

Структура и свойства гидрогеля с взаимопроникающей полимерной сетью фибрин/поливиниловый спирт как модифицирующего покрытия для протезов сосудов малого калибра

Для корреспонденции: Вера Геннадьевна Матвеева, matveeva_vg@mail.ru

Поступила в редакцию 25 января 2023 г.
Исправлена 17 марта 2023 г. Принята к печати 29 марта 2023 г.

Цитировать: 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 взаимопроникающей полимерной сетью фибрин/поливиниловый спирт как модифицирующего покрытия для протезов сосудов малого калибра. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2023;27(2):74-86. <https://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2023-2-74-86>

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».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн: В.Г. Матвеева, М.А. Резцова
Сбор и анализ данных: В.Г. Матвеева, М.А. Резцова, Т.В. Глушкова, Е.О. Кривкина, А.В. Сергеева
Статистическая обработка данных: В.Г. Матвеева, М.А. Резцова, Т.В. Глушкова, А.В. Сергеева
Написание статьи: В.Г. Матвеева
Исправление статьи: В.Г. Матвеева, М.А. Резцова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш
Утверждение окончательного варианта статьи: все авторы

В.Г. Матвеева¹, М.А. Резцова¹, Т.В. Глушкова¹, А.В. Сергеева², Е.О. Кривкина¹, Л.В. Антонова¹, Л.С. Барбараш¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кемерово, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Гибридные гидрогели с взаимопроникающей полимерной сетью позволяют регулировать свойства путем изменения состава и концентрации компонентов. Фибрин — доступный природный полимер с идеальными биологическими характеристиками, но низкой прочностью и склонностью к ретракции. Гидрогели поливинилового спирта стабильны, соответствуют по прочности биологическим тканям, однако биоинертны. Создание взаимопроникающей полимерной сети фибрин/поливиниловый спирт может помочь преодолеть недостатки каждого из компонентов и получить улучшенный материал для тканевой инженерии.

Цель. Оценить возможность и условия получения однородной взаимопроникающей полимерной сети методом последовательной полимеризации фибрина и криоструктурирования поливинилового спирта с максимальным сохранением благоприятных для тканевой инженерии механических и биологических свойств.

Методы. Взаимопроникающая полимерная сеть фибрин/поливиниловый спирт получена последовательной полимеризацией фибрина (30 мг/мл) и криоструктурированием поливинилового спирта (15, 30 и 60 мг/мл). Структура изучена методами сканирующей электронной микроскопии, гистологии, инфракрасной спектроскопии, рентгеноструктурного анализа. Протестированы механические свойства, усадка образцов. Биологические особенности оценены *in vitro* по жизнеспособности, количеству клеток, пролиферативной, метаболической активности культуры эндотелиальных клеток EA.hy926.

Результаты. Структурные исследования показали максимальное количество фибрина на поверхности взаимопроникающей полимерной сети Ф30ПВС15 и минимальное на Ф30ПВС60. Результаты подтвердились высокой биологической привлекательностью Ф30ПВС15 по сравнению с Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60. Резистентность к усадке продемонстрировали гидрогели Ф30ПВС60 по сравнению с шаблоном, образцы

ORCID

В.Г. Матвеева, <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>
М.А. Резвова, <https://orcid.org/0000-0002-4405-8904>
Т.В. Глушкова, <https://orcid.org/0000-0003-4890-0393>
Е.О. Кривкина, <https://orcid.org/0000-0002-2500-2147>
Л.В. Антонова, <https://orcid.org/0000-0002-8874-0788>
Л.С. Барбараш, <https://orcid.org/0000-0001-6981-9661>

© Матвеева В.Г., Резвова М.А., Глушкова Т.В.,
Сергеева А.В., Кривкина Е.О., Антонова Л.В.,
Барбараш Л.С., 2023



ФЗ0ПВС30 уменьшились в 1,4 раза, ФЗ0ПВС15 — в 2,5 раза. Хотя механическая прочность всех монокомпонентных гидрогелей и образцов с взаимопроникающей полимерной сетью не достигала значений аналогичного показателя внутренней грудной артерии человека (a. mammaria), для ФЗ0ПВС30 и ФЗ0ПВС60 показатели были выше, чем ФЗ0ПВС15 и фибрина.

