

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.089.61+57.089.67+ 616-77

Клабуков И.Д.¹, Балясин М.В.¹, Люндуп А.В.¹, Крашенинников М.Е.¹, Титов А.С.^{1,2},
Мудряк Д.Л.¹, Шепелев А.Д.³, Тенчурин Т.Х.³, Чвалун С.Н.³, Дюжева Т.Г.¹

Ангиогенная витализация биосовместимого и биodeградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*)

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Институт регенеративной медицины, 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр.2

² Городская клиническая больница № 67 ДЗМ, 123423, г. Москва, Россия, ул. Саляма Адила, д. 2/44

³ НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, Россия, пл. Академика Курчатова, д. 1

Цель исследования — оценка влияния на ангиогенез конструкций из волокнистого поликапролактона, модифицированного плазмидой с геном сосудистого фактора роста, при имплантации крысам. **Методика.** Эксперименты выполнены на 24 крысах-самках Вистар в возрасте 2 мес, массой 180—200 г. В работе исследовали плоские каркасы размером 1 см X 1 см, полученные методом эмульсионного электроспиннинга из раствора поликапролактона. Материал каркасов витализировали плазмидой VEGF-165 (геннотерапевтический препарат Неоваскулген), введенной внутрь двух типов волокнистых материалов в разных концентрациях: низкой — 0,005 мг/мл, и высокой — 0,05 мг/мл. Образец и контроль (материал без витализации) одномоментно имплантировали подкожно в два сформированных симметричных кармана в межлопаточной зоне. Окружающие каркас ткани на 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сутки извлекали, проводили гистологическое исследование: изучали тканевую реакцию с морфометрической оценкой плотности распределения и диаметра сосудов в области имплантации, а также оценивали степень биодеградации волокнистого материала. **Результаты.** Признаков тканевой реакции отторжения при имплантации как контрольного, так и модифицированного материала не выявлено. Показано, что при экспозиции материала *in vivo* наряду с резорбцией материала происходят изменения количества и диаметра сосудов. Выявлен дозозависимый эффект стимуляции ангиогенеза при увеличении концентрации Неоваскулгена в образцах. Для витализированных материалов отмечено увеличение плотности распределения сосудов на 46% (высокая концентрация, 33-и сут) по сравнению с контролем. После прекращения воздействия препарата, плотность распределения сосудов приближалась к значениям в контроле. **Заключение.** Разработанная методика витализации полимерных каркасов с внесением раствора геннотерапевтического препарата Неоваскулген внутрь микроволокон обеспечивает пролонгированный и дозозависимый эффект на рост сосудов в зоне имплантации.

Ключевые слова: ангиогенез; биосовместимые материалы; васкуляризация; витализация; ген-активированный материал; Неоваскулген; поликапролактон; тканевая инженерия; электроспиннинг; функционализация биоматериала.

Для цитирования: Клабуков И.Д., Балясин М.В., Люндуп А.В., Крашенинников М.Е., Титов А.С., Мудряк Д.Л., Шепелев А.Д., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Дюжева Т.Г. Ангиогенная витализация биосовместимого и биodeградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 53—60.
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.53-60

Финансирование. Работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии №14.604.21.0133 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0133).

Для корреспонденции: Клабуков Илья Дмитриевич, науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий, e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам лаборатории экспериментальной морфологии (зав. — д.м.н., проф. Шехтер А.Б.) Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и лаборатории патологической анатомии (зав. — к.м.н. Калинин Д.В.) Института хирургии им. Вишневского за участие и помощь в проведении исследования.

