

© ЕГОРИХИНА М. Н.

УДК: 616-089.844:003.93:57.085.23

DOI: 10.20333/2500136-2018-3-14-23

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

М. Н. Егорихина

Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, Нижний Новгород 603115, Российская Федерация

Резюме. Обзор показывает состояние научных исследований в области использования наиболее востребованных с точки зрения тканевой инженерии и регенеративной медицины компонентов крови в качестве материалов для создания скаффолдов. Проанализированы данные исследований структуры и свойств скаффолдов, активности клеточных процессов, проангиогенного потенциала клеточных матриц обусловленные свойствами различных компонентов крови в их составе. Показана взаимосвязь механических свойств, состава, структуры и активности клеточных процессов в скаффолдах на основе компонентов крови. Рассмотрены механизмы влияющие на регенеративный потенциал скаффолдов обусловленные свойствами различных компонентов крови входящих в их состав.

Ключевые слова: тканевая инженерия, биоматериалы, скаффолды, компоненты крови, клетки, ангиогенез, регенерация.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Егорихина МН. Использование компонентов крови в тканевой инженерии. *Сибирское медицинское обозрение.* 2018;(3): 14-23. DOI: 10.20333/2500136-2018-3-14-23

THE USE OF BLOOD COMPONENTS IN TISSUE ENGINEERING

M. N. Egorikhina

Privolzhsky Federal Research Medical Centre, Nizhny Novgorod 603115, Russian Federation

Abstract. The review shows the state of scientific research in the field of the most demanded components of blood usage as the materials for creating scaffolds from the point of view of tissue engineering and regenerative medicine. The data of studies concerning the structure and properties of scaffolds, the activity of cellular processes, the proangiogenic potential of cell matrices due to the properties of various blood components in their composition are analysed. The interrelation of mechanical properties, composition, structure and activity of cellular processes in scaffolds on the basis of blood components are shown. The mechanisms influencing the regenerative potential of scaffolds due to the properties of various components of blood in their composition are considered.

Key words: tissue engineering, biomaterials, scaffolds, blood components, cells, angiogenesis, regeneration.

Conflict of interest. The author declare the absence of obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

Citation: Egorikhina MN. The use of blood components in tissue engineering. *Siberian Medical Review.* 2018;(3): 14-23. DOI: 10.20333/2500136-2018-3-14-23

Введение

Растущая потребность в разработке новых ткане-замещающих материалов для восстановления поврежденных тканей и органов является одной из наиболее актуальных проблем в современной медицине. Решение этой проблемы лежит в области тканевой инженерии и связано с созданием клеточных матриц (скаффолдов), способных обеспечить достаточную временную механическую поддержку для развития ткани, создать условия для метаболизма клеток, возможности васкуляризации и ремоделирования регенерирующей ткани. К материалам, на основе которых создаются скаффолды, предъявляется ряд требований: биосовместимость, биорезорбируемость, нетоксичность, низкая иммуногенность [1]. Они должны позволять создавать трехмерную пористую структуру, сходную с естественным внеклеточным матриксом, удерживать достаточно большое количество воды для обмена питательными веществами и продуктами жизнедеятельности между клетками, обла-

дать биологической активностью, чтобы обеспечить образование адгезионных комплексов между клетками и внеклеточным матриксом и, таким образом, через интегрины активировать определенные внутриклеточные сигнальные пути, которые, в конечном счете, регулируют развитие ткани [2].

Достаточно широко распространенными и доступными материалами, отвечающими вышеперечисленным требованиям, являются компоненты крови. Они представляет собой уникальный материал с точки зрения тканевой инженерии. В плазме крови есть белки, способные образовывать нановолокнистые полимеры и имеющие активные центры взаимодействия с интегринными клетками, которые остаются доступными и после полимеризации. Плазма крови и обогащенная тромбоцитами плазма содержат множество питательных веществ и факторов роста, наличие которых может обуславливать нормальную жизнедеятельность клеток в структуре скаффолда. Все это создает предпосылки для разработки клеточно-инже-

нерных конструкций на основе компонентов крови с необходимыми физико-механическими и биологическими свойствами. В представленном обзоре рассмотрены вопросы, связанные со свойствами наиболее востребованных компонентов крови с точки зрения тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Фибриноген /фибрин

Фибриноген – белок крови, концентрация которого в плазме у здоровых людей составляет 1,7-4,0 г/л. Фибриноген имеет простые свойства гелеобразования при непосредственном взаимодействии фибриногена и тромбина. Под действием тромбина происходит переход растворимых молекул фибриногена в нерастворимые с образованием полимерной сети в виде геля (сгустка фибрина). Тромбин расщепляет аминотерминальные окончания α - и β -цепочек фибриногена, в результате чего появляются фибрин-мономеры. Они, спонтанно полимеризуясь, формируют протофибриллы фибрина, которые, взаимодействуя друг с другом, образуют нити фибрина, формирующие фибриновую сеть [3]. Последняя имеет нанометрическую волокнистую структуру с высоким отношением площади и объема, имитируя естественный внеклеточный матрикс [4]. Более того, фибриновая сеть, являясь естественной ранозаживляющей матрицей, обеспечивает трехмерный каркас для клеток, их миграцию и адгезию в область раны. Это служит одной из основных предпосылок широкого использования гидрогелей на основе фибрина в качестве клеточных матриц (скаффолдов) для регенерации различных типов ткани.