Заключение. Предложенный метод позволяет получать гидрогели с взаимопроникающей полимерной сетью, устойчивые к усадке, с улучшенными механическими и удовлетворительными биологическими свойствами при концентрации поливинилового спирта более 15 и менее 60 мг/мл. Однако недостаточная прочность полученного материала ограничивает его использование в сосудистой инженерии рамками модифицирующего покрытия.

Ключевые слова: гидрогель; поливиниловый спирт; тканевая инженерия; фибрин

Введение

Отсутствие на рынке эффективных протезов сосудов малого диаметра [1] актуализирует поиск оптимальных решений данной проблемы. Тканевая инженерия оперирует широким спектром различных подходов и методов для создания новых биоматериалов и покрытий, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к изделиям подобного рода (соответствие физико-механических характеристик, биосовместимость и функциональность, отсутствие риска переноса инфекции, низкая иммуногенность, атромбогенность). Одно из направлений связано с получением гибридных гидрогелей с взаимопроникающей полимерной сетью (англ. Interpenetrating Polymer Network, IPN). Преимуществом IPN-гидрогелей является возможность сочетать благоприятные свойства каждого из компонентов. Большой выбор базовых полимеров, возможностей их комбинаций, концентраций и соотношения позволяет получать практически неограниченное количество IPN-гидрогелей, а также задавать и регулировать их свойства.

Современный опыт тестирования различных материалов при создании протезов сосудов малого диаметра доказывает преимущество биомиметических вариантов перед биоинертными [2]. Фибрин представляет собой природный полимер с уникальными для тканевой инженерии биологическими свойствами. Он не только является идеальным клеточным носителем с высокой способностью к удержанию клеток на поверхности [3], но и, благодаря способности связывать и дозированно высвобождать ростовые факторы, активно поддерживает ангиогенез и репарацию тканей [4]. Аутологичный фибрин можно просто и в достаточном количестве

получать из собственной крови пациента, что делает его привлекательным материалом для персонализированной тканевой инженерии [5]. Однако низкая прочность фибрина и склонность к ретракции ограничивают его использование в конструкциях, подверженных значительным механическим нагрузкам и требующих сохранения формы без усадки. Попытки исследователей улучшить прочностные характеристики фибрина без создания дополнительного каркаса (регулирование концентрации компонентов полимеризации, увеличение концентрации фибринстабилизирующего фактора, прессование, заселение клетками) давали положительный результат [6], но не достигали целевых значений, сравнимых с прочностью сосудистой стенки.

Создание гибридного IPN-гидрогеля с армирующим синтетическим полимером в составе может помочь сохранить форму и повысить прочность. При этом фибрин предоставит отсутствующие на синтетических полимерах сайты для адгезии клеток и придаст биологическую привлекательность материалу. В ряде экспериментальных работ получены IPN-гидрогели фибрина и таких синтетических полимеров, как полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль и поливиниловый спирт (ПВС), которые обладали улучшенными механическими характеристиками, настраиваемой скоростью деградации и не были склонны к усадке [7–12]. Однако их полимеризация выполнялась с участием токсических сшивающих агентов или фотоинициаторов, которые сложно или практически невозможно полностью удалить из пористой трехмерной структуры гидрогеля с высоким содержанием жидкой фазы. Присутствие токсичных и агрессивных химических реагентов снижает благоприятное влияние фибрина

на клеточную жизнедеятельность, поэтому считаем важным условием применение «чистых» технологий для синтеза IPN-гидрогеля.