Поступила 28.11.2017

Klabukov I.D.¹, Balyasin M.V.¹, Lyundup A.V.¹, Krashennnikov M.E.¹, Titov A.S.²,
Mudryak D.L.¹, Shepelev A.D.³, Tenchurin T.Kh.³, Chvalun S.N.³, Dyuzheva T.G.¹

Angiogenic vitalization of biocompatible and biodegradable scaffold (*in vivo* experimental study)

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Trubetskaya Str., 8-2, Moscow 119991, Russia

² Municipal Clinical Hospital #67, Salyama Adilya Str. 2/44, 123423 Moscow, Russia

³ National Research Center «Kurchatov Institute», Ploshchad Akademika Kurchatova 1, Moscow 123182, Russia

The aim of the study was to evaluate the effect on angiogenesis of a biocompatible, biodegradable material-derived scaffold implanted into rats and functionalized using a plasmid with a vascular growth factor gene. **Methods.** Experiments were performed on 24 female Wistar rats aged 2 months weighing 180—200 g. We investigated 1 cm x 1 cm flat scaffolds obtained by electrospinning from polycaprolactone functionalized scaffolds with a VEGF-165 plasmid (gene therapy drug, Neovasculgen) incorporated inside the fibers at two concentrations, low (0.005 mg/ml) and high (0.05 mg/ml). The sample and control were simultaneously implanted subcutaneously into two formed symmetrical pockets in the interblade zone. At 7, 16, 33, 46, and 64 days, the scaffolds were removed, and histological examination was performed; the tissue reaction was studied including morphometric evaluation of density and diameter of blood vessels in the implantation area, and the area of the image occupied by the material was measured. **Results.** Tissue rejection was absent after implantation of either control or modified material. When the material was exposed *in vivo*, besides resorption of the material, blood vessel number and diameter changed. As the Neovasculgen concentration in samples increased, a dose-dependent effect of angiogenesis stimulation became evident. Vascular density was increased by 46% (high concentration, 33 days) in functionalized matrices compared to the control. After cessation of the drug treatment, the vascular density approached the control values. **Conclusion.** The developed technique for functionalizing polymeric scaffolds by administration of a solution of the gene therapy drug, Neovasculgen, into microfibers provides a prolonged and dose-dependent effect on growth of blood vessels in the implantation zone.

Keywords: angiogenesis, biocompatible materials, biomaterial functionalization, electrospinning, gene-activated scaffold, Neovasculgen, polycaprolactone, tissue engineering, vascularization, vitalization.

For citation: Klabukov I.D., Balyasin M.V., Lyundup A.V., Krashennnikov M.E., Titov A.S., Mudryak D.L., Shepelev A.D., Tenchurin T.Kh., Chvalun S.N., Dyuzheva T.G. Angiogenic vitalization of biocompatible and biodegradable scaffold (*in vivo* experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 53—60. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.53-60

For correspondence: Klabukov Ilya Dmitrievich, researcher of Advanced Cell Technologies Dept., Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The work was supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation. (grant No. 14.604.21.0133, ID RFMEFI60414X0133).

Information about authors:

Klabukov I.D., <https://orcid.org/0000-0002-2888-7999>

Balyasin M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3097-344X>

Lyundup A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

Krashennnikov M.E., <https://orcid.org/0000-0002-3574-4013>

Titov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6794-8240>

Mudryak D.L., <https://orcid.org/0000-0002-6570-3909>

Shepelev A.D., <https://orcid.org/0000-0003-1997-967X>

Tenchurin T.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-1000-6003>

Chvalun S.N., <https://orcid.org/0000-0001-9405-4509>

Dyuzheva T.G., <https://orcid.org/0000-0003-0573-7573>

Received 28.11.2017

Введение

Недостаточная васкуляризация зоны имплантации искусственных материалов — одна из важнейших причин развития ишемии, фиброза, бактериального инфицирования и некроза тканей вокруг трансплантата [1]. С целью предотвращения нежелательных последствий и стимулирования нормального роста тканей применяется активация зоны имплантации биологически активными соединениями (БАС). Проблема целевой доставки таких молекул является одной из ключевых проблем современной прецензионной медицины, решением которой служит разработка специальных на принципах клеточной хемо- и механорецепции. Одним из вариантов пролонгации действия препаратов является биологическая активация трансплантата, изготовленного из нативных или искусственных материалов [3].

