lu L., Oswald S.J., Longmore G.D., Yin F.C. Effect of focal adhesion proteins on endothelial cell adhesion, motility and orientation response to cyclic strain. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38(1): 208-222. doi: 10.1007/s10439-009-9826-7
 23. Bazzoni G., Dejana E. Endothelial cell-to-cell junction: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004; 84(3): 869-901. doi: 10.1152/physrev.00035.2003.

Для цитирования: Л.В. Антонова, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова, М.Ю. Ханова, В.В. Севостьянова, А.В. Цепоккина, Я.Л. Эльгудин, Л.С. Барбараши. Оценка *in vitro* активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матриксы на основе полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018; 7 (2): 89-101. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101

To cite: L.V. Antonova, V.G. Matveeva, E.A. Velikanova, M.Y. Khanova, V.V. Sevostyanova, A.V. Tsepokina, Ya.L. Elgudin, L.S. Barbarash. *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. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101