

УДК 616.1-89.444

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-4-68-81>

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТЕРПЕНЕТРИРУЮЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ФИБРИНА И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА В ПЕРСПЕКТИВЕ ТКАНЕВОЙ СОСУДИСТОЙ ИНЖЕНЕРИИ

МАТВЕЕВА В. Г.*, РЕЗОВА М. А., ГЛУШКОВА Т. В., СЕНОКОСОВА Е. А., ХАНОВА М. Ю., КРИВКИНА Е. О., ТОРГУНАКОВА Е. А., АНТОНОВА Л. В

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. В эксперименте *in vitro* изучить свойства IPN-гидрогеля фибрин/высокомолекулярный поливиниловый спирт с увеличенным количеством криоциклов и концентрации фибриногена для оценки перспективы его использования при создании протезов сосудов малого диаметра.

Материалы и методы. Изготовили однокомпонентные образцы гидрогелей фибрина, содержащего 40 и 50 мг/мл фибриногена; полимер поливинилового спирта (ПВС) (146000–186000 Да) 30 и 40 мг/мл; соответствующие группы образцов IPN-гидрогелей (фибрин 40 мг/мл и ПВС 30 мг/мл (Ф40П30), фибрин 40 мг/мл и ПВС 40 мг/мл (Ф40П40), фибрин 50 мг/мл и ПВС 30 мг/мл (Ф50П30), фибрин 50 мг/мл и ПВС 40 мг/мл (Ф50П40)). Полимеризацию ПВС проводили при 5 криоциклах.

Исследовали структурные свойства образцов методом СЭМ, гистологической окраски срезов гематоксилином и эозином, ИК-спектроскопией. Биологические свойства оценивали по жизнеспособности, плотности заселения и метаболической активности клеток на поверхно-

сти материалов. Физико-механические свойства образцов характеризовали прочностью на разрыв, относительным удлинением и модулем Юнга. Гемосовместимость материалов – контактной активацией тромбоцитов, процентом гемолиза эритроцитов.

Результаты. Методом последовательной полимеризации фибрина и высокомолекулярного ПВС получен IPN-гидрогель с равномерным распределением компонентов в толще и нижней поверхности, но преимущественным представлением ПВС в верхней части. Структурная неоднородность отразилась на биологических свойствах. Нижняя поверхность IPN-гидрогелей демонстрировала лучшую биосовместимость, по сравнению с верхней. Прочность IPN-гидрогелей повышалась при увеличении концентрации, молекулярной массы ПВС и количества криоциклов, однако показатели не достигали *a. mammaria*. Гидрогели не вызывали гемолиз и контактную активацию тромбоцитов.

Заключение. Техникой последовательной полимеризации фибрина и высокомолекулярного ПВС при пяти криоциклах получен двусторонний IPN-гидрогель с высокой биосовмес-

Для цитирования:

Матвеева В. Г., Резова М. А., Глушкова Т. В., Сенокосова Е. А., Ханова М. Ю., Кривкина Е. О., Торгунакова Е. А., Антонова Л. В. Характеристика интерпенетрирующих гидрогелей на основе фибрина и высокомолекулярного поливинилового спирта в перспективе тканевой сосудистой инженерии. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2024;9(4): 68-81. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-4-68-81>

*Корреспонденцию адресовать:

Матвеева Вера Геннадьевна, 650002, г. Кемерово, бульвар им. академика Леонида Барбараша, 6, E-mail: matveeva_vg@mail.ru
© Матвеева В. Г. и др.

тимостью на нижней стороне и улучшенной прочностью. Однако физико-механические характеристики IPN-гидрогеля уступали а. mamma, что требует новых решений.

Ключевые слова: IPN-гидрогели, протезы сосудов малого диаметра, прочность, биосовместимость, фибрин, поливиниловый спирт

Конфликт интересов

Авторы заявляют 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».

ORIGINAL RESEARCH

CHARACTERISTICS OF INTERPENETRATING HYDROGELS BASED ON FIBRIN AND HIGH MOLECULAR WEIGHT POLYVINYL ALCOHOL

VERA G. MATVEEVA*, MARIA A. REZVOVA, TATYANA V. GLUSHKOVA, EVGENIA A. SENOKOSOVA, MARIAM YU. KHANOVA, EVGENIA O. KRIVKINA, EVGENIA A. TORGUNAKOVA, LARISA V. ANTONOVA

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract

Aim. In an in vitro experiment, to study the properties of the IPN hydrogel fibrin/high-molecular polyvinyl alcohol with an increased number of cryocycles and fibrinogen concentrations to assess the prospects for its use in the creation of small-diameter vascular prostheses.

Materials and Methods. One-component samples of fibrin hydrogels containing 40 and 50 mg/ml fibrinogen, PVA polymer (146000–186000 Da) 30 and 40 mg/ml and the corresponding groups of IPN hydrogel samples were polymerized: fibrin 40 mg/ml and PVA 30 mg/ml (F40P30), fibrin 40 mg/ml and PVA 40 mg/ml (F40P40), fibrin 50 mg/ml and PVA 30 mg/ml (F50P30), fibrin 50 mg/ml and PVA 40 mg/ml (F50P40). PVA was cryostructured for 5 cycles.

The structural properties of the samples were studied using SEM, histological staining of sections with hematoxylin and eosin, and IR spectroscopy. Biological properties were assessed by the viability, number and metabolic activity of cells

colonized on the materials. The physical and mechanical properties of the samples were characterized by tensile strength, relative elongation and Young's modulus. The hemocompatibility of materials was assessed by contact activation of platelets and the percentage of erythrocyte hemolysis.

Results. Sequential polymerization of fibrin and high-molecular-weight PVA produced an IPN hydrogel with a uniform distribution of components in the thickness and lower surface, but a predominant presence of PVA on the upper surface. The structural heterogeneity of the material affected the biological properties. The lower surface of IPN hydrogels showed higher biocompatibility compared to the upper surface.

The strength of IPN hydrogels increased with increasing PVA molecular weight, concentration and number of cryocycles, but did not reach a mamma. Hydrogels do not hemolyze red blood cells and do not activate platelets.

Conclusion. Using a technique of sequential polymerization of fibrin and high molecular weight

◀ English

For citation:

Vera G. Matveeva, Maria A. Rezvova, Tatyana V. Glushkova, Evgenia A. Senokosova, Mariam Yu. Khanova, Evgenia O. Krivkina, Evgenia A. Torgunakova, Larisa V. Antonova. Characteristics of interpenetrating hydrogels based on fibrin and high molecular weight polyvinyl alcohol. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2024;9(4): 68–81. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-4-68-81>

*Corresponding author:

Dr. Vera G. Matveeva, 6, Academician Leonid Barbarash Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation,
© Vera G. Matveeva, et al.

PVA over five cryocycles, a double-sided IPN hydrogel with high biocompatibility on the lower side and improved strength was obtained. However, the physical and mechanical characteristics of IPN hydrogel were weaker than *a. mammaria*, which requires new solutions.

Keywords: IPN hydrogels, small-diameter vessel prostheses, strength, biocompatibility, fibrin, polyvinyl alcohol.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The study was carried out on the fundamental topic of the Research Institute of CPSSZ No. 0419-2022-0001 «Molecular, cellular and biomechanical mechanisms of the pathogenesis of cardiovascular diseases in the development of new methods of treating diseases of the cardiovascular system based on personalized pharmacotherapy, the introduction of minimally invasive medical devices, biomaterials and tissue-engineered implants».

Введение

Сочетание благоприятных биомиметических свойств фибрина и прочностных свойств поливинилового спирта (ПВС) в составе IPN-гидрогелей с возможностью полимеризации без использования токсических веществ, делает это направление интересными для изучения. В отличие от имеющихся работ получения IPN-гидрогелей на основе фибрина и ПВС с использованием фотоинициатора, мы исследуем возможность «чистой» полимеризации ПВС методом криоструктурирования.