Ангиогенная витализация — модификация естественного или искусственного материала с целью стимулирования роста сосудов в зоне имплантации, предотвращения развития послеоперационных осложнений и обеспечения миграции клеток в соответствующие ниши, например, при имплантации ген-активированных материалов или витализированных тканеинженерных конструкций [4]. Ранее было показано, что использование белковых факторов роста (bFGF, EGF, VEGF, PDGF и др.) при местном введении, осаждении на поверхности материала или размещении в объеме биодеградируемого материала способствует росту сосудов в зоне имплантации [5]. При этом подчеркиваются преимущества пролонгированного высвобождения БАС из структуры полимера по сравнению с местным введением или абсорбцией на поверхности материала [6, 7].

В качестве материалов-носителей БАС используются гидрогели, поликапролактон (ПКЛ), полимолочная кислота [5], и другие полимеры и сополимеры. Выбор материала для модификации имеет значение из-за различий в биосовместимости и сроках биодеградации, что оказывает влияние на сроки и темпы выхода БАС из структуры материала при имплантации.

Использование белковых молекул имеет ряд недостатков, таких как видоспецифичность и иммуногенность [8], поэтому использование соединений на основе неиммуногенных молекул (например, нуклеиновых кислот) является перспективным направлением модификации биосовместимых имплантов. Например, генотерапевтический препарат на основе плазмиды VEGF165 используется для стимулирования терапевтического ангиогенеза при ишемии нижних конечностей.

Биологическая стимуляция роста сосудов, использованная в настоящей работе, основана на спонтанной трансфекции плазмид в клетки. В литературе обсуждаются возможные молекулярные механизмы проникновения в клетки плазмидных конструкций, несущих ген ангиогенного фактора VEGF [9]. Плазида с встроенным терапевтическим геном преодолевает плазматическую мембрану клетки посредством эндцитоза или гидропорации, и не вызывает иммунологической реакции. Ранее были известны способы активации поверхности материала плазмидой VEGF [10], но работ по внедрению плазмид в структуру материала с целью их пролонгированного высвобождения известно не было.

Цель исследования — оценка влияния на ангиогенез конструкций из волокнистого поликапролактона, витализированного плазмидой с геном сосудистого фактора роста, при имплантации крысам.

Методика

Биосовместимый материал. Конструкции размером 1 см × 1 см и толщиной 500 ± 15 мкм изготовлены из волокнистого поликапролактона (ПКЛ) в НИЦ «Курчатовский институт» методом эмульсионного электроформования. Диаметр полученных волокон составлял 2—3 мкм. Материалы из ПКЛ относят к биосовместимым [11] и биорезорбируемым [12, 13]. В процессе электроформования по разработанной нами методике в волокнистые материалы были внедрены образцы препарата «Неоваскулген» (НВГ) в двух концентрациях: низкой (НКп) — 0,005 мг/мл, и высокой (ВКп) — 0,05 мг/мл. Ранее по данной методике нами были получены конструкции из ПКЛ, содержащие белковый эпидермальный фактор роста [11]. Препарат НВГ представляет собой ДНК-плазмиду pl-VEGF165 (регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ЛП-000671 от 28.09.2011). В качестве контроля использовалась имплантация конструкций без НВГ.

Животные. Опыты выполнены на 24 крысах-самках Вистар исходной массой 180—200 г в возрасте 2 мес. из питомника «Андреевка» НИЦ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (пос. Светлые Горы, МО) и содержащихся в Центральном виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима.

Этическая экспертиза. Содержание животных и манипуляции с ними проводили в соответствии с требованиями законодательства об этике проведения экспериментальных исследований на животных, одобренными Локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением утвержденных Европейской конвенцией правил биоэтики о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом МЗ РФ № 708 от 23.08.2010 г.