Требованию «чистых» технологий отвечает метод криоструктурирования ПВС посредством циклического замораживания и оттаивания [13]. Трехмерное сшивание ПВС путем криоструктурирования является наиболее простым, стандартизируемым, дешевым, нетоксичным и эффективным способом полимеризации [14–16]. Показано, что ПВС-криогели имеют сопоставимые с биологическими тканями структурные и упруго-деформационные свойства [17–20], не оказывают токсического влияния на клетки [21; 22], резистентны к неспецифической адсорбции белка [23], в воде и биологических жидкостях имеют стабильную химическую структуру, не растворяются, не подвергаются гидролизу, ограниченно набухают [24]. В зависимости от молекулярной массы линейного ПВС, метода полимеризации и плотности сшивок механические свойства ПВС можно регулировать и адаптировать к показателям нативных кровеносных сосудов [25–27]. Получены обнадеживающие результаты имплантации животным протезов сосудов малого диаметра на основе ПВС [25; 28], однако высокая гидрофильность монокомпонентных ПВС-гидрогелей и отсутствие сайтов для клеточной адгезии создают препятствие для заселения клетками и делают материал биоинертным [29]. Мы полагаем, что сочетание преимуществ фибрина и ПВС в структуре IPN-гидрогеля поможет преодолеть недостатки каждого из компонентов и получить улучшенный материал; волокна фибрина поддержат клеточную жизнедеятельность, а сеть ПВС повысит прочность и снизит усадку IPN-гидрогеля.

Предлагаемая к разработке технология получения IPN-гидрогеля подразумевает равномерное перемешивание компонентов и последовательную полимеризацию фибриногена человека, полученного из плазмы методом этаноловой преципитации, и криоструктурирование ПВС. В результате должен сформироваться гидрогель с однородной структурой, представляющей собой переплетающиеся волокна фибрина и сети ПВС. В работе будет реализован подход, связанный с получением аутологичного фибрина без использования экзогенного тромбина [Способ изготовления аутологичного фибрина с регулируемым содержанием фибриногена без использования экзогенного тромбина. Патент RU 2758260 С1. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Дата регистрации: 27.10.2021], что в перспективе позволит

создавать персонализированные тканеинженерные конструкции или покрытия.

Свойства IPN-гидрогелей можно настраивать путем изменения концентрации входящих в состав полимеров. На данном этапе будет предварительно изучено влияние содержания ПВС на свойства IPN-гидрогеля фибрин/поливиниловый спирт (Ф/ПВС). Для этого в исследовании будут использованы единая концентрация фибриногена и различные концентрации ПВС, которые выбраны на основании имеющегося опыта и данных литературы [20; 30]. Работа поможет сформировать основные представления о наследовании свойств в данной комбинации и концентрациях полимеров, определить предпочтительный диапазон концентраций ПВС и вариант использования материала для нужд сосудистой инженерии.

Цель — оценить возможность и условия получения однородного IPN-гидрогеля методом последовательной полимеризации фибрина и криоструктурирования ПВС с максимальным сохранением благоприятных механических и биологических свойств.

Методы

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол № 4/1 от 18 апреля 2022 г.).

Для получения преципитата плазменных белков использовали кровь доноров, забранную с 3,8%-м цитратом натрия. Из плазмы выделяли преципитат методом этаноловой преципитации с низким содержанием этанола. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 2 000 г в течение 10 мин. При постоянном перемешивании в плазму вносили холодный раствор 18%-го этанола на HEPES-буфере (pH 7,4) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США) в соотношении 1:1, инкубировали 1 ч при температуре 0 °С и постоянном встряхивании на шейкере. Далее центрифугировали при 1 200 г и 4 °С в течение 30 мин. Надосадок удаляли, а преципитат растворяли в HEPES-буфере. Концентрацию фибриногена в преципитате контролировали модифицированным методом Клаусса с использованием наборов «МультиТех-Фибриноген» и «Фибриноген-калибратор» (ООО фирма «Технология-Стандарт», Барнаул, Россия) на коагулометре CA-500 (Sysmex Corporation, Кобе, Япония). Концентрацию фибриногена доводили до 75 мг/мл с учетом дальнейших разведений при пробоподготовке, конечная концентрация фибриногена в фибрине составляла 30 мг/мл.

Для получения раствора ПВС использовали полимер молекулярной массой 89–98 кДа, степенью гидролиза ацетатных групп > 99 % (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), который растворяли в NaCl 0,9 % при температуре 90 °С до получения прозрачного раствора с концентрацией 37,5; 75,0 и 150,0 мг/мл.