Ранее мы получили IPN-гидрогель на основе фибрина и ПВС с улучшенными биологическими характеристиками по сравнению с ПВС, не склонный к усадке, но значительно уступающий по прочности *a. mammaria*. В данной работе была увеличена молекулярная масса ПВС и количество криоциклов, что повысило биосовместимость и прочность материала. Тем не менее прочностные свойства IPN-гидрогелей все еще не достигали *a. mammaria*, что требует новых решений и дальнейших исследований.

Проблема отсутствия на рынке эффективных протезов сосудов малого диаметра актуализирует исследования в этом направлении. Среди многообразия подходов к созданию протезов сосудов малого диаметра, наилучшие результаты получены в случае имитации структуры и функции сосудистой стенки [1]. Комбинация полимеров в составе гибридных гидрогелей с взаимопроницающей/интерпенетрирующей полимерной сетью (IPN-гидрогелей) позволяет сочетать благоприятные свойства каждого из компонентов и компенсировать недостатки [2]. Классические гидрогели с превосходной биосовместимостью и биологической активностью представляют собой белки внеклеточного матрикса (БВМ) [3]. Они являются многообещающими кандидатами в области тканевых имплантатов благодаря

их способности имитировать ключевые биохимические факторы необходимые для регенерации тканей. Фибрин играет важную роль в гемостазе, стимулирует заживление ран благодаря последовательному высвобождению ростовых факторов, способствует ангиогенезу, может выступать в качестве временной матрицы, но его низкая механическая прочность и модуль упругости, а также склонность к усадке ограничивает его использование в тканевой инженерии [4, 5]. Сочетание благоприятных биомиметических свойств фибрина и прочностных ПВС в составе IPN-гидрогелей, при возможности полимеризации без использования токсических веществ, делает это направление интересным для исследования. В отличие от имеющихся работ получения IPN-гидрогелей на основе фибрина и ПВС для нужд тканевой инженерии методом фотополимеризации с использованием фотоинициатора [6, 7], нами изучается возможность «чистой» полимеризации ПВС методом криоструктурирования. Мы полагаем, что ПВС в составе IPN-гидрогелей придаст недостающие каркасные и прочностные свойства фибрину, а фибрин улучшит биологические свойства ПВС, что позволит использовать данный IPN-гидрогель при создании протезов сосудов малого диаметра.

В предыдущей работе мы получили IPN-гидрогель на основе фибрина и ПВС с улучшенными биологическими характеристиками, по сравнению с ПВС, не склонный к усадке, но значительно уступающий по прочности *a. mammaria* [8]. Мы предположили, что увеличение молекулярной массы с 89 000-98 000 до 146 000-186 000, а также количество циклов криоструктурирования с 3 до 5, поможет улучшить прочность IPN-гидрогеля и сохранит благоприятную биосовместимость материала.

Опыт последовательной полимеризации фибрина и ПВС показал, что в растворе линейно-

го ПВС большой вязкости (60 мг/мл) сеть фибрина формируется отдельными глыбками и не распределяется равномерно [8]. Мы использовали концентрации ПВС 30 и 40 мг/мл, поскольку при одинаковой концентрации раствор высокомолекулярного линейного ПВС более вязкий, чем среднемолекулярный. С целью увеличения количества сайтов клеточной адгезии на поверхности IPN-гидрогеля исходные концентрации фибриногена в преципитате были увеличены до 40 и 50 мг/мл.

Цель исследования

В эксперименте *in vitro* изучить свойства IPN-гидрогеля фибрин/высокомолекулярный поливиниловый спирт с увеличенным количеством криоциклов и концентрации фибриногена для оценки перспективы его использования при создании протезов сосудов малого диаметра.

Материалы и методы

Кровь у доноров забирали в пробирки с 3,8% цитратом натрия, центрифугировали при 1500 G 20 мин. Преципитат выделяли методом этаноловой преципитации с низким содержанием этанола [9]. Концентрацию фибриногена в преципитате регулировали внесением Нересбуфера на NaCl.

Для получения высокомолекулярного полимера использовали ПВС молекулярной массой 146 000–186 000, степенью гидролиза ацетатных групп >99% (Sigma-Aldrich, США). Линейный полимер ПВС растворяли в дистиллированной воде при температуре 90–100 °C до получения прозрачного раствора с концентрацией 120 мг/мл.

Приготовление образцов IPN-гидрогеля фибрина и ПВС

В раствор линейного ПВС 120 мг/мл вносили 0,9 % CaCl_2 с аprotинином и тщательно перемешивали. Соотношение компонентов подбирали с учетом получения концентраций ПВС 60 и 80 мг/мл, CaCl_2 0,225 %. Отдельно разводили преципитат до концентрации фибриногена 80 и 100 мг/мл. Далее в раствор преципитата вносили ПВС в соотношении 1:1, тщательно перемешивали, заливали в форму и оставляли при 37 °C для полимеризации фибрина. В итоге были получены следующие группы образцов IPN-гидрогелей:

фибрин 40 мг/мл, ПВС 30 мг/мл (Ф40П30)
фибрин 40 мг/мл, ПВС 40 мг/мл (Ф40П40)
фибрин 50 мг/мл, ПВС 30 мг/мл (Ф50П30)

фибрин 50 мг/мл, ПВС 40 мг/мл (Ф50П40)

Дальнейшее криоструктурирование ПВС проводили путем заморозки образцов до –40 °C на 20 часов, после чего выполняли градиентную разморозку при –4 °C с экспозицией 8 часов и оттаивание при +6 °C. Циклы замораживания-оттаивания повторяли пять раз.

Приготовление контрольных образцов фибрина

В качестве групп контроля использовали гидрогели фибрина 50 мг/мл (Ф50) и 40 мг/мл (Ф40), для этого концентрацию фибриногена в преципитате доводили до 100 или 80 мг/мл, далее в соотношении 1:1 вносили раствор CaCl_2 0,225% с аprotинином (Фирма Фермент, Россия), перемешивали, заливали в форму и оставляли для полимеризации.

Приготовление контрольных образцов ПВС

Раствор линейного ПВС готовили, как описано выше, доводили концентрацию ПВС до 30 мг/мл (П30) и 40 мг/мл (П40) с последующим криоструктурированием. Циклы замораживания и оттаивания контрольных образцов фибрина и ПВС выполняли вместе с образцами IPN-гидрогелей.

Изучение структуры гидрогелей

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Образцы в течение суток фиксировали в 1 % растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США), отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (Gibco, США) и далее в дистиллированной воде в течение суток. После этого образцы замораживали при –80 °C и лиофилизировали в установке Freezezone 2.5 (Labconco, США) при температуре –40 °C и давлении <0,133 мбар. Для визуализации внутренней структуры лиофилизированные образцы погружали в жидкий азот и ломали. Методом ионного распыления на поверхность разлома наносили токопроводящее (Au/Pd) покрытие толщиной 12 нм. Структуру оценивали на микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Гистологическая окраска срезов гематоксилином и эозином

Образцы гидрогелей фиксировали в 10 % забуференном формалине (BioVitrum, Россия), далее в 2 % глутаровом альдегиде, дегидратировали, пропитывали и заливали парафином Гистомикс (БиоВитрум, Россия). Из парафиновых блоков с помощью микротомы HM 325

(Thermo Scientific, США) изготавливали поперечные срезы толщиной 8 мкм, помещали на стекла, депарафинизировали и дегидратировали. Образцы последовательно окрашивали раствором гематоксилина Гарриса (BioVitrum, Россия) 15 минут и далее раствором эозина (Био-Витрум, Россия) 30 сек. Далее образцы промывали водой, дегидратировали в серии спиртов, просветляли в ксилоле и заключали в монтирующую среду (BioVitrum, Россия) под покровное стекло. Образцы оценивали методом световой микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-спектроскопия)

Предварительно образцы ($n = 3$) из каждой группы лиофилизировали. Химическую структуру полученных гидрогелей характеризовали с помощью инфракрасной спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением (Tensor 27, Bruker, США) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения MIRacle (PIKE Technologies, США) на кристалле ZnSe. Исследование проводили в спектре в диапазоне $400\text{--}3\,700\text{ см}^{-1}$ с разрешением 2 см^{-1} .