Под анестезией с помощью ветеринарных препаратов «Золетил 100» (Virbac, Франция) и «Рометар» (Bioveta, Чехия) в стерильных условиях производили рассечение кожи в межлопаточной области крыс с последующим внедрением и фиксацией каркасов в подкожную клетчатку, после чего операционную рану зашивали наглухо. В сроки на 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сут. животных декапитировали под хлороформным наркозом. Окружающие каркас ткани извлекали, фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина, подвергали стандартной обработке для последующего морфологического исследования.

Морфологические исследования. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм изготавливали на микротоме Microm HM 355s (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином. Оцифрованные изображения срезов высокого разрешения получали при помощи сканирующей системы Pannoramic DESK (3DHitech Ltd., Венгрия).

Биосовместимость. Ранее нами было показано отсутствие цитотоксичности волокнистого ПКЛ без витализации *in vitro* [11]. Биосовместимость материала оценивали на окрашенных гематоксилин-эозином образцах: качественно оценивали количество иммунных клеток в области имплантации материала, токсичность определяли по количеству нейтрофилов. Деструкцию материала оценивали по изменению количества макрофагов и гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) в образце.

Биодеградируемость. Поскольку волокнистый материал растворялся при пробоподготовке образцов,

то степень резорбции материала ($A_m/A_{общ}$) подсчитывали косвенно, как отношение площади материала (белые области) к общей площади поля зрения. Параметры определяли в области имплантации при увеличении $\times 10$ в программе Pannoramic Viewer.

Ангиогенез. Плотность распределения и долю крупных сосудов в области резорбции имплантированного материала подсчитывали вручную слепым методом совместно с сотрудниками лаборатории экспериментальной морфологии Первого МГМУ им. Сеченова. Плотность сосудов оценивали на микрофотографиях как количество сосудов на 1 мм^2 зоны наблюдения. Крупными считали сосуды диаметром более 15 мкм. Количество и размер сосудов подсчитывали в 5 полях зрения диаметром 600 мкм каждое в программе Pannoramic Viewer v.1.15.4.

Статистика. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Выборки проверяли на нормальное распределение по критерию Шапиро—Уилка, после чего выявляли влияние исследуемого препарата на количество сосудов методом однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с апостериорным анализом Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты и обсуждение

Биосовместимость материала. Морфологическое изучение гистологических препаратов экспериментального материала показало отсутствие на всех сроках признаков инфильтрации иммунными клетками, а именно наличия нейтрофилов, лимфоцитов и плазмоцитов. Отмечено присутствие в ткани гигантских многоядерных клеток инородных тел. Отсутствие воспалительной реакции и признаков отторжения материала свидетельствует о минимальной цитотоксичности материала в условиях *in vivo*.

Биодеградируемость материала. Отмечалось постепенное уменьшение видимого материала вследствие его фрагментации и резорбции в зонах сосудистого роста. Если на 7-е сут. материал составлял 40% видимой зоны, то на 64-е сут. его доля снизилась до 15% (рис. 1).

Ангиогенез (размеры и плотность распределения сосудов). Проведено исследование образцов (тканевый лоскут с частично деградировавшим имплантированным каркасом) на сроках 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сут. Гистологическая картина по срокам изменений в образцах представлена на рис. 2 и 3.

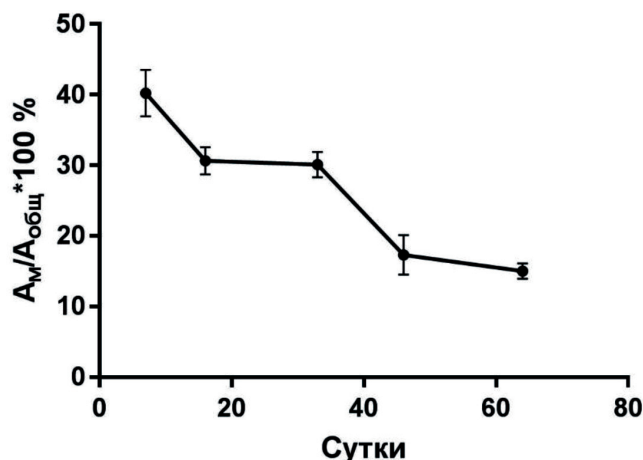


Рис. 1. Биодеградация волокнистого материала в зонах роста сосудов.