Приготовление образцов

Образцы гидрогеля с взаимопроникающей полимерной сетью фибрин/поливиниловый спирт

В преципитат фибриногена вносили ПВС в соотношении 1:1 и тщательно перемешивали. В нашем исследовании полимеризация фибриногена в фибрин происходит под действием тромбина, входящего в состав преципитата плазменных белков донорской крови. Тромбин активировали внесением раствора хлорида кальция в концентрации 10 мМ. Для этого к раствору преципитата 75 мг/мл фибриногена и ПВС соответствующей концентрации добавляли CaCl₂ 0,5 % в соотношении 4:1 и гордокс (Gedeon Richter Ltd., Будапешт, Венгрия) 100 КИЕ/мл. Итоговая концентрация фибриногена в образцах составила 30 мг/мл и ПВС 15, 30 и 60 мг/мл. Готовую смесь заливали в форму и оставляли для полимеризации при 37 °С на 1–1,5 ч. Следующим этапом было криоструктурирование ПВС в образце. Для этого образцы охлаждали до –40 °С в течение суток, далее выполняли градиентную разморозку при –4 °С с экспозицией 8 ч и оттаивание при +6 °С. Циклы замораживания и оттаивания повторяли трижды.

Контрольные образцы фибрина

Определяли концентрацию фибриногена в преципитате как описано выше и доводили до 60 мг/мл. Далее вносили равный объем раствора CaCl₂ 0,2 % с гордоксом, перемешивали, заливали в форму и оставляли для полимеризации. Концентрация фибриногена при полимеризации — 30 мг/мл.

Контрольные образцы поливинилового спирта

Раствор линейного ПВС готовили как описано выше, доводили концентрацию в растворе до 15, 30 и 60 мг/мл. Циклы замораживания и оттаивания контрольных образцов фибрина и ПВС выполняли вместе с образцами IPN-гидрогелей.

Изучение структуры гидрогелей

Сканирующая электронная микроскопия

Готовые образцы фиксировали в 1%-м растворе глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) в течение суток и отмывали в растворе

фосфатно-солевого буфера (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США) и дистиллированной воде. После этого образцы замораживали и лиофилизировали в установке FreeZone 2.5 (Labconco, Канзас-Сити, США) при температуре –40 °С и давлении < 0,133 мбар. Для визуализации внутренней структуры лиофилизированные образцы замораживали в жидком азоте и ломали. Методом ионного распыления на поверхность разлома наносили токопроводящее (Au/Pd) покрытие толщиной 7 нм. Структуру оценивали на микроскопе S-3400N (Hitachi, Ltd., Токио, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Гистологическая окраска срезов гематоксилином и эозином

Для подготовки срезов образцы фиксировали в 10%-м забуференном формалине (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия) и 2%-м глутаровом альдегиде, дегидратировали, пропитывали и заливали парафином «Гистомикс» (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия). Из полученных блоков с помощью микротомы HM 325 (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США) изготавливали поперечные срезы толщиной 8 мкм, которые депарафинизировали и дегидратировали. Окрашивание проводили раствором гематоксилина Гарриса 15 мин и далее раствором эозина (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия) 30 с. После промывания водой образцы дегидратировали в серии спиртов, просветляли в ксилоле и заключали в монтирующую среду (ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия) под покровное стекло. Визуализацию проводили с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия).

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Химическую структуру полученных гидрогелей характеризовали с помощью инфракрасной спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением (Tensor 27, Bruker, Биллерика, США) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения MIRacle (PIKE Technologies, Мэдисон, США) на кристалле ZnSe. Исследование проводили в спектре в диапазоне 400–2 000 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹. Предварительно образцы (n = 3) лиофилизировали. Для IPN-гидрогелей после лиофилизации выполняли разлом в жидком азоте с последующим исследованием поверхности и толщи образцов.

Рентгеноструктурный анализ

Степень кристалличности полученных монокомпонентных и IPN-гидрогелей оценивали методом рентгеноструктурного анализа. Для изучения данного показателя получали дифрактограммы на дифрактометре ДРОН-8 (ООО «УЕД», Санкт-Петербург, Россия) с острофокусной медной трубкой в излучении Cu-K α (1,5406 Å); напряжение 34 кВ, ток 14 мА. Шаг детектора 0,5° (по 2 θ), время набора импульсов 8 с.