Известно, что самосборка фибриновых волокон зависит от концентрации фибриногена, тромбина и кальция, а также других белков. При этом формирующаяся фибриллярная сеть может иметь различную плотность и толщину фибрилл. Так, при высоких концентрациях тромбина, образуется плотная сетка из тонких пучков тонких фибриллярных волокон. При уменьшении концентрации тромбина, взаимодействующего с таким же количеством фибриногена, средний размер пучка волокон увеличивается, и фибриновая матрица становится более пористой [5], но при этом толстые волокна имеют меньше боковых ответвлений по сравнению с тонкими [6]. Катионы кальция, подобно тромбину, влияют на структуру фибриллярной сети. Однако к увеличению толщины волокон и размера пор приводит не уменьшение, а увеличение концентрации кальция относительно фибриногена [7]. В ряде исследований показано, что микроструктура фибриновой матрицы оказывает непосредственное влияние на клеточную адгезию, ми-

грацию и пролиферацию [7–9]. При этом увеличение плотности фибриллярной сети, как правило, приводит к снижению активности клеточных процессов.

В то же время, размер волокон и плотность фибриллярной сети фибрина имеют высокую корреляцию с механическими свойствами фибринового сгустка [10], составляющего основу скаффолдов из плазмы крови. Это приводит к проблеме выбора между оптимизацией структуры фибриновой сети для клеток или смещением ее свойств в сторону обеспечения механической прочности скаффолда. Попытки решения данной проблемы часто связаны с введением в состав скаффолдов дополнительных компонентов (глутарового альдегида, гинепина и др.), обеспечивающих стабилизацию структуры и механическую прочность конструкций на основе фибрина путем дополнительной сшивки белков [11, 12]. Использование плазмы крови, а не чистого фибриногена, в качестве материала для фибриновых скаффолдов, в определенной мере позволяет улучшить его механические свойства за счет ее естественных компонентов. Известно, что в плазме крови содержится фактор XIII (XIIIa), который катализирует образование γ -глутамил- ϵ -лизил амидной связи между мономерами фибрина и таким образом стабилизирует его полимеры, повышая прочностные свойства фибриновой матрицы [13]. XIII фактор также используется и при создании скаффолдов из чистого фибриногена [14]. Введение стабилизирующих веществ, улучшающих механические свойства конструкций на основе фибриногена, изменяет микроструктуру фибриновой сети и может также приводить к замедлению роста и пролиферации клеток. В частности, пэгилирование фибриногена приводит к повышению плотности фибриллярной сети и имеет дозозависимый характер. Образующаяся при использовании высоких доз полиэтиленгликоля структура фибриллярной сети замедляет рост, распластывание и образование межклеточных контактов эндотелиальных и стволовых клеток [15]. На основании этих и дополнительных данных о метаболической активности клеток авторы делают вывод о том, что структура фибриллярной сети может изменять васкуляризацию клеточно-инженерных конструкций. Влияние микроструктуры фибрина на ангиогенез подтверждается и рядом других исследований [4, 16]. Еще один вариант повышения механических свойств скаффолдов – это введение в их состав компонентов выполняющих армирующую функцию как без изменения [17], так и с модификацией [18] структуры фибриновых волокон. В качестве примера можно привести работу С. М. Brougham et al. [19], установивших, что усиление

фибрина коллаген-гликозаминогликановой системообразующей структурой приводит к значительному увеличению модулей сжатия и упругости скаффолда по сравнению с фибриновым гелем.

В настоящее время накапливается все больше данных о значительном разнообразии механизмов влияния фибриногена/фибрина на ангиогенез. При этом установлено, что ангиогенный потенциал фибриновой матрицы обусловлен не только ее микроструктурой, но и наличием активных центров взаимодействия в молекуле фибриногена/фибрина с интегринами клеток. Известно, что в фибриногене имеется ряд RGD-последовательностей, взаимодействующих с интегринными рецепторами клеток. Так, RGD-последовательность 572-574 в A α -цепи человеческого фибриногена взаимодействует с α v β 3- α v β 5- и α 5 β 1 интегринами эндотелиальных клеток и играет важную роль в их адгезии, миграции и способности формировать трубчатые структуры в фибриновой матрице [20–22]. Еще один механизм, обеспечивающий ангиогенный потенциал фибрина, связан с одним из продуктов его ферментативного расщепления, которое наблюдается в зонах активного образования новых кровеносных сосудов, – фрагментом E. Показано, что фрагмент E стимулирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток [23].

Достаточно широкий интерес исследователей в области тканевой инженерии вызывает способность фибриновой матрицы выступать в качестве естественного носителя клеточных белковых факторов. Известно, что фибриноген может связывать многие биологически активные белки, такие как фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), тромбоспондин-1 (TSP1), интерлейкин-1(IL1), которые высвобождаются после его полимеризации [24–27]. В работе E. Hadjiraoui et al. [28] показано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и тромбоцитарный фактор (PF4), являющиеся ключевыми про- и антиангиогенными факторами, дифференциально связаны с матрицей фибрина. При этом матрица может осуществлять биохимический контроль ангиогенеза путем уравнивания относительных концентраций и контролируемого массзависимого высвобождения про- и антиангиогенных факторов. Таким образом, способность фибриногена/фибрина связывать и высвобождать белковые факторы может обеспечить долговременную регуляцию клеточных ответов в скаффолде, что является предпосылкой для формирования пространственно-обусловленного ангиогенеза.

Еще одно привлекательное свойство конструкций на основе фибрина – это возможность создания матрицы с контролируемой биодegradацией. Это позволяет адаптировать скаффолд прежде всего с точки зрения функции структурной поддержки в отношении развивающихся тканей. Так, например, скорость деградации фибринового геля можно регулировать путем изменения микроструктуры фибриллярной сети или введением дополнительных агентов, таких как аprotинин и транексамовая кислота (транс-4-аминометилциклогексан-1-карбоновая кислота, tAMCA), что позволяет добиться соответствия этого процесса естественно протекающей регенерации тканей [7, 29].

Фибронектин

Фибронектин – еще один биополимер, достаточно широко используемый при разработке скаффолдов. Интерес к фибронектину, как к перспективному компоненту искусственных клеточно-инженерных конструкций, связан с уникальными функциональными свойствами данного белка, входящего в состав естественных внеклеточных матриц тканей и продуцируемого самими клетками. Фибронектин является наиболее распространенным белком, способным формировать уникальную фибриллярную сеть. В нерастворимой форме он входит в структуру многих тканей, а его растворимая форма содержится в достаточно большем количестве в плазме крови. Фибронектин представляет собой димерный белок, состоящий из двух идентичных полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками у C-концов. Благодаря своей структуре, он способен связывать коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту, углеводы плазматических мембран, гепарин, фермент транслугтаминазу и, соответственно, может выполнять интегрирующую функцию в организации межклеточного вещества [30, 31]. Также известно, что наличие в молекуле фибронектина центров связывания с интегринами клеточных мембран способствует увеличению клеточной адгезии. Одним из основных свойств, обуславливающих включение фибронектина в состав скаффолдов, является потенцирование сигналов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток, а также сигналов, способных обуславливать васкуляризацию скаффолдов.

В литературе накопилось достаточно данных о выраженном влиянии фибронектина, входящего в состав клеточно-инженерных конструкций, на поведение и свойства клеток. Было показано, что иммобилизация фибронектина на синтетических скаффолдах способствует повышению пролиферативной активности гемопоэтических стволовых клеток

CD34+ [32]. Ранее Bourdoulous et al. [33] показали, что разрушение естественной фибронектиновой матрицы на апикальной поверхности клеток без изменения клеточного субстрата адгезии ингибировало миграцию и пролиферативную активность эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs) и фибробластов человека, при этом адгезионные свойства культур оставались без изменений. В то же время следует отметить, что значимого воздействия на жизнеспособность клеток разрушение фибриновой матрицы не оказывало. Подавление миграции клеток наблюдается и при модификации фибронектиновой матрицы. Так, изменение структуры матрицы фибронектина путем формирования дисульфидных сшивок между молекулами с организацией мультимеров относительно высокой молекулярной массы в значительной степени подавляло миграцию клеток [34]. Модификации в фибриллярной структуре фибронектиновой матрицы оказывают значительное влияние на клеточную пролиферацию, что обусловлено изменением регуляторных сигналов, поступающих к клеткам. Обнаружено, что мутантный фибронектин (FNDeltaIII1-7), который содержит все известные клеточные связывающие последовательности, но образует структурно отличающуюся от нормального фибронектина матрицу, тормозит прогрессию клеточного цикла от фазы G0/G1 в фазу S. В то время как матрица из нормального фибронектина стимулирует рост этих же клеток [35]. Один из механизмов действия фибронектина на пролиферативную активность и миграцию клеток реализуется через сигнальные белки Ras. Нарушения фибронектиновой матрицы вызывают реорганизацию цитоскелета путем активации малой Rho-ГТ-Фазы Cdc42, изменяя передачу сигналов фактора роста и прогрессии блоков клеточного цикла. В то же время, активация Rho способствует сборке самой фибронектиновой матрицы на поверхности клеток [33, 36, 37].

В литературе появились данные, свидетельствующие о том, что рассмотрение роли фибронектина в клеточно-инженерных конструкциях не может быть ограничено только его непосредственным влиянием на рост и пролиферативную активность клеток. Так, в работе A. Ramanathan и N. Karugi [38] показано, что концентрация фибронектина положительно коррелирует с начальной скоростью образования фибриновой матрицы и может моделировать ее трехмерную структуру путем регулировки толщины и плотности волокон фибрина, ковалентно и нековалентно связы-

ваясь с фибриновой матрицей с образованием высокомолекулярных мультимеров.

Известно, что благополучная имплантация клеточно-инженерных конструкций во многом связана с последующим успешным развитием ангиогенеза, обеспечивающим доставку питательных веществ и кислорода к клеткам и обуславливая таким образом восстановление тканей. Относительно недавно стали появляться исследования, свидетельствующие о ключевой роли фибронектина в процессе образования сосудов. Так, например, было показано, что дефицит фибронектина у мышей вызывает их гибель во время эмбриогенеза вследствие формирования тяжелых сосудистых дефектов [39]. В последующих работах были изучены основные механизмы, посредством которых фибронектин влияет на ангиогенез. Известно, что фибронектин способен связываться и активировать интегрины $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$, которые играют центральную роль в регуляции внутриклеточных сигналов, обуславливающих в том числе выживаемость клеток, их миграцию и клеточный цикл [40, 41]. При этом домены в молекуле фибронектина, отвечающие за его взаимодействие с этими интегринными недоступны, если молекула фибронектина находится в глобулярном состоянии, и становятся доступны при его полимеризации и организации фибриллярной структуры [42]. Блокирование интегринов $\alpha_5\beta_1$ и $\alpha_v\beta_3$ эндотелиальных клеток антителами предотвращает их взаимодействие с фибронектином, что приводит к подавлению сосудистого морфогенеза. Этот же эффект наблюдается при отсутствии матрицы из полимеризованного фибронектина на поверхности клеток [43]. Фибронектин оказывает непосредственное влияние на активацию эндотелиальных клеток, что приводит к их переходу из состояния покоя в активное состояние, при котором клетки проявляют повышенную миграцию и пролиферацию. Методами математического моделирования показано, что фибронектин влияет на ангиогенез не только путем прямой сигнализации при взаимодействии с интегринными, но и опосредованно через механорегуляцию. Интересно, что при этом фибронектин способен выступать в качестве негативного регулятора ангиогенеза. Механическое растяжение клетками полимеризованного фибронектина может создавать избыточное напряжение фибрилл в структуре фибронектиновой матрицы. Это формирует условия ингибирующие процесс васкуляризации и пролиферацию клеток [44].

Выступая в качестве механотрансдуктора, фибронектин внеклеточного матрикса способен регулировать дифференцировку мезенхимальных стволовых

клеток (MSC) в остеогенном направлении [45]. Остеогенез усиливается, когда $\alpha_v\beta_3$ интегрин блокируется при расслаблении фибронектиновых волокон. Растяжение этих волокон приводит к блокированию $\alpha_5\beta_1$ интегрина или ингибированию сигнализации рецептора эпидермального ростового фактора (EGF) и в результате снижается активность остеогенеза. Авторами высказывается мнение о том, что механорегуляция волокон фибронектина может служить контрольной точкой для регуляции дифференцировки MSC в остеогенном направлении. В связи с этим в области тканевой инженерии появился ряд работ, рассматривающих фибронектин в качестве активного компонента костнозамещающих скаффолдов из синтетических материалов и биокерамики. О возможной роли фибронектина плазмы крови в клеточно-инженерных конструкциях в качестве дополнительного индуктора дифференцировки, который может модулировать их свойства через активность металлопротеиназ (MMPs), сообщалось в обзорном сообщении, посвященном рассмотрению вопросов дифференцировки стволовых клеток в скаффолдах из плазмы крови [46].

По результатам этих работ можно сделать вывод о специализированной роли фибронектина во внеклеточном матриксе. При этом фибронектин способен выступать в качестве регулятора ангиогенеза, механотрансдуктора и непосредственного активатора интегрина клеток и являться элементом управления клеточной миграции, пролиферации и дифференцировки.

Обогащенная тромбоцитами плазма/ лизат тромбоцитов/ тромбоцитарные факторы

Развитие скаффолд-технологий требует разработки не только внеклеточного матрикса как механической поддерживающей структуры, но и обеспечения условий для поддержания определенной активности клеточных процессов и питания клеток на период до наступления полной васкуляризации скаффолда после трансплантации. В связи с этим большое распространение в тканевой инженерии получили тромбоцитарные продукты, такие как обогащенная тромбоцитами плазма (PRP), лизат тромбоцитов (PL) и отдельные факторы, выделенные из тромбоцитов. Это связано с тем, что тромбоциты содержат большое количество разнообразных биологически активных веществ, регулирующих целый ряд клеточных процессов, обуславливающих регенерацию тканей и развитие ангиогенеза [47, 48].

Применение отдельных биологически активных факторов тромбоцитов или «коктейлей» из них

является одним из вариантов функционализации клеточно-инженерных конструкций, позволяющее повысить их биологическую активность. Так, содержащий VEGF биомиметический слой, состоящий из композита гидроксиапатита и коллагена, костнозамещающих скаффолдов характеризовался усилением процессов ангиогенеза и остеогенеза в ишемизированных условиях (*in vivo*) по сравнению со скаффолдами, не нагруженными VEGF [49]. Очень хорошие результаты (*in vivo*) показала клеточно-тканевая конструкция для восстановления больших полостей поражения после пересечения спинного мозга на основе фибрина с «коктейлем» из ростовых факторов, в том числе IGF, bFGF, EGF, PDGF, HGF. В области поражения эта конструкция с высеянными в нее нейральными стволовыми клетками обеспечивала их высокую выживаемость и дифференцировку в клетки глии и нейроны с множественными развитыми аксонами [50]. Введение отдельных факторов в состав скаффолдов может быть хорошим подходом для исследования влияния изменений биофизических свойств внеклеточного матрикса на процессы жизнедеятельности клеток (миграцию, рост, пролиферацию) и выявления механизмов, обуславливающих процессы формирования экзогенной ткани. Однако, несмотря на довольно хорошие результаты использования отдельных факторов роста и их «коктейлей» в тканевой инженерии, следует отметить, что единичные факторы роста не всегда могут обеспечить достаточные условия для нормального роста, пролиферации и направленной дифференцировки клеток, а подбор оптимального композита из отдельных факторов – достаточно сложный и дорогостоящий процесс. Хорошим примером может служить работа по моделированию васкулогенеза *in vitro* в бессывороточных условиях с использованием эндотелиальных клеток и перицитов, помещенных в фибриновый скаффолд. Было показано, что в присутствии «коктейля» из цитокинов, гемопоэтических стволовых клеток и FGF-2, эндотелиальные клетки формировали трубки, что сопровождалось привлечением перицитов на аблюминальную поверхность этих трубок. В то же время при использовании «коктейля» из VEGF и FGF-2 подобного морфогенного ответа не наблюдалось [51].

В связи с вышесказанным, интересны работы, в которых для функционализации синтетических скаффолдов используют выделенные из крови тромбоциты, содержащие комплекс ростовых, про- и ангиогенных факторов, высвобождающихся непосредственно в клеточно-инженерной конструкции. Например, тромбоциты, иммобилизованные на поверхность

нановолокон скаффолда из поликапролактона, способствовали распространению, пролиферации и высокой метаболической активности таких клеток, как фибробласты, кератиноциты и меланоциты [52].

Наибольшее распространение в тканевой инженерии получили продукты из обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP). PRP используют в качестве основного материала и как компонент композита в составе скаффолдов [53, 54]. Скаффолды с использованием PRP разрабатываются для различных областей медицины: стоматологии, кардиохирургии, офтальмологии, травматологии и ортопедии. Популярность PRP обусловлена прежде всего ее составом и свойствами. Она содержит все плазменные компоненты, включая фибриноген, фибронектин, фактор XIII, которые позволяют формировать биологически активную клеточную матрицу и обеспечивать питание клеток. В составе PRP имеются тромбоциты, снабжающие скаффолд различными факторами, высвобождаемыми при полимеризации и повышающими регенеративный и ангиогенный потенциал клеточно-инженерной конструкции [55].

Однако, несмотря на исследования *in vitro* и положительные теоретические обоснования, использование PRP *in vivo* может привести не только к отсутствию положительного эффекта, но иногда даже к отрицательному влиянию на процесс регенерации ткани. Так, например, было показано, что при имплантации коллаген-гидроксиапатитного скаффолда, нагруженного аутологичной PRP, у овец с смоделированным остеохондральным поражением бедренного мышечка наблюдалась неполная регенерация кости и формирование высокоаморфной хрящевой ткани со слабой пространственной организацией. При этом у овец с таким же скаффолдом, но без PRP регенерация костной ткани и реконструкция поверхности хряща были значительно лучше [56]. Причины подобных расхождений в теоретических предпосылках, результатах *in vitro* и *in vivo* пока не ясны. Есть мнение, что отчасти они могут быть связаны с использованием различных методов приготовления и обработки PRP, а так же значительной изменчивостью качества PRP среди доноров.

Один из путей решения возникающей проблемы стандартизации – это использование лизата пула тромбоцитов, выделенных из PRP нескольких доноров. Так, *in vivo* показана возможность использования гидрогеля на основе лизата тромбоцитов, полученного из PRP нескольких доноров, в качестве носителя для доставки клеток в участки поврежденных тканей, обладающего высоким ангиогенным потенциалом.

Последний, по мнению авторов, связан с кинетикой высвобождения факторов роста, определяемой микроструктурой скаффолда из PRP, отличной от микроструктуры простого фибринового скаффолда [57]. Также лизат пула тромбоцитов от нескольких доноров достаточно широко используют в композиции с другими материалами для повышения их биологической активности. Например, покрытие гидроксиапатитных трикальциево-фосфатных скаффолдов факторами роста лизата тромбоцитов индуцировало продуцирование и секрецию проангиогенных белков (плацентарного фактора роста и сосудистого эндотелиального фактора роста) MSC. Эти белки обеспечивали пролиферацию и специфическую миграцию эндотелиальных клеток *in vitro*, улучшая тем самым неоваскуляризацию и формирование новой костной ткани *in vivo* [58]. Полисахаридный полиуретан-полидиметилсилоксано-фибриновый скаффолд, нагруженный лизатом тромбоцитов *in vitro*, обеспечивал рост клеток, сопоставимый с тем, который наблюдался при добавлении лизата тромбоцитов в культуральную среду. Это, по мнению авторов, было связано с замедленным высвобождением факторов роста из скаффолда. Этот же скаффолд *in vivo* ускорял заживление глубоких обширных кожных раневых дефектов, смоделированных на мышцах [59].

Таким образом, лизат тромбоцитов представляется перспективным продуктом, способным обеспечить рост, пролиферацию и дифференцировку клеток в составе скаффолдов, а также увеличить проангиогенный потенциал клеточно-инженерных конструкций. В то же время для минимизации расхождений между результатами доклинических исследований и последующим клиническим результатом необходимо выработать методы стандартизации как в отношении исходного материала (PRP), так и конечного продукта (лизата тромбоцитов).

Заключение

Интерес к материалам, полученным из крови, связан с их уникальными свойствами. Сама плазма крови и ее продукты содержат белки, способные обеспечивать рост, пролиферацию и дифференцировку клеток входящих в состав биоинженерной конструкции или мигрирующих в нее из окружающих тканей путем активации различных механизмов клеточной сигнализации. Создаются клеточно-инженерные конструкции на основе бестромбоцитарной и обогащенной тромбоцитами плазмы крови (PRP) путем полимеризации ее компонентов агентами природного происхождения. Также широко в качестве материала для скаффолдов используются отдельные белки,

выделенные из крови, или их комплексы, полученные, как правило, путем лиофилизации. В этом случае формирование клеточных матриц может быть основано на применении таких методик, как электро-спиннинг [11], криогелеобразование [60] и др., позволяющих создавать пористые материалы на основе компонентов крови с сохранением их биологической активности. Внеклеточные матрицы, получаемые из компонентов крови, обладают высокой степенью гидратированности, пористостью и микроволокнистой структурой, что дает возможность обеспечить высокую площадь поверхности для прикрепления клеток и условия для поддержания их жизнеспособности, миграции и пролиферации, а так же индукции ангиогенеза скаффолда. Большой интерес в тканевой инженерии вызывают тромбоцитарные продукты. Это связано с высоким содержанием в них комплекса биологически активных веществ, способных обуславливать целый ряд клеточных процессов, а также обладающих проангиогенным потенциалом. Материалы на основе компонентов крови имеют высокую биологическую активность, что в конечном счете обуславливает регенеративный потенциал скаффолдов при имплантации в поврежденные ткани. Таким образом, компоненты крови, в частности плазма крови, обогащенная тромбоцитами плазма крови, отдельные белки, тромбоциты, лизат тромбоцитов и факторы роста являются перспективными и востребованными материалами в тканевой инженерии.

Литература / References

1. Ларионов ПМ, Садовой МА, Самохин АГ, Рожнова ОМ, Гусев АФ, Принц ВЯ, Селезнев ВА, Голод СВ, Принц АВ, Корнеев ИА, Комонов АИ, Мамонова ЕВ, Малютина ЮН, Батаев ВА. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии. *Хирургия позвоночника*. 2014;(3):77-85. [Larionov PM, Sadovoy MA, Samokhin AG, Rozhnova OM, Gusev AF, Prints VYa, Seleznev VA, Golod SV, Prints AV, Korneev IA, Komonov AI, Mamonova EV, Malyutina YuN, Bataev VA. Creation of tissue-engineered living bone equivalent and prospects for its application in traumatology and orthopaedics. *Journal of Spine Surgery*. 2014;(3):77-85. (In Russian)]
2. Николаева ЕД. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии. *Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология*. 2014;7(2):222-233. [Nikolaeva ED. Biopolymers for Tissue Engineering. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2014;7(2):222-233. (in Russian)]
3. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(8):1894-1904. DOI:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x
4. Barsotti MC, Magera A, Armani C, Chiellini F, Felice F, Dinucci D, Piras AM, Minnocci A, Solaro R, Soldani G, Balbarini A, Stefano R. Di. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell Proliferation*. 2011;44(1):33-48. DOI:10.1111/j.1365-2184.2010.00715.x
5. Blombäck B, Bark N. Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophysical Chemistry*. 2004;112(2-3):147-51. DOI:10.1016/j.bpc.2004.07.013
6. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 2013;121(10):1712-9. DOI:10.1182/blood-2012-09-306639
7. Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-Pour Z, Vojdani Z, Sani M, Latifi M, Talaei-Khozani T. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 2017;(71):372-380. DOI:10.1016/j.msec.2016.10.001
8. Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Engineering*. 2006;12(6):1587-95. DOI:10.1089/ten.2006.12.1587
9. Rowe SL, Lee S, Stegemann JP. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(1):59-67. DOI:10.1016/j.actbio.2006.08.006
10. Brown AE, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel JW. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science*. 2009;325(5941):741-4. DOI:10.1126/science.1172484
11. Kuhn AI, Müller M, Knigge S, Glasmacher B. Novel blood protein based scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Current Directions in Biomedical Engineering*. 2016;2(1):5-9. DOI:10.1515/cdbme-2016-0005
12. Sell SA, Francis MP, Garg K, McClure MJ, Simpson DG, Bowlin GL. Cross-linking methods of electrospun fibrinogen scaffolds for tissue engineering applications. *Biomedical Materials*. 2008;3(4):45001. DOI:10.1088/1748-6041/3/4/045001
13. Falvo MR, Gorkun OV, Lord ST. The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophysical Chemistry*. 2010;152(1-3):15-20. DOI:10.1016/j.bpc.2010.08.009
14. Thomson KS, Dupras SK, Murry CE, Scatena M, Regnier M. Proangiogenic microtemplated fibrin scaffold

folds containing aprotinin promote improved wound healing responses. *Angiogenesis*. 2014;17(1):195-205. DOI:10.1007/s10456-013-9388-z

15. Шпичка АИ, Королева АВ, Дайвик А, Тимашев ПС, Семенова ЕФ, Моисеева ИЯ, Коноплянников МА, Чичков БН. Оценка васкулогенного потенциала гидрогелей на основе модифицированного фибрина. *Цитология*. 2016;58(10):785–91. [Shpichka AI, Koroleva AV, Dajwik A, Timashev PS, Semenova EF, Moiseeva IYa, Konoplyannikov MA, Chichkov BN. Evaluation of the vasculogenic potential of modified fibrin hydrogel. *Tsitologiya*. 2016;58(10):785–91. (in Russian)]

16. Chung E, Rytlewski JA, Merchant AG, Dhada KS, Lewis EW, Suggs LJ. Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*. 2015;(17):78-88. DOI:10.1016/j.actbio.2015.01.012

17. Rowe SL, Stegemann JP. Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules*. 2006;7(11):2942-8. DOI:10.1021/bm0602233

18. Vogel S, Arnoldini S, Möller S, Schnabelrauch M, Hempel U. Sulfated hyaluronan alters fibronectin matrix assembly and promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Scientific Reports*. 2016;(6):36418. DOI:10.1038/srep36418

19. Brougham CM, Levingstone TJ, Jockenhoevel S, Flanagan TC, O'Brien FJ. Incorporation of fibrin into a collagen-glycosaminoglycan matrix results in a scaffold with improved mechanical properties and enhanced capacity to resist cell-mediated contraction. *Acta Biomaterialia*. 2015;(26):205-214. DOI:10.1016/j.actbio.2015.08.022

20. Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresch DA. Transient functional expression of alpha v beta 3 on vascular cells during wound repair. *The American Journal of Pathology*. 1996;148(5):1407-21.

21. Kaijzel EL, Koolwijk P, van Erck MG, van Hinsbergh VW, de Maat MP. Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(9):1975-1981. DOI:10.1111/j.1538-7836.2006.02081.x

22. Laurens N, Engelse MA, Jungerius C, Löwik CW, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Single and combined effects of alphavbeta3- and alpha5beta1-integrins on capillary tube formation in a human fibrin matrix. *Angiogenesis*. 2009;12(3):275-85. DOI:10.1007/s10456-009-9150-8

23. Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Thompson WD, Stirr CM, Lewis CE. Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human

microvascular endothelial cells in vitro. *Angiogenesis*. 2001;4(4):269-75. DOI:10.1023/A:1016076121918

24. Sahni A, Guo M, Sahni SK, Francis CW. Interleukin-1 β but not IL-1 α binds to fibrinogen and fibrin and has enhanced activity in the bound form. *Blood*. 2004;104(2):409-14. DOI:10.1182/blood-2004-01-0126

25. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):4563-8. DOI:10.1073/pnas.1221602110

26. Briganti E, Spiller D, Mirtelli C, Kull S, Counoupas C, Losi P, Senesi S, Di Stefano R, Soldani G. A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenic growth factors. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. 2010;142(1):14-21. DOI:10.1016/j.jconrel.2009.09.029

27. Panetti TS, Kudryk BJ, Mosher DF. Interaction of recombinant procollagen and properdin modules of thrombospondin-1 with heparin and fibrinogen/fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(1):430-7. DOI:10.1074/jbc.274.1.430

28. Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P, Bauer AT, Kuekrek H, Mirzoyan L, Hummel A, Kirchhoff K, Salgin B, Isenburg S, Dornseifer U, Ninkovic M, Machens HG, Schilling AF. The fibrin matrix regulates angiogenic responses within the hemostatic microenvironment through biochemical control. *Public Library of Science One*. 2015;10(8):e0135618. DOI:10.1371/journal.pone.0135618

29. Jockenhoevel S, Flanagan TC. Cardiovascular tissue engineering based on fibrin-gel-scaffolds. In: *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*. Slavka Krautzeka: InTech; 2011:35-48.

30. Кузнецова ДС, Тимашев ПС, Баграташвили ВН, Загайнова ЕВ. Костные импланты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2014;6(4)201–212. [Kuznetsova DS, Timashev PS, Bagratashvili VN, Zagaynova EV. Scaffold- and cell system-based bone grafts in tissue engineering (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2014;6(4)201–212. (in Russian)]

31. Биохимия. Под ред. Северина Е.С. М: ГЭОТАР-Медиа; 2003:715 с. [Biochemistry. Severina ES, editor. Moscow: GEOTAR-Media; 2003:715 p. (in Russian)]

32. Feng Q, Chai C, Jiang XS, Leong KW, Mao HQ. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. 2006;78(4):781-91. DOI:10.1002/jbm.a.30829

33. Bourdoulous S, Orend G, MacKenna DA, Pasqualini R, Ruoslahti E. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology*. 1998;143(1):267-76. DOI:10.1083/jcb.143.1.267
34. Morla A, Zhang Z, Ruoslahti E. Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin. *Nature*. 1994;367(6459):193-196. DOI:10.1038/367193a0
35. Sechler JL, Schwarzbauer JE. Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(40):25533-6.
36. Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of Cell Biology*. 1996;133(6):1403-15.
37. Zhang Q, Magnusson MK, Mosher DF. Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction. *Molecular Biology of the Cell*. 1997;8(8):1415-25. DOI:10.1091/mbc.8.8.1415
38. Ramanathan A, Karuri N. Fibronectin alters the rate of formation and structure of the fibrin matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;443(2):395-9. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.11.090
39. George EL, Baldwin HS, Hynes RO. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood*. 1997;90(8):3073-81
40. Caiado F, Carvalho T, Silva F, Castro C, Clode N, Dye JF, Dias S. The role of fibrin E on the modulation of endothelial progenitors adhesion, differentiation and angiogenic growth factor production and the promotion of wound healing. *Biomaterials*. 2011;32(29):7096-105. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.06.022
41. Foolen J, Shiu JY, Mitsi M, Zhang Y, Chen CS, Vogel V. Full-length fibronectin drives fibroblast accumulation at the surface of collagen microtissues during cell-induced tissue morphogenesis. *Public Library of Science One*. 2016;11(8):e0160369. DOI:10.1371/journal.pone.0160369
42. Moulisová V, Gonzalez-García C, Cantini M, Rodrigo-Navarro A, Weaver J, Costell M, Sabater I Serra R, Dalby MJ, García AJ, Salmerón-Sánchez M. Engineered microenvironments for synergistic VEGF – Integrin signaling during vascularization. *Biomaterials*. 2017;(126):61-74. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.02.024
43. Hielscher A, Ellis K, Qiu C, Porterfield J, Gerecht S. Fibronectin deposition participates in extracellular matrix assembly and vascular morphogenesis. *Public Library of Science One*. 2016;11(1):e0147600. DOI:10.1371/journal.pone.0147600
44. Vogel V, Baneyx G. The tissue engineering puzzle: a molecular perspective. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2003;(5):441-63. DOI:10.1146/annurev.bio-eng.5.040202.121615
45. Li B, Moshfegh C, Lin Z, Albuschies J, Vogel V. Mesenchymal Stem Cells Exploit Extracellular Matrix as Mechanotransducer. *Scientific Reports*. 2013;(3):2425. DOI:10.1038/srep02425
46. Moroz A, Felisbino SL, Deffune E. Platelet and plasma bioactive scaffolds for stem cell differentiation: What are we missing? *Platelets*. 2014;25(7):556-7. DOI:10.3109/09537104.2013.836748
47. Сергеева НС, Шанский ЯД, Свиридова ИК, Кирсанова ВА, Ахмедова СА, Кувшинова ЕА, Мейснер ИС. Биологические эффекты тромбоцитарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека. *Гены и клетки*. 2014;9(1):77-85. [Sergeeva NS, Shanskij YAD, Sviridova IK, Kirsanova VA, Ahmedova SA, Kuvshinova EA, Mejsner IS. Biological effects of platelet lysate added to cultural medium of human cells. *Genes and Cells*. 2014;9(1):77-85. (in Russian)]
48. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76:371-387. DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
49. Li B, Wang H, Zhou G, Zhang J, Su X, Huang Z, Li Q, Wu Z, Qiu G. VEGF-loaded biomimetic scaffolds: a promising approach to improve angiogenesis and osteogenesis in an ischemic environment. *RSC Advances*. 2017;7(8):4253-9. DOI:10.1039/C6RA25294J
50. Lu P, Graham L, Wang Y, Wu D, Tuszyński M. Promotion of survival and differentiation of neural stem cells with fibrin and growth factor cocktails after severe spinal cord injury. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2014;(89):e50641. DOI:10.3791/50641
51. Smith AO, Bowers SLK, Stratman AN, Davis GE. Hematopoietic stem cell cytokines and fibroblast growth factor-2 stimulate human endothelial cell-pericyte tube co-assembly in 3D fibrin matrices under serum-free defined conditions. *Public Library of Science One*. 2013;8(12):e85147. DOI:10.1371/journal.pone.0085147
52. Vocetkova K, Buzgo M, Sovkova V, Bezdekova D, Кнеппо Р, Аmler E. Nanofibrous polycaprolactone scaffolds with adhered platelets stimulate proliferation of skin cells. *Cell Proliferation*. 2016;49(5):568-578. DOI:10.1111/cpr.12276
53. Болдырева ОВ, Вахрушев СГ, Торопова ЛА. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в медицинской практике. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;(5). Ссылка активна на 09.11.2017. [Boldyreva OV, Vahrushev SG, Toropova LA. The use of

platelet-rich plasma in medical practice. *Modern Problems of Science and Education*. 2016;(5). Accessed November 9, 2017. (in Russian)] <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25196>

54. Оболенский ВН, Ермолова ДА. Применение тромбоцитарных факторов роста и коллагеновых био-препаратов в лечении больных с хроническими трофическими язвами различной этиологии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2012;(5):42–47. [Obolenskij VN, Ermolova DA. The use of thrombocytic growth factors and collagen-containing substances in treatment of the chronic wounds of various etiology. *Journal Surgery named after N.I. Pirogov*. 2012;(5):42–47. (in Russian)]

55. Wang P, Qu Y, Man Y. Platelet-rich plasma as a scaffold for injectable soft-tissue augmentation. *Cytotherapy*. 2010;12(5):701-2. DOI: 10.3109/14653249.2010.487901

56. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, Martin I, Marcacci M. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2010;11:220. DOI:10.1186/1471-2474-11-220

57. Robinson ST, Douglas AM, Chadid T, Kuo K, Rajabalan A, Li H, Copland IB, Barker TH, Galipeau J, Brewster LP. A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization. *Acta Biomaterialia*. 2016;36:86-98. DOI:10.1016/j.actbio.2016.03.002

58. Leotot J, Coquelin L, Bodivit G, Bierling P, Hernigou P, Rouard H, Chevallier N. Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(5):6630-40. DOI:10.1016/j.actbio.2013.02.003

59. Losi P, Briganti E, Sanguinetti E, Burchielli S, Al Kayal T, Soldani G. Healing effect of a fibrin-based scaffold loaded with platelet lysate in full-thickness skin wounds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2015;30(2):222-37. DOI:10.1177/0883911514568436

60. Elowsson L, Kirsebom H, Carmignac V, Mattiasson B, Durbeej M. Evaluation of macroporous blood and plasma scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials Science*. 2013;1(4):402-10. DOI:10.1039/c2bm00054g

Сведения об авторах

Егорихина Марфа Николаевна, к.б.н., старший научный сотрудник, Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр; адрес: Российская Федерация, 603115, г. Нижний Новгород, ул. Верхне-Волжская набережная, д.18; тел.: +7(831)4192127; e-mail: egorihina@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Author information

Marfa N. Egorihina, Cand. Biol. Sci., Senior Researcher, Privolzhsky Federal Research Medical Centre; Address: 18, Verhne-Voljskaya naberejnaya Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation 603115; Phone: +7(831)4192127; e-mail: egorihina@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Поступила 30.08.2017 г.
Принята к печати 05.04.2018 г.

Received 30 August 2017
Accepted 05 April 2018