Материал на 7-е сут. наблюдения описывали только качественно (без подсчета числа сосудов) ввиду слаборазвитой в эти сроки ткани вокруг сохранных волокон имплантированной конструкции. Около 80% матрикса не фрагментировано, сосуды, в основном, находятся на периферии сохраненного матрикса (рис. 2).

На 16-е сут. 25% матрикса подверглось резорбции, среди формирующейся в зоне резорбции матрикса грануляционной ткани наблюдается сформированная сосудистая сеть (сосуды капиллярного типа). На 33-и сут. наряду с сосудами капиллярного типа появляются крупные сосуды. Грануляционная ткань вокруг волокон материала хорошо развита (рис. 3), на сроках 46—64 сут. она превращается в зрелую соединительную ткань.

В образцах на 46-е и 64-е сут. матрикс из ПКЛ практически полностью фрагментирован. Не выявлено различий в образцах по сравнению с контролем плотности распределения сосудов.

В таблице представлены данные о плотности распределения сосудов в контрольных образцах и образцах при имплантации матриксов с различной концентрацией НВГ.

На 16-е сут. отмечено увеличение плотности распределения сосудов в группах ВКп и НВп по сравнению с контролем (на 17%, $p < 0,05$), что объясняется выходом БАС из структуры полимера. Поскольку БАС находились в объеме полимера, то их выход носил отсроченный характер.

На 33-и сут. отмечено уменьшение общей плотности распределения сосудов в контрольной группе вследствие смены этапа васкулогенеза (капилляры диаметром менее 15 мкм) на нормальный ангиогенез, однако на этом фоне в группе с ВКп плотность распределения сосудов на 46% ($p < 0,001$) превысила значения в контроле, что может объясняться выходом НВГ из объема резорбирующего волокнистого поликапролактона.

Полученные результаты согласуются с работами других авторов, изучавших ангиогенную модификацию матриксов. Так, в работе по изучению влияния белкового фактора bFGF на локальный ангиогенез, отмечалось увеличение на 35% плотности распределения сосудов по сравнению с имплантацией контрольного коллагенового матрикса [14]. Использование преваскуляризированных трансплантов из альгината показало увеличение плотности сосудов более чем в 2 раза на 7-е сут. имплантации. При этом пик васкуляризации приходился на 10-й сут. [15].

Изучение показателей роста сосудов в контрольной группе выявило увеличение плотности распределения сосудов со временем (рис. 4, А), что полностью согласуется с данными других авторов об этапности сосудобразо-

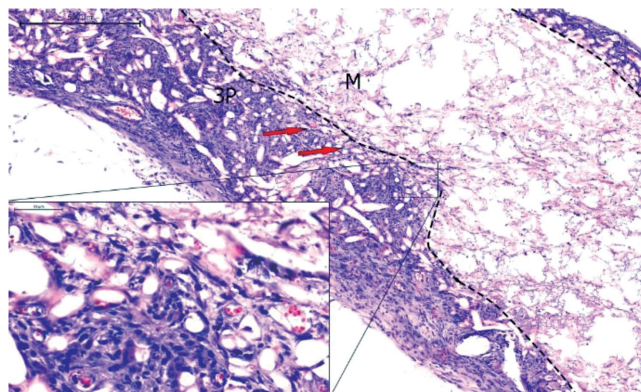


Рис. 2. Имплантированный каркас (НКп 7-е сут.): М — пунктирной линией отмечена зона нерезорбированного материала. ЗР — зона резорбции материала. Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 50$ —400.

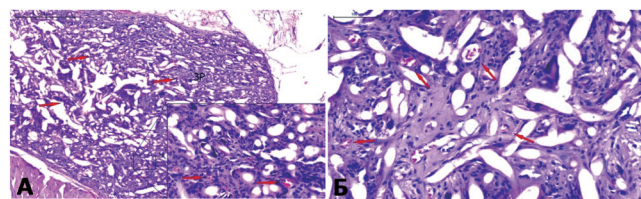


Рис. 3.

А. Имплантированный каркас (НКп, 33 сут.). ЗР — большая часть ткани представлена зоной резорбции материала. Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 50$ —400; Б. Имплантированный каркас (контроль, 33 сут.). Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 200$ В. Имплантированный ПКЛ-каркас (ВКп, 33 сут.). Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 200$.

вания *in vivo* [16]. В группе сравнения наблюдалась та же закономерность, при этом на 33-и сут. в группе с высокой концентрацией НВГ плотность распределения сосудов была статистически значимо выше, чем в контроле и образцах с низкой концентрацией НВГ.

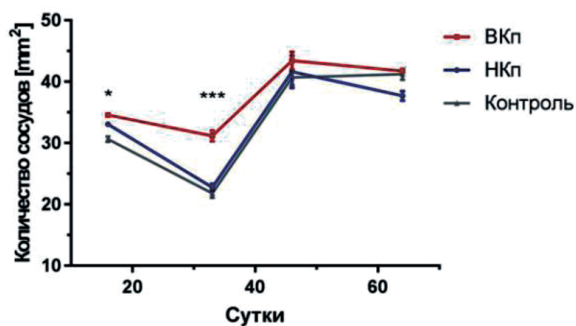
Доли крупных сосудов в контрольной группе и в группах сравнения были схожи, при этом на 33-и сут. наблюдались максимальные различия в группах высокой и низкой концентрации НВГ (рис. 4, Б). Известно, что новообразованные соматические капилляры (васкулогенез) имеют диаметр до 10—15 мкм, а дальнейшее их развитие — (ангиогенез) регулируется множеством цитокинов, ростовых

Таблица

Плотность распределения сосудов в группах сравнения (п/мм²)

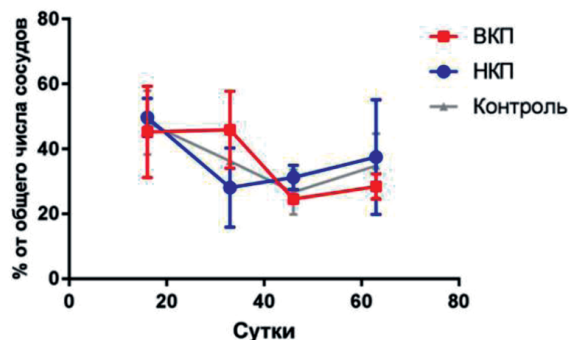
Группа сравнения	Среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)
16-е сутки	
Контроль	30,65 ± 2,49
Низкая концентрация НВГ	33,09 ± 1,07
Высокая концентрация НВГ	34,58 ± 2,29
33-и сутки	
Контроль	21,81 ± 5,23
Низкая концентрация НВГ	22,78 ± 4,04
Высокая концентрация НВГ	31,17 ± 5,25
46-е сутки	
Контроль	40,71 ± 9,92
Низкая концентрация НВГ	41,66 ± 14,51
Высокая концентрация НВГ	43,45 ± 7,80
64-е сутки	
Контроль	41,26 ± 6,13
Низкая концентрация НВГ	37,73 ± 4,28
Высокая концентрация НВГ	41,76 ± 0,12

Примечание. НВГ — препарат "Неоваскулген"



*p < 0,05, ***p < 0,001 Контроль-ВКп

А



Б

Рис. 4. Показатели роста сосудов на 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сутки: А — плотность распределения сосудов, мм²; Б — доля крупных сосудов.

факторов, а также характером взаимодействия эндотелиальных клеток друг с другом, с компонентами экстрацеллюлярного матрикса и с клетками микроокружения [17]. Лишь спустя некоторое время, происходит образование «взрослых» сосудов, «схлопывание» локальных зон микрососудов и таким образом — общее уменьшение локальной плотности распределения сосудов. Это же мы наблюдали при изучении морфологии препаратов в контроле — в период с 16-х до 64-х сут. наблюдалось изменение процентного соотношения сосудов большого диаметра (более 15 мкм).

На 46-е и 64-е сут. параллельно с биорезорбцией полимерных волокон матрикса (разрушение и фрагментация волокнистого материала), наблюдалось сглаживание различий в группах по сравнению с контролем, обусловленное «схлопыванием» микрососудов, образованных во время начального васкулогенеза, при прекращении воздействия факторов, стимулирующих сосудообразование (рис. 4,А).

Показано, что витализация биосовместимых и биодеградируемых каркасов геннотерапевтическим препаратом возможна с тем же физиологическим эффектом, что и при использовании рекомбинантных белковых факторов роста. Ранее исследователями было показано, что рецепторы VEGF играют значимую роль в прогнозе и терапии заболеваний, протекающих с выраженными нарушениями ангиогенеза [18], решением которой могут быть тканеинженерные конструкции — носители кодирующих нуклеиновокислотные последовательности ростовых факторов васкуляризации.

Таким образом, полученные данные показали статистически значимое увеличение плотности распределения сосудов в зонах имплантации каркасов из поликапролактона, модифицированных введением генно-терапевтического препарата на основе нуклеиновой кислоты внутрь волокон биосовместимого материала. Отмечено увеличение плотности распределения сосудов на 46% при высвобождении БАС. Результаты согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали возможность использования БАС — двуцепочечных ДНК-плазмид как альтернативы белковым факторам, без выраженного цитотоксического эффекта. Показано дозозависимое влияние на васкуляризацию и ангиогенез при увеличении концентрации препарата «Неоваскулген» в материале. При этом эффект является обратимым, и при прекращении выхода препарата из резорбированного матрикса, плотность распределения сосудов приближается к значениям в контроле. Результаты продемонстрировали эффективность ангиогенной витализации матриксов на основе биосовместимых и биodeградируемых материалов для обеспечения физиологической и биологической совместимости трансплантатов.

References

- Alexandre N., Amorim I., Caseiro A.R., Pereira T., Alvites R., Rema A., et al. Long term performance evaluation of small-diameter vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and dextran and MSCs-based therapies using the ovine pre-clinical animal model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017; 523(2): 515-30.
- Dmitrieva L.A., Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.E., Sergeeva A.S. Modern state of problem of delivery of medicines with use of erythrocytes as cell-carriers. *Journal of Pathophysiology and Experimental Therapy*. 2016; 60(3): 88-94. (In Russian)
- Sevostyanova V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Velikanova E.A., Shabaev A.R., Senokosova E.A., et al. Constructing a blood vessel on the porous scaffold modified with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1783: 20204.
- Del Gaudio C., Baiguera S., Ajallouiean F., Bianco A., Macchiarini P. Are synthetic scaffolds suitable for the development of clinical tissue-engineered tubular organs?. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2014; 102(7): 2427-47.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kutikhin A.G., Mironov A.V., Krivkina E.O., Shabaev A.R., et al. Vascular endothelial growth factor improves physico-mechanical properties and enhances endothelialization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(e-caprolactone) small-diameter vascular grafts in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2016; 7: 230.
- Antonova L.V., Seifalian A.M., Kutikhin A.G., Sevostyanova V.V., Matveeva V.G., Velikanova E.A., et al. Conjugation with RGD Peptides and Incorporation of Vascular Endothelial Growth Factor Are Equally Efficient for Biofunctionalization of Tissue-Engineered Vascular Grafts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(11): 1920.
- Simon-Yarza T., Formiga F.R., Tamayo E., Pelacho B., Prosper F., Blanco-Prieto M.J. Vascular Endothelial Growth Factor-Delivery Systems for Cardiac Repair: An Overview. *Theranostics*. 2012; 2(6): 541-52.
- Wissing T.B., Bonito V., Bouten C.V., Smits A.I. Biomaterial-driven in situ cardiovascular tissue engineering — a multi-disciplinary perspective. *npj Regenerative Medicine*. 2017; 2(1): 18.
- Grigorian, A.S., Schevchenko K.G. Some possible molecular mechanisms of VEGF encoding plasmids functioning. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2011; 6(3): 24-8. (in Russian)
- Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y., Galetsky D.V., Korolev O.V., Eremin I.I., et al. Construction and biological effect evaluation of gene-activated osteoplastic material with human VEGF gene. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2013; 8(3): 78-85. (in Russian)
- Lyundup A.V., Demchenko A.G., Tenchurin T.H., Krashennnikov M.E., Klabukov I.D., Shepelev A.D., et al. Improving the seeding effectiveness of stromal and epithelial cell cultures in biodegradable matrixes by dynamic cultivation. *Genes and Cells*. 2016; 11(3): 102-7. (in Russian)
- Tenchurin T., Lyundup A., Demchenko A., Krashennnikov M., Balyasin M., Klabukov I., et al. Modification of biodegradable fibrous scaffolds with Epidermal Growth Factor by emulsion electrospinning for promotion of epithelial cells proliferation. *Genes and Cells*. 2017; 12(4): 47-52. (in Russian)
- Arutyunyan I., Tenchurin T., Kananykhina E., Chernikov V., Vasyukova O., Elchaninov A., et al. Nonwoven polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: the choice of the structure and the method of cell seeding. *Genes and Cells*. 2017; 12(1): 62-71. (in Russian)
- Zhou J., Zhao Y., Wang J., Zhang S., Liu Z., Zhen M., et al. Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor in Combination with a Collagen Matrix in Chronic Hindlimb Ischemia. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012 (2012): 652794.
- Dvir T., Kedem A., Ruvinov E., Levy O., Freeman I., Landa N., et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(35): 14990-95.
- Lemon G., Howard D., Tomlinson M.J., Buttery L.D., Rose F.R.A.J., Waters S.L., et al. Mathematical modelling of tissue-engineered angiogenesis. *Mathematical Biosciences*. 2009; 221(2): 101-20.
- Sokolov D.I. Vasculogenesis and angiogenesis in development of a placenta. *Journal of obstetrics and woman disease*. 2007; 56(3): 129-33. (in Russian)
- Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. Current status of vascular remodeling and angiogenesis in chronic liver diseases. *Journal of Pathophysiology and Experimental Therapy*. 2016; 60(1): 73-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Клабуков Илья Дмитриевич, науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

Балясин Максим Витальевич, лаборант отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: max160203@gmail.com

Люндуп Алексей Валерьевич, канд. мед. наук, зав. отделом передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: lyundup@gmail.com

Крашенинников Михаил Евгеньевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: krashen@rambler.ru

Титов Александр Сергеевич, врач-хирург для оказания экстренной помощи ГКБ № 67, e-mail: theendisnigh@inbox.ru

Мудряк Даниил Леонидович, студент 6-го курса, лечебное дело, ДОП МШМБ, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: maaze@yandex.ru

Шепелев Алексей Дмитриевич, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: shepelev_alexey@mail.ru

Тенчурин Тимур Хасянович, канд. хим. наук, науч. сотр. лаб. полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: tenchurin.timur@mail.ru

Чвалун Сергей Николаевич, доктор хим. наук, проф., начальник отд-ния материаловедения и кристаллографии Курчатовского комплекса НБИКС-технологий НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: s-chvalun@yandex.ru

Дюжева Татьяна Геннадьевна, доктор мед. наук, проф., зав. отделом регенеративной хирургии печени и поджелудочной железы Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России, e-mail: dtg679@gmail.com