Изучение механических свойств гидрогелей

Исследовали свойства мокрых гидрогелей: для этого образцы готовили на вырубном прессе ZCP 020 (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ульм, Германия) с использованием ножа специальной формы. Механические свойства тестировали на универсальной испытательной машине серии Z (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ульм, Германия) при температуре 37 °С с использованием датчика силы номинальной нагрузкой 50 Н. Определяли предел прочности по максимальному напряжению при растяжении (МПа); упруго-деформативные свойства — по относительному удлинению до начала разрушения (%); модуль Юнга (МПа) в пределах малых деформаций (E mod). Исследовали основные группы IPN-гидрогелей (n = 7), в качестве групп сравнения тестировали монокомпонентные гели на основе фибрина (n = 11) и ПВС (n = 7), а также образцы внутренней грудной артерии человека (a. mammaria) (n = 9), которая является «золотым стандартом» для имплантации при коронарном шунтировании.

Оценка усадки образцов

Образцы полимеризовали в 24-луночном планшете по описанной выше технологии. Готовые образцы отделяли от формы, трехкратно промывали в избытке NaCl 0,9 % с экспозицией 1 ч. Далее измеряли толщину (h) и радиус (r) полученного сгустка фибрина с помощью толщиномера и цифрового штангенциркуля (мм) (n = 6). Объем гидрогелей (V, мм³) рассчитывали по формуле:

$$V = \pi r^2 h.$$

Изучение биологических свойств

Тестирование биологических свойств гидрогелей проводили на культуре гибридомы эндотелиальных клеток пупочной вены человека EA.hy926. Для этого образцы гидрогелей в стерильных условиях заливали в лунки 24-луночного планшета (n = 6), формировали гидрогели как описано выше. Поверхность гидрогелей заселяли клетками 2×10^4 на лунку

и культивировали 72 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂.

Оценка жизнеспособности клеток

Клетки окрашивали ядерными красителями Hoechst 33342 10 мкг/мл (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США) в течение 10 мин и бромистый этидий 30 мкг/мл (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США) в течение 1 мин. После отмывания фосфатно-солевым буфером проводили подсчет мертвых клеток (ядра окрашены бромистым этидием) и общего количества клеток (ядра окрашены Hoechst) на образцах и культуральном пластике с использованием инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия) в 5 случайных полях зрения с каждого дубля по формуле:

$$\text{ОЖ \%} = \frac{(AB - AM)}{AB} \times 100 \%,$$

где: ОЖ % — относительное количество живых клеток (%);

AB — абсолютное количество всех клеток;

AM — абсолютное количество мертвых клеток.

Оценка пролиферативной активности клеток

Использовали набор Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США). Клетки инкубировали с EdU-регентом в течение 16 ч, далее окрашивали в соответствии с инструкцией производителя. После окончания процедуры ядра клеток контрастировали DAPI (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США). Препараты анализировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия), оценивали 10 случайно выбранных полей зрения для каждой группы (n = 3). Количественный анализ изображений осуществляли в программе ImageJ (National Institutes of Health, Бетесда, США), подсчитывали общее количество клеток и количество пролиферирующих клеток в поле зрения по формуле:

$$\text{ОП \%} = \frac{AP}{AB} \times 100 \%,$$

где: ОП % — относительное количество пролиферирующих клеток;

AP — абсолютное количество пролиферирующих клеток;

AB — абсолютное количество всех клеток.

Для определения количества адгезированных клеток выполнили пересчет клеток с поля зрения на 1 мм².

Оценка метаболической активности

Метаболическую активность оценивали колориметрическим методом с использованием набора Cell Cytotoxicity Assay Kit (Colorimetric) (Abcam plc., Кембридж, Англия). В лунки с образцами вносили реактив в рабочей концентрации (1:5 с питательной средой), инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. 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 и 605 нм на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific Inc., Уолтем, США).