Изучение механических свойств IPN-гидрогелей

Образцы на исследование готовили на вырубном прессе ZCP 020 (Zwick/Roell, Германия) с использованием ножа специальной формы. Образцы увлажняли, механические свойства тестировали на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия) при температуре 37°C с использованием датчика номинальной силы 50 Н. Предел прочности определяли по максимальному напряжению при растяжении (МПа), упруго-деформативные свойства – по относительному удлинению до начала разрушения (%), модуль Юнга (МПа) определяли в пределах малых деформаций. В качестве сравнения использовали образцы внутренней грудной артерии человека (*a. mammaria*), которая остается «золотым стандартом» для имплантации при коронарном шунтировании.

Оценка гемосовместимости образцов

В соответствии с требованиями к медицинским изделиям, контактирующим с кровью (ГОСТ Р ИСО 10993.4), мы оценили степень агрегации тромбоцитов и степень гемолиза после контакта крови с образцами.

Агрегация тромбоцитов

Донорскую кровь забирали с добавлением цитрата натрия 3,8 % (Химсервис, Россия) в соотношении 9:1 (кровь:цитрат). Из части крови готовили обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), для этого цитратную кровь центрифугировали при 150-200 g в течение 10 минут при комнатной температуре ($18\text{--}25^\circ\text{C}$). Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием цитратной крови в течение 20 минут при 2500 G и далее использовали для калибровки прибора. Положительным контролем в настоящем исследовании служила интактная ОТП. Время контакта исследуемых образцов с ОТП составило 3 минуты. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали аденозин $5'$ -дифосфат (Ренам, Россия), в конечной концентрации 20 мкмоль/л. Измерение степени агрегации проводили на полуавтоматическом 4-канальном анализаторе агрегации тромбоцитов АРАСТ 4004 (LABiТес, Германия). Интенсивность агрегации через 5 мин измерения выражали значениями максимального процента агрегации.

Оценка степени гемолиза эритроцитов

Для анализа использовали свежую донорскую кровь с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия (Химсервис, Россия). Исследуемые образцы нарезали прямоугольниками размером 2,5 см на 5 см ($n = 10$ штук для каждого вида исследуемого материала), помещали в бюксы, добавляли по 5 мл физиологического раствора и ставили на шейкер в термостат при 37°C на 2 часа. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор, дистиллированная вода соответственно для положительного контроля. После инкубации в термостате в каждый бюкс добавляли 100 мкл цитратной крови, перемешивали и выдерживали при 37°C в течение 1 часа. После инкубации вынимали образцы, отбирали содержимое бюксов в пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 2000 об/мин для осаждения эритроцитов. Оптическую плотность (ОП) полученных растворов измеряли при длине волны 545 нм на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo Scientific, США). Степень гемолиза определяли по формуле:

$$\Gamma\% = \frac{(D_t - D_{ne})}{(D_{pe} - D)} \times 100\%,$$

где $\Gamma\%$ – процент гемолиза эритроцитов,
 D_t – ОП пробы с исследуемым образцом,
 D_{ne} – ОП отрицательного контроля (пробы с физиологическим раствором),

D_{pe} – ОП положительного контроля (100 % гемолиз), (пробы с дистиллированной водой).

Изучение биологических свойств

Тестирование биологических свойств гидрогелей выполняли на культуре гибридомы эндотелиальных клеток пупочной вены человека EA hy926. Для этого образцы в стерильных условиях заливали в лунки 24-луночного планшета ($n = 6$), формировали гидрогели, как описано выше. Часть образцов IPN-гидрогелей отделяли от формы, переворачивали нижней стороной вверх. Поверхности подготовленных образцов заселяли клетками по 30 тыс. клеток/лунку и культивировали 72 часа в CO_2 -инкубаторе при 5 % CO_2 и температуре 37 °C.

Оценка жизнеспособности клеток

Клетки окрашивали ядерными красителями Hoechst 33342 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 10 минут и этидиум бромидом 30 мкг/мл (Sigma Aldrich, США) в течение 1 минуты. Подсчёт мертвых клеток (ядра окрашены этидиум бромидом) и общего количества клеток (ядра окрашены Hoechst) на образцах и культуральном пластике производили на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) в 5 случайных полях зрения с каждого повтора ($n = 3$).

$$OM = \frac{AM \times 100\%}{AA},$$

$$OЖ = OM - 100\%,$$

где

OM – относительное количество мертвых клеток (%),

AM – абсолютное количество мертвых клеток,

AA – абсолютное количество всех адгезированных клеток,

OЖ – относительное количество живых клеток (%).

Данный метод использовали для подсчета количества клеток на mm^2 поверхности.

Оценка метаболической активности

Метаболическую активность оценивали колориметрическим методом с использованием набора Cell Cytotoxicity Assay Kit Colorimetric (absam, Англия). В лунки с образцами вносили реактив в рабочей концентрации (1:5 с питательной средой), инкубировали 3 часа при 37 °C. После этого по 200 мкл реактива из лунок с образцами переносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность

на двух длинах волн 570 нм и 605 нм на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США). Расчет метаболической активности клеток проводили по формуле:

$$MA = R_{оп} - R_0$$

где MA – метаболическая активность клеток (УЕ),

R – отношение оптической плотности (ОП) при длине волны 570 нм к ОП при длине волны 605 нм (OP_{570}/OP_{605}),

оп – опытный образец,

0 – «нулевая» проба без клеток, содержащая реактив в рабочей концентрации.

Статистическая обработка данных

Статистическую и графическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Количественные данные будут представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартиля (Median (Q1; Q3)). Достоверность различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение между несколькими группами проводили методом ANOVA с коррекцией результатов на множественность сравнения методом FDR. Статистическую значимость регистрировали при $p < 0,05$ во всех тестах.

Результаты

Структура гидрогелей

На разломах фибрин демонстрировал волокнистую структуру, тогда как полимерам ПВС соответствовала слоисто-ячеистая (**рисунок 1 А**).

Выполнено измерение диаметра пор различных образцов. Показано, что в образцах фибрина (Ф40 и Ф50) размер пор был самый большой, в ПВС (П30 и П40) – поры меньшего диаметра, и самые мелкие поры в IPN-гидрогелях (**таблица 1**),

Несмотря на хорошую визуализацию, на фотграфиях IPN-гидрогелей со сканирующего электронного микроскопа невозможно достоверно отличить структуры фибрина и ПВС.

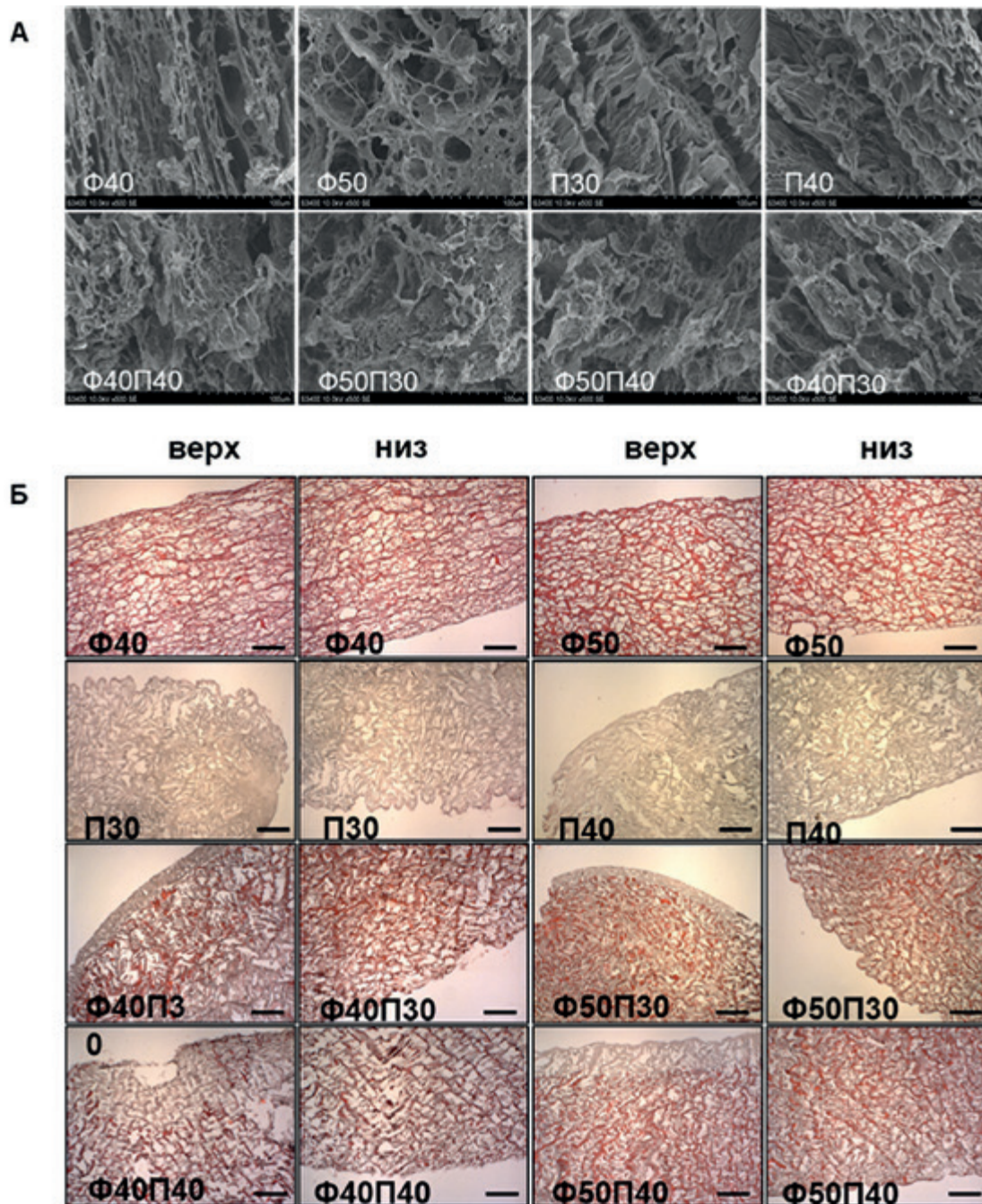
Гистологическая окраска гематоксилином и эозином визуально разделяла компоненты IPN-гидрогеля. Волокна фибрина окрашивались в ярко-красный цвет, а структуры ПВС – в светло-фиолетовый, что позволяло оценить равномерность их распределения (**рисунок 1 Б**). Структура верхней части IPN-гидрогелей отли-

Рисунок 1.

А. Фотографии разлома образцов (СЭМ, ув. х500). Б. Поперечный срез образцов (Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия). ПВС имеет бледно-фиолетовый цвет, фибрин – ярко красный.

Figure 1.

А. Photographs of the fracture of samples (SEM, uv. x500). Б. Cross-section of samples (Staining with hematoxylin and eosin, light microscopy). PVS has a pale purple color, fibrin is bright red.



Условные обозначения в данном рисунке и далее: Φ40 и Φ50 – фибрин с концентрацией фибриногена 40 и 50 мг/мл, П30 и 40 – поливиниловый спирт с концентрацией 30 и 40 мг/мл, IPN – гидрогель с взаимопроникающей полимерной сетью, содержащий указанные компоненты соответствующей концентрации.

Symbols in this figure and below: F40 and F50 – fibrin with fibrinogen concentration of 40 and 50 mg/ml, P30 and 40 – polyvinyl alcohol with a concentration of 30 and 40 mg/ml, IPN – hydrogel with an interpenetrating polymer network containing these components of the appropriate concentration.

Таблица 1.

Размер пор образцов на СЭМ (мкм; медиана (25; 75 процентиль))

Table 1.

Pore size of samples per SEM (μm; median (25; 75 percentile))

Φ40/F40	Φ50/F50	П30/P30	П40/P40	Φ40П30/ F40/P30	Φ40П40/ F40/P40	Φ50П30/ F50/P30	Φ50П40/ F50/P40
119,20 78,12; 157,11	91,55 55,89; 101,70	* 15,22; 12,82; 24,30	* 11,40 10,9; 19,11	*/** 3,19 2,53; 6,05	*/** 3,44 2,24; 7,49	*/** 1,85 1,49; 2,93	*/** 2,75 1,62; 3,59

Примечания: * $p < 0,05$ по сравнению с фибриновыми матрицами (Φ40, Φ50), ** $p < 0,05$ по сравнению с поливиниловыми матрицами (П30, П40)

Notes: * $p < 0,05$ compared to fibrin matrices (F40 and F50), ** $p < 0,05$ compared to PVS (P30 and P40).

чалась от нижней и толщи. В верхней части содержался слой ПВС с минимальным количеством фибрина, а толща и нижний слой состояли из равномерно распределенных компонентов фибрина и ПВС (**рисунок 1 Б**).

ИК- спектроскопия

FTIR-спектры поверхности фибрина содержали полосы, типичные для амидной связи белковой структуры (**рисунок 2**), а именно: 1635 см^{-1} (амид I, обусловлена растяжением связи C-H карбонильной группы), 1550 см^{-1} (амид II, обусловлена деформационными колебаниями связи N-H и растяжением связи C-N) [10, 11]. Характерные пики поглощения валент-

ных колебаний связи O-H меж- и внутримолекулярных водородных связей отмечены при 3300 см^{-1} в спектрах ПВС, полосы дублировались и в спектрах IPN-композитных структур. Также в обоих спектрах (ПВС и IPN-гидрогелей) обнаружены полосы валентных колебаний C-H алкильных групп в области $2930\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ и растяжения C-O-связи гидроксильной группы при 1085 см^{-1} [12, 13]. Полоса при 1142 см^{-1} , обусловленная симметричным валентным колебанием (C-C) в кристаллических областях полимера, присутствовала на спектрах криогелей чистого ПВС и IPN-гидрогелей. Вибрация на частоте 842 см^{-1} относится к балансу $-\text{CH}_2-$ основной цепи полимера ПВС.

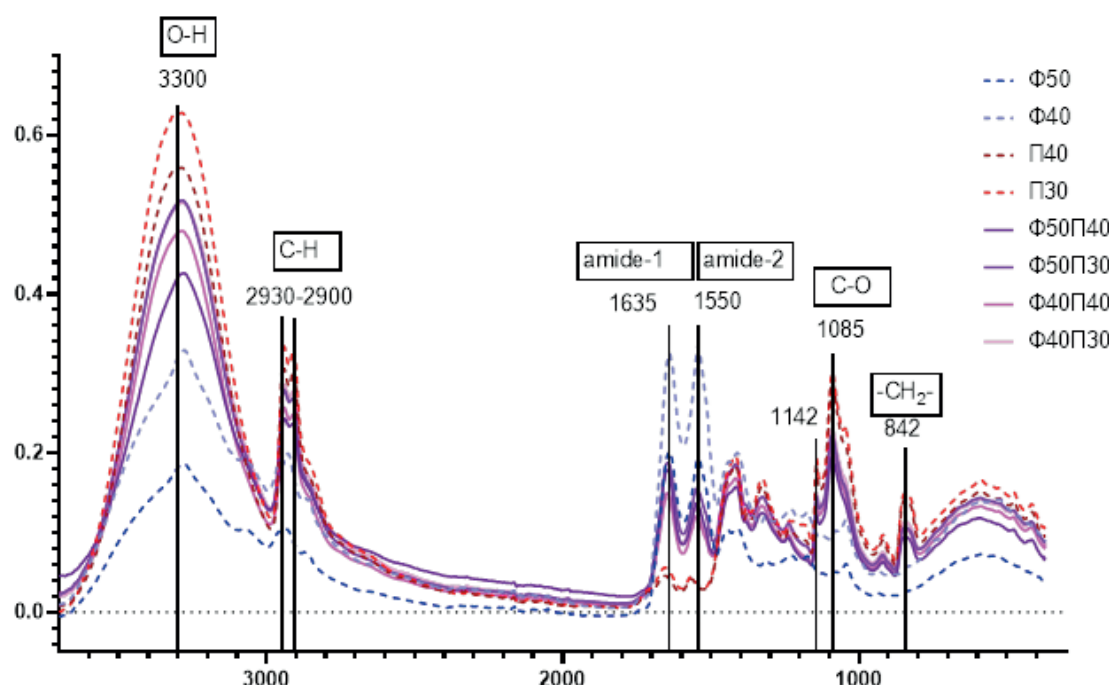


Рисунок 2. Спектры поглощения на поверхности образцов (метод инфракрасной спектроскопии)

Figure 2. Absorption spectra on the surface of samples (infrared spectroscopy method)

Биологические свойства образцов

Высокие показатели жизнеспособности, метаболической активности и количества клеток на мм^2 (плотность заселения) в контрольной группе на культуральном пластике не различались с показателями на фибрине (**рисунок 3**). При этом жизнеспособность на нижней стороне IPN-гидрогелей была сравнима с жизнеспособностью на фибрине.

ПВС 30 и 40 мг/мл и верхняя сторона IPN-гидрогелей, за исключением Ф50П40, демонстрировали низкую метаболическую активность, количество адгезированных и жизнеспособных клеток, по сравнению с контролем, фибрином и нижней стороной IPN-гидрогелей.

Сравнение биологических свойств различных поверхностей IPN-гидрогелей показало

значительно лучшие показатели для нижней стороны, по сравнению с верхней. Так, жизнеспособность, плотность заселения и метаболическая активность клеток на нижней поверхности IPN-гидрогелей была значительно выше, по сравнению с верхней. Исключение составило лишь количество клеток на верхней стороне IPN-гидрогелей Ф50П40, показатели которой были выше и статистически не различались с нижней стороной (**рисунок 3**).

Гемосовместимость

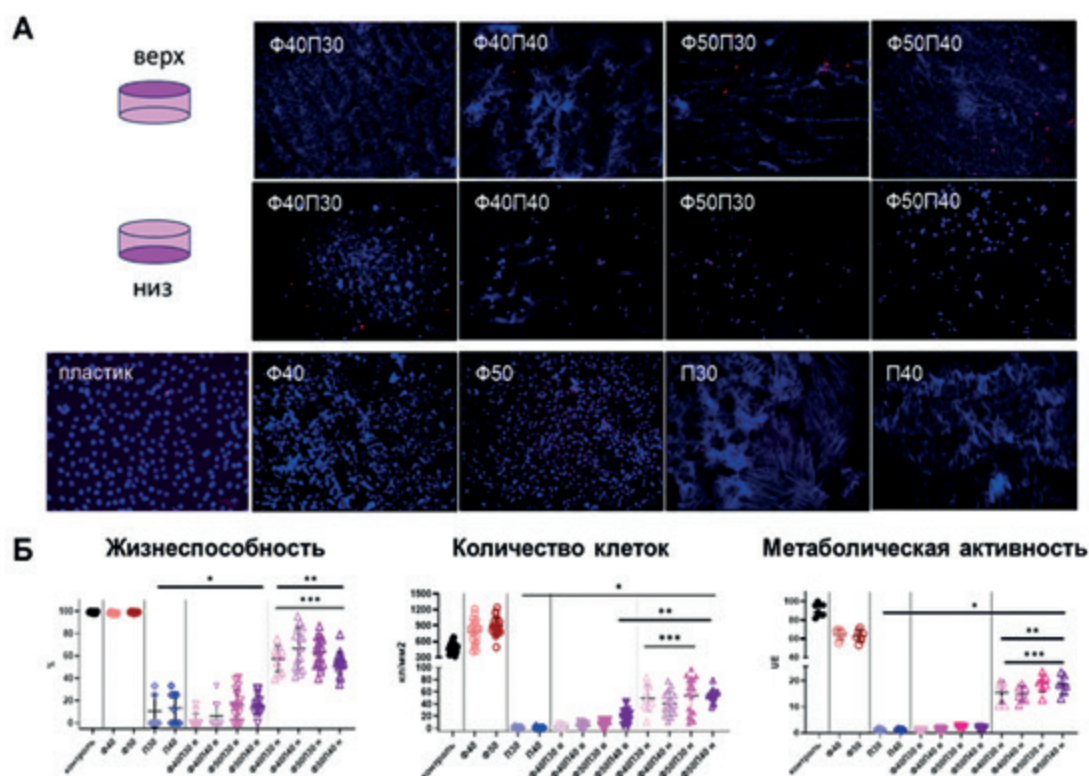
Степень гемолиза эритроцитов при контакте со всеми вариантами образцов составили менее 1 % (данные не приводятся), что указывает на отсутствие повреждающего влияния на эритроциты.

Рисунок 3.

А. Фотографии жизнеспособности клеток на различных матрицах (флуоресцентная микроскопия, об. x20). Для IPN-гидрогелей заселение клетками выполняли на верхнюю и нижнюю поверхность. Б. Графическое представление показателей биосовместимости гидрогелей.

Figure 3.

A. Photographs of cell viability on different matrices (fluorescence microscopy, vol. x20). For IPN hydrogels, cell colonization was performed on the upper and lower surfaces. B. Graphical representation of hydrogel biocompatibility indicators.



Примечания: * – $p < 0,05$, по сравнению с контролем на стекле и фибрине (Ф40 и Ф50);
** – $p < 0,05$ по сравнению с ПВС (П30 и П40),
*** – $p < 0,05$ по сравнению с верхней стороной соответствующего IPN-гидрогеля.

Notes: * – $p < 0.05$ compared to the control on glass and fibrin (F40 and F50),
** – $p < 0.05$ compared to PVS (P30 and P40),
*** – $p < 0.05$ compared to the upper side of the corresponding IPN-hydrogel.

Тест агрегации тромбоцитов не зарегистрировал значимой контактной активации тромбоцитов на поверхности гидрогелей (таблица 2). Нами не обнаружено статистически различий в основных показателях агрегатограммы (максимальный процент агрегации, время достижения

максимума агрегации, площадь под кривой и др.) в интактной ОТП и ОТП после инкубации с образцами гидрогелей различных групп.

Физико-механические свойства

Таблица 2.

Максимальный процент агрегации тромбоцитов интактной плазмы (контроль) и после инкубации с образцами гидрогелей

Table 2.

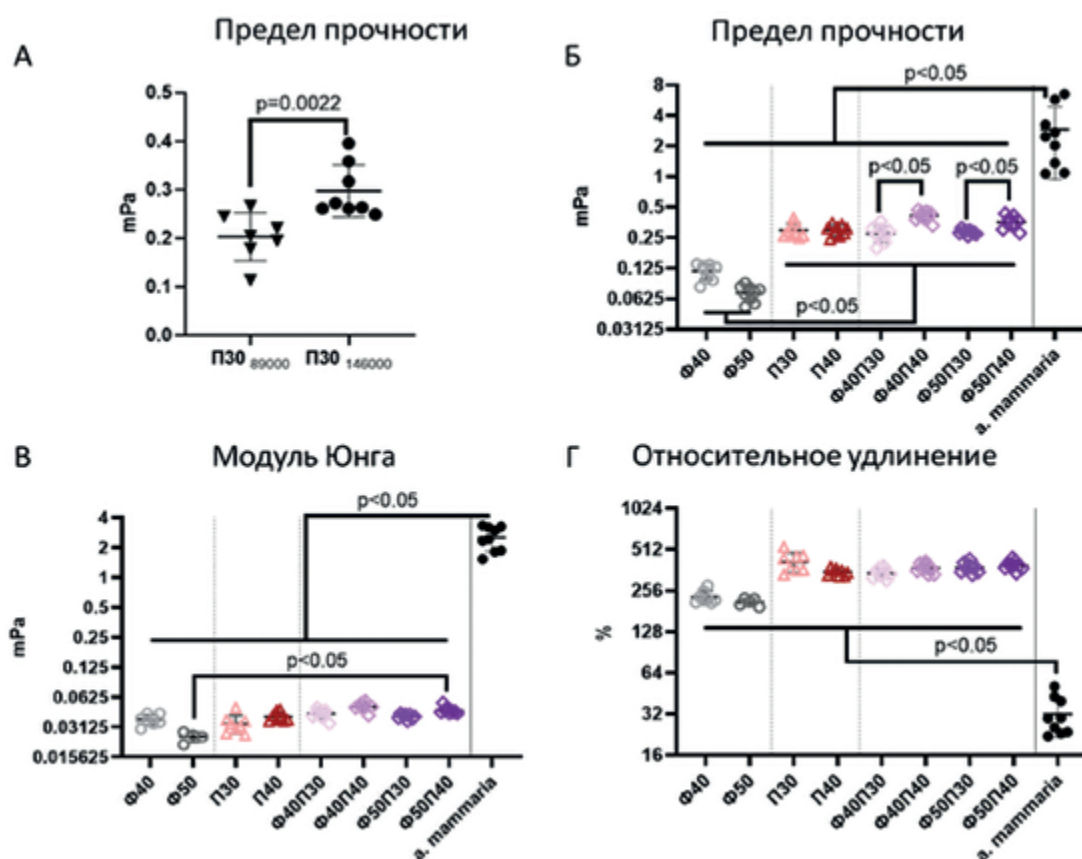
Maximum percentage of platelet aggregation of intact plasma (control) and after incubation with hydrogel samples

Матрица The matrix	Максимальная агрегация (%) Maximum percentage of platelet aggregation	Время максимальной агрегации (сек) Maximum aggregation time (sec)	Площадь под кривой (%) Area under the curve (%)
Контроль Intact plasma (control)	87,6 (83,1; 92,7)	206,2 (200,8; 221,2)	72,7 (69,2; 78,3)
Ф40/Ф40	83,6 (79,5; 87,6)	198,2 (183,2; 205,5)	71,7 (65,1; 73,2)
Ф50/Ф50	91,9 (86,9-95,6)	202,2 (199,5; 210,0)	73,1 (70,3; 79,1)
П30/П30	85,7 (83,0; 94,2)	201,7 (192,2; 206,2)	69,3 (62,1; 71,0)
П40/П40	85,8 (87,3; 88,4)	200,2 (178,2; 207,2)	69,5 (68,7; 72,3)
Ф40П30/Ф40П30	91,9 (88,8; 93,4)	205,5 (201,2; 210,2)	76,2 (75,9; 79,2)
Ф40П40/Ф40П40	90,7 (89,4; 98,0)	201,1 (188,5; 209,2)	78,1 (75,5; 80,1)
Ф50П30/Ф50П30	90,5 (88,8; 91,9)	203,5 (190,2; 213,2)	76,6 (75,7; 78,3)
Ф50П40/Ф50П40	92,5 (89,9; 95,0)	204,9 (200,4; 210,2)	75,9 (74,8; 80,1)

Образцы ПВС молекулярной массой 146 000-186 000, концентрацией 30 мг/мл, прошедшие пять циклов криоструктурирования, обладали большей прочностью на разрыв, по сравнению с аналогичными образцами ПВС 89000-98000 и тремя циклами криоструктурирования (0,268

(0,261-0,348) мПа и 0,204 (0,178-0,244) мПа соответственно) (рисунок 4 А).

Прочность IPN-гидрогелей формировалась в основном за счет ПВС. Так, прочность на разрыв IPN-гидрогелей, содержащих одинаковую концентрацию фибриногена, но более высо-

**Рисунок 4.**

А. Сравнение прочности образцов полимера ПВС 89000-98000 Да, прошедшего три цикла криоструктурирования, и ПВС 146000-186000 Да с пятью циклами криоструктурирования. Б – Г. Сравнение физико-механических свойств образцов IPN-гидрогелей высокомолекулярный ПВС/фибрин и их компонентов.

Figure 4.

A. Comparison of the strength of samples of polymer PVS 89000-98000 Da, which has undergone three cycles of cryostructuring, and PVS 146000-186000 Da with five cycles of cryostructuring. B – D. Comparison of physical and mechanical properties of samples of IPN-hydrogels high-molecular PVA/fibrin and their components.

кие концентрации ПВС была выше, чем аналогичных образцов с более низкой концентрацией ПВС (Ф40П30 и Ф40П40, Ф50П30 и Ф40П40) (рисунок 4 Б). Тем не менее прочностные свойства ПВС оставались неудовлетворительными, по сравнению с a. mammaria (рисунок 4 Б-Г).

Обсуждение

Ограничение широкого использования фибринсодержащих матриц в тканевой инженерии связано с низкой прочностью этого материала и склонностью к усадке. Одно из решений связано с включением в состав таких матриц прочного, каркасного полимера. Композитные каркасы с фибрином показали большой потенциал в создании лоскутов для закрытия кожных дефектов, инженерии костной и хрящевой ткани, сердечно-сосудистой тканевой инженерии, регенеративной медицине [14].

ПВС демонстрирует хорошие механические свойства, способность имитировать натуральные ткани, поддерживать влажную среду и создавать благоприятные условия для миграции, пролиферации и регенерации тканей клеток [15]. Bidault L. и коллеги показали, что модуль упругости (метилакрилатного)-ПВС-фибрина-IPN способен увеличиваться в 3–50 раз,

по сравнению с гелями чистого фибрина [6]. Тем не менее на этом варианте IPN-гидрогеля отсутствовала пролиферация фибробластов человека. В 2015 году та же исследовательская группа улучшила биосовместимость материала путем введения в IPN-гидрогель фибрин-ПВС (метилакрилатного) сывороточного альбумина [7]. В данных работах гелеобразование ПВС, предварительно модифицированного с помощью метакрилатных групп, выполнено фотополимеризацией. Этот метод предполагает использование токсичного фотоинициатора. В своей работе считаем преимуществом применение «чистых» технологий синтеза IPN-гидрогеля, исключающих использование токсичных реагентов при полимеризации, поскольку после полимеризации гидрогеля формируется пористая структура с высоким содержанием жидкой фазы, из которой сложно или практически невозможно полностью удалить токсичные вещества. Присутствие токсичных веществ в материале нивелирует благоприятное влияние фибрина на клеточную жизнедеятельность и снижает его биосовместимость [16].

Криоструктурирование, как вариант полимеризации ПВС, является «чистой» технологией и соответствует современным требованиям

для потенциального производства компонентов медицинских изделий. Ранее нами при использовании «чистой» технологии был получен IPN-гидрогель фибрин/ПВС способный сохранять форму и отсутствием усадки, однако прочностные свойства оставались неудовлетворительными [8]. Один из способов повышения прочности полимера ПВС связан с увеличением его концентрации и, соответственно, вязкости исходного раствора для криоструктурирования. Ограничение данного подхода связано с невозможностью фибрина формировать равномерную сеть в растворах ПВС высокой вязкости. В диапазоне выбранных концентраций высокомолекулярного ПВС 30 и 40 мг/мл формировалась полноценная фибриновая сеть. Гисто-

логическое исследование поперечных срезов IPN-гидрогелей показало, что фибрин и ПВС равномерно распределялись в толще матрицы, однако верхний слой содержал, в основном, структуры ПВС. Возможная причина перераспределения компонентов верхнего слоя в пользу ПВС может быть связана с последовательностью процесса полимеризации и склонностью фибрина к усадке. Мы полагаем, что первоначально под действием тромбина и CaCl_2 формировались волокна фибрина, которые давали усадку по свободному верхнему краю и опускались ниже уровня раствора, содержащего линейный ПВС, который на следующем этапе криоструктурирования сформировал верхний полимерный слой (рисунок 5).

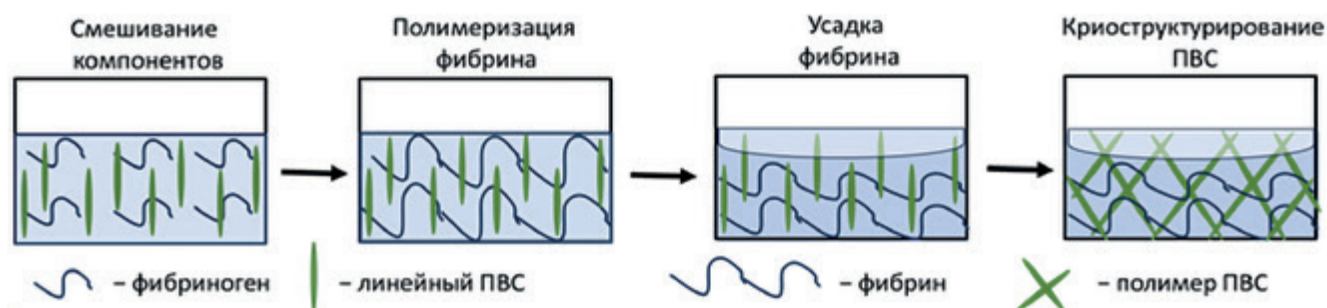


Рисунок 5.

Схема перераспределения компонентов при формировании IPN-гидрогеля на основе фибрина и ПВС методом криоструктурирования

Figure 5.

Scheme of redistribution of components in the formation of IPN-hydrogel based on fibrin and PVA by cryostructuring

Поскольку свободная поверхность IPN-гидрогелей была сформирована, в основном, полимером ПВС, ее биосовместимость практически не отличалась от ПВС. Нижняя сторона содержала равномерно смешанные волокна фибрина и структуры ПВС, что подтверждается гистологическим исследованием и лучшими биологическими свойствами (рисунок 1Б, 3Б). Таким образом, мы получили материал с различными биологическими характеристиками на поверхностях. Данное свойство IPN-гидрогелей может быть использовано при создании двусторонних мембран, обладающих как изолирующими, так и хорошими интегрирующими возможностями.

Использование высоких концентраций полимера в гидрогеле сопряжено с формированием более плотной полимерной сети, которая может препятствовать миграции клеток в матрикс и их интеграции с окружающими тканями [17, 18]. Общей проблемой при разработке гидрогелей является поиск баланса между обеспечением среды, способствующей развитию клеток, и наличием хороших механических свойств.

В нашем исследовании результаты измерения диаметра пор показали, что IPN-гидрогели фибрин/ПВС имеют меньший размер, по сравнению с монокомпонентными гидрогелями соответствующей концентрации (таблица 1). Это связано, с одной стороны, с большей финальной концентрацией раствора для полимеризации IPN-гидрогелей, суммирующей концентрацию обоих компонентов, а также взаимопроникновением сетей фибрина и структур ПВС с перекрытием пор.

Диаметр пор во всех вариантах IPN-гидрогелей был меньше длины фибробласта [18]. Однако поперечный размер фибробластов человека может значительно сокращаться при ограничении поперечного расплывания [18], что не отрицает возможности его миграции в относительно мелкие поры. Исследования in vivo могут ответить на ряд вопросов, касающихся миграции и заселения IPN-гидрогеля клетками в условиях организма, однако требуется достижение материалом удовлетворительных физико-механических свойств.

Нами зарегистрировано увеличение прочности полимера ПВС в рамках одинаковой концентрации линейного ПВС при повышении его молекулярной массы и количества криоциклов (**рисунк 4А**). Прочность IPN-гидрогеля фибрин/ПВС регулировалась, в основном, концентрацией ПВС, но в эксперименте оставались значительно ниже эталона *a. mammaria* (**рисунок 4Б**).

Примечательно, что все исследуемые образцы гидрогелей не вызывали гемолиза и контактной активации тромбоцитов, что является благоприятным свойством материала с перспективой использования в изготовлении сосудистых протезов.

Данное исследование является этапом изучения и поиска вариантов повышения прочности IPN-гидрогеля фибрин/ПВС. Дальнейшие

шаги на пути создания стабильного гидрогеля и улучшения физико-механических свойств могут быть сосредоточены на вариантах физического и ферментативного сшивания IPN-гидрогеля или ином подходе при последовательной полимеризации компонентов.

Заключение

Техникой последовательной полимеризации фибрина и высокомолекулярного ПВС при пяти циклах криоструктурирования получен двусторонний IPN-гидрогель с высокой биосовместимостью на нижней стороне и улучшенной прочностью. Однако физико-механические характеристики IPN-гидрогеля в целом не соответствуют целевым показателям *a. mammaria*, что требует новых решений и подходов.

Литература:

1. Suamte L., Tirkey A., Barman J., Jayasekhar Babu P. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*. 2023;1:100011. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>
2. Crosby C.O., Stern B., Kalkunte N., Pedahzur S., Ramesh S., Zoldan J. Interpenetrating polymer network hydrogels as bioactive scaffolds for tissue engineering. *Rev. Chem. Eng.* 2022;38(3):347-361. <https://doi.org/10.1515/revce-2020-0039>
3. Valdoz J.C., Johnson B.C., Jacobs D.J., Franks N.A., Dodson E.L., Sanders C., Cribbs S. G., Ryal P. V. The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(23):12690. <https://doi.org/10.3390/ijms222312690>
4. Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Антонова Л.В., Барбараш Л.С. Фибрин – перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(1):196-208. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-196-208>
5. Park C.H., Woo K.M. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018;1064:253-261. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_16
6. Bidault L., Deneufchatel M., Vancaeyzeele C., Fichet O., Larreta-Garde V. Self-supported fibrin-polyvinyl alcohol interpenetrating polymer networks: an easily handled and rehydratable biomaterial. *Biomacromolecules*. 2013;14(11):3870-3879. <https://doi.org/10.1021/bm400991k>
7. Bidault L., Deneufchatel M., Hindié M., Vancaeyzeele C., Fichet O., Larreta-Garde V. Fibrin-based interpenetrating polymer network biomaterials with tunable biodegradability. *Polymer*. 2015;62:19-27. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.02.014>
8. Матвеева В.Г., Резцова М.А., Глушкова Т.В., Сергеева А.В., Кривкина Е.О., Антонова Л.В., Барбараш Л.С. Структура и свойства гидрогеля с взаимопроницающей полимерной сетью фибрин/поливиниловый спирт как модифицирующего покрытия для протезов сосудов малого калибра. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2023;27(2):74-86. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2023-2-74-86>
9. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина. Патент РФ на изобретение RU №2758260 C1. 27.10.2021. Доступно по: https://elibrary.ru/download/elibrary_47122803_25649697.PDF
10. Blat A., Dybas J., Chrabaszcz K., Bulat K., Jasztal A., Kaczmarek M., Pulyk R., Popiela T., Slowik A., Malek K., Adamski M.G., Marzec K.M. FTIR, Raman and AFM characterization of the clinically valid biochemical parameters of the thrombi in acute ischemic stroke. *Sci. Rep.* 2019;9:15475. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51932-0>
11. Sa'adon S., Ansari M.N.M., Razak S.I.A., Anand J.S., Nayan N.H.M., Ismail A.E., Khan M.U.A., Haider A. Preparation and Physicochemical Characterization of a Diclofenac Sodium-Dual Layer Polyvinyl Alcohol Patch. *Polymers*. 2021;13:2459. <https://doi.org/10.3390/polym13152459>
12. Choo K., Ching Y.C., Chuah C.H., Julai S., Liou N.S. Preparation and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Chitosan Composite Films Reinforced with Cellulose Nanofiber. *Materials (Basel)*. 2016;9(8):644. <https://doi.org/10.3390/ma9080644>
13. Dattola E., Parrotta E.I., Scalise S., Perozziello G., Limongi T., Candeloro P., Coluccio M.L., Maletta C., Bruno L., De Angelis M. T., Santamaria G., Mollace V., Lamanna E., Fabrizio E. Di, Cuda G. Development of 3D PVA scaffolds for cardiac tissue engineering and cell screening applications. *RSC Adv.* 2019;9(8):4246-4257. <https://doi.org/10.1039/c8ra08187e>
14. Sanz-Horta R., Matesanz A., Gallardo A., Reinecke H., Jorcano J.L., Acedo P., Velasco D., Elvira C. Technological advances in fibrin for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* 2023;14:20417314231190288. <https://doi.org/10.1177/20417314231190288>
15. Jin S.G. Production and application of biomaterials based on polyvinyl alcohol (PVA) as wound dressing. *Chem. Asian. J.* 2022;17:e202200595. <https://doi.org/10.1002/asia.202200595>
16. 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20030636>
17. Micol L.A., Ananta M., Engelhardt E.M., Mudera V.C., Brown R.A., Hubbell J.A., Frey P. High-density collagen gel tubes as a matrix for primary human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2011;32(6):1543-1548. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.028>
18. Levina E.M., Kharitonova M.A., Rovinsky Y.A., Vasiliev J.M. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *J. Cell. Sci.* 2001;114(Pt 23):4335-4341. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.23.4>

References:

1. Suamte L, Tirkey A, Barman J, Jayasekhar Babu P. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*. 2023;1:100011. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>
2. Crosby CO, Stern B, Kalkunte N, Pedahzur S, Ramesh S, Zoldan J. Interpenetrating polymer network hydrogels as bioactive scaffolds for tissue engineering. *Rev Chem Eng*. 2022;38(3):347-361. <https://doi.org/10.1515/revce-2020-0039>
3. Valdoz JC, Johnson BC, Jacobs DJ, Franks NA, Dodson EL, Sanders C, Cribbs CG, Ryal PV. The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12690. <https://doi.org/10.3390/ijms222312690>
4. Matveeva VG, Khanova MU, Antonova LV, Barbarash LS. Fibrin – a promising material for vascular tissue engineering. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2020;22(1):196-208. (In Russian). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-196-208>
5. Park CH, Woo KM. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1064:253-261. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_16
6. Bidault L, Deneufchatel M, Vancaeyzeele C, Fichet O, Larreta-Garde V. Self-supported fibrin-polyvinyl alcohol interpenetrating polymer networks: an easily handled and rehydratable biomaterial. *Biomacromolecules*. 2013;14(11):3870-3879. <https://doi.org/10.1021/bm400991k>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24050436/>
7. Bidault L, Deneufchatel M, Hindié M, Vancaeyzeele C, Fichet O, Larreta-Garde V. Fibrin-based interpenetrating polymer network biomaterials with tunable biodegradability. *Polymer*. 2015;62:19-27. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.02.014>
8. Matveeva VG, Rezvova MA, Glushkova TV, Sergeeva AV, Krivkina EO, Antonova LV, Barbarash LS. Structure and properties of a hydrogel with an interpenetrating polymer network fibrin/polyvinyl alcohol as a modifying coating for small-caliber vessel prostheses. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2023;27(2):74-86. (In Russian). <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2023-2-74-86>
9. Antonova LV, Matveeva VG, Khanova MYu, Barbarash OL, Barbarash LS. Method for the manufacture of autologous fibrin with controlled fibrinogen content without the use of exogenous thrombin. Patent RU №2758260 C1. 27.10.2021 (In Russian). Available at: https://elibrary.ru/download/elibrary_47122803_25649697.PDF. Accessed: 04.11.2024.
10. Blat A, Dybas J, Chrabaszcz K, Bulat K, Jaształ A, Kaczmarek M, Pulyk R, Popiela T, Slowik A, Malek K, Adamski MG, Marzec KM. FTIR, Raman and AFM characterization of the clinically valid biochemical parameters of the thrombi in acute ischemic stroke. *Sci Rep*. 2019;9:15475. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51932-0>
11. Sa'adon S, Ansari MNM, Razak SIA, Anand JS, Nayan NHM, Ismail AE, Khan MUA, Haider A. Preparation and Physicochemical Characterization of a Diclofenac Sodium-Dual Layer Polyvinyl Alcohol Patch. *Polymers*. 2021;13:2459. <https://doi.org/10.3390/polym13152459>
12. Choo K, Ching YC, Chuah CH, Julai S, Liou NS. Preparation and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Chitosan Composite Films Reinforced with Cellulose Nanofiber. *Materials (Basel)*. 2016;9(8):644. <https://doi.org/10.3390/ma9080644>
13. Dattola E, Parrotta EI, Scalise S, Perozziello G, Limongi T, Candeloro P, Coluccio ML, Maletta C, Bruno L, De Angelis MT, Santamaria G, Mollace V, Lamanna E, Fabrizio EDi, Cuda G. Development of 3D PVA scaffolds for cardiac tissue engineering and cell screening applications. *RSC Adv*. 2019;9(8):4246-4257. <https://doi.org/10.1039/c8ra08187e>
14. Sanz-Horta R, Matesanz A, Gallardo A, Reinecke H, Jorcano JL, Acedo P, Velasco D, Elvira C. Technological advances in fibrin for tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2023;14:20417314231190288. <https://doi.org/10.1177/20417314231190288>
15. Jin SG. Production and application of biomaterials based on polyvinyl alcohol (PVA) as wound dressing. *Chem Asian J*. 2022;17:e202200595. <https://doi.org/10.1002/asia.202200595>
16. Mariani E, Lisignoli G, Borzì RM, Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):636. <https://doi.org/10.3390/ijms20030636>
17. Micol LA, Ananta M, Engelhardt EM, Mudera VC, Brown RA, Hubbell JA, Frey P. High-density collagen gel tubes as a matrix for primary human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2011;32(6):1543-1548. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.028>
18. Levina EM, Kharitonova MA, Rovensky YA, Vasiliev JM. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 23):4335-4341. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.23.4335>

Сведения об авторах

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: идея работы, планирование экспериментов, разработка протоколов, обсуждение полученных данных, подготовка первой версии статьи, редактирование рукописи согласно замечаниям.

ORCID: 0000-0002-4146-3373

Резцова Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: идея работы, анализ литературы, планирование экспериментов, обсуждение полученных данных, написание фрагмента статьи.

ORCID: 0000-0002-4405-8904

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Authors

Dr. Vera G. Matveeva, MD, PhD, Senior Researcher Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: research idea, planning of experiments, development of protocols, discussion of the obtained results, writing the first version of the article, editing the manuscript according to the comments of the reviewers.
ORCID: 0000-0002-4146-3373

Mrs. Maria A. Rezvova, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease» (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: research idea, literature analysis, planning of experiments, discussion of the obtained results, writing of the article fragment.
ORCID: 0000-0002-4405-8904

Mrs. Tatyana V. Glushkova, PhD (biology), Senior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease» (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: conducting experiments, analyzing and describing the results.
ORCID: 0000-0003-4890-0393

Mrs. Evgeniya A. Senokosova, PhD (biology), Researcher Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician

Вклад в статью: проведение экспериментов, обработка и описание результатов.

ORCID: 0000-0003-4890-0393

Сенокосова Евгения Андреевна, кандидат биологических наук,, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: проведение экспериментов, обработка и описание результатов.

ORCID: 0000-0002-9430-937X

Ханова Марьям Юрисовна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: проведение экспериментов, обработка и описание результатов.

ORCID: 0000-0002-8826-9244

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: проведение экспериментов, обработка и описание результатов.

ORCID: 0000-0002-2500-2147

Торгунакова Евгения Александровна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: сбор материала, проведение экспериментов, обработка и описание результатов, редактирование рукописи согласно замечаниям.

ORCID: 0009-0005-0683-991X

Антонова Лариса Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», (650002, Россия, Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6).

Вклад в статью: идея работы, редактирование рукописи, утверждение окончательной версии для публикации.

ORCID: 0000-0002-8874-0788

Статья поступила: 10.04.2024 г.

Поступила после доработки: 12.11.2024 г.

Принята в печать: 30.11.2024 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: conducting experiments, analyzing and describing the results.

ORCID: 0000-0002-9430-937X

Mrs. Mariam Yu. Khanova, PhD (biology), Junior Researcher Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: conducting experiments, analyzing and describing the results.

ORCID: 0000-0002-8826-9244

Mrs. Evgeniya O. Krivkina, Junior Researcher Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: conducting experiments, analyzing and describing the results.

ORCID: 0000-0002-2500-2147

Mrs. Evgeniya A. Torgunakova, Junior Researcher Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: collection of material, conducting experiments, analyzing and describing the results, editing the manuscript according to comments.

ORCID: 0009-0005-0683-991X

Prof. Larisa V. Antonova, MD, DSc, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: research idea, editing of the manuscript, approval of the final version for publication

ORCID: 0000-0002-8874-0788

All authors gave final consent for the submission of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work, vouching for their accuracy and integrity.

Received: 10.04.2024

Received in revised form: 12.11.2024

Accepted: 30.11.2024

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.