Расчет метаболической активности клеток проводили по формуле:

$$MA (UE) = R_{оп} - R_0,$$

где: MA (UE) — метаболическая активность клеток (UE);
 R — отношение оптической плотности (ОП) при длине волны 570 нм к ОП при длине волны 605 нм (ОП₅₇₀/ОП₆₀₅);
 оп — опытный образец;
 0 — «нулевая» проба без клеток, содержащая реактив в рабочей концентрации. Предназначена для вычета фонового окрашивания.

Статистический анализ

Статистическую и графическую обработку результатов выполняли в программе Prism 6 (GraphPad Software, Бостон, США). Характер распределения данных в выборках оценивали по критерию Колмогорова – Смирнова. Поскольку распределение отличалось от нормального, количественные данные

представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартилей (Me (Q1; Q3)). Достоверность различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни. Сравнение между несколькими группами проводили по критерию Краскела – Уоллиса с коррекцией результатов с учетом множественности сравнения методом средней доли ложных отклонений гипотез (среди всех отклонений) (англ. False Discovery Rate). Статистически значимым различием считали $p < 0,05$ во всех тестах.

Результаты

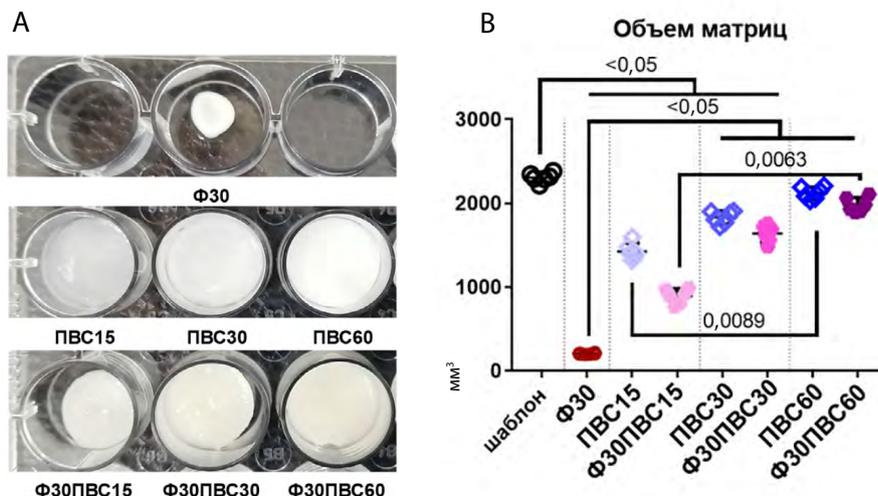
Усадка матриц

Объем шаблона для заливки гидрогелей составил 2 308,3 (2 272,8; 2 356,8) мм³. Фибрин после трехкратного замораживания и оттаивания дал значительную усадку (рис. 1), и его объем уменьшился более чем в 11 раз (202,5 (198,1; 214,3) мм³) по сравнению с шаблоном. ПВС15 после отмывания в NaCl уменьшился на 30 % (1 403,2 (1 347,8; 1 510,3) мм³), а ПВС30 — на 23 % (1 756,1 (1 842,6; 1 909,1) мм³). Самой высокой устойчивостью к усадке обладали образцы ПВС60 (2 118,7 (2 052,2; 2 194,7) мм³), их объем достоверно не изменился по сравнению с шаблоном.

Объемы образцов ПВС и соответствующих им IPN-гидрогелей Ф/ПВС не различались. IPN-гидрогели Ф30ПВС15 продемонстрировали более значительную усадку: 908,3 (852,0; 976,9) мм³ по сравнению с 1 654,5 (1 541,0; 1 731,4) и 1 958,1 (1 900,4; 2 074,9) мм³ у образцов Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60 соответственно.

Рис. 1. Усадка образцов в зависимости от концентрации компонентов: внешний вид образцов гидрогелей фибрина, поливинилового спирта и взаимопроникающей полимерной сети фибрин/поливиниловый спирт после трех циклов замораживания и оттаивания (А); графическое распределение объемов матриц (n = 6) (В)

Примечание. Ф30 — фибрин 30 мг/мл; ПВС15, -30, -60 — поливиниловый спирт в соответствующей концентрации 15, 30 и 60 мг/мл; Ф30ПВС15, -30, -60 — гибридный гидрогель с взаимопроникающей полимерной сетью на основе фибрина и поливинилового спирта с соответствующей концентрацией компонентов.



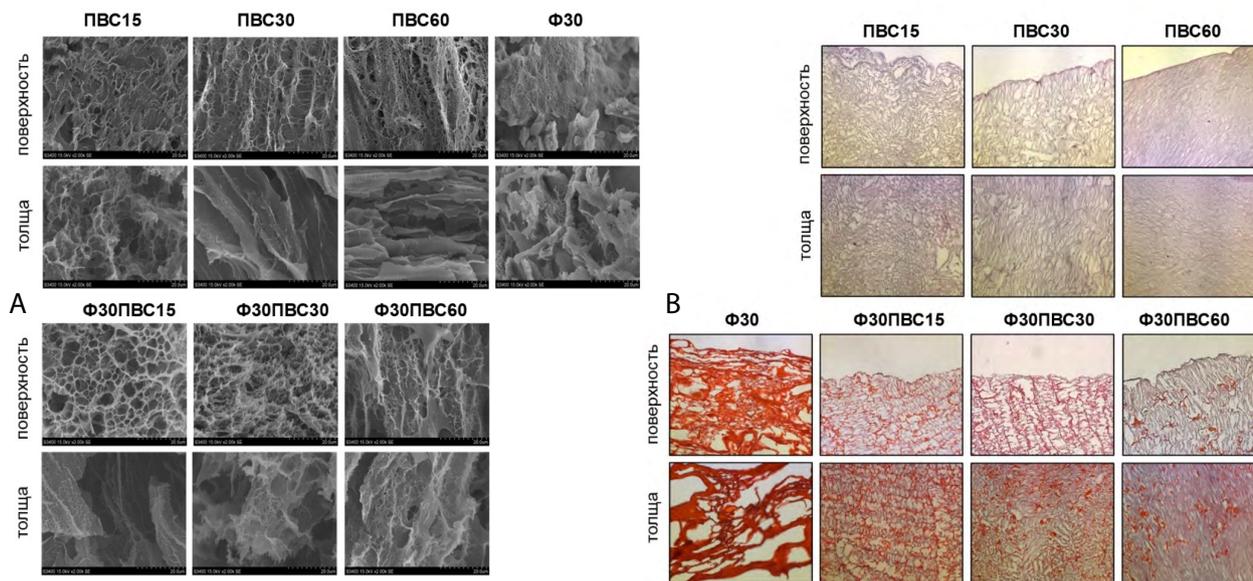


Рис. 2. Структура гидрогелей на поверхности и в толще (разлом) образцов: фотографии со сканирующей электронной микроскопии (увеличение $\times 2\,000$) (A); гистологические срезы (окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия, увеличение $\times 200$) (B)

Примечание. Ф30 — фибрин 30 мг/мл; PVC15, -30, -60 — поливиниловый спирт в соответствующей концентрации 15, 30 и 60 мг/мл; Ф30PVC15, -30, -60 — гибридный гидрогель с взаимопроникающей полимерной сетью на основе фибрина и поливинилового спирта с соответствующей концентрацией компонентов.

Структура гидрогелей

На фотографиях со сканирующей электронной микроскопии фибрин представлен сетью тонких переплетающихся волокон, расположенных вплотную друг к другу, что объясняется сильной усадкой гидрогеля фибрина в процессе выполнения криоциклов (рис. 2A). Гидрогели PVC состояли из сети трубчатых и полигональных полостей, разделенных тонкими стенками. Образцы IPN Ф/PVC включали оба элемента: стенки и трубчатые структуры покрытых сетью переплетающихся волокон, что хорошо видно на фотографиях поверхности и разломов (толща образцов). При этом поверхность Ф30PVC15 содержала максимальное количество элементов, схожих с волокнами фибрина, по сравнению с Ф30PVC30 и Ф30PVC60. Изображения разломов также демонстрировали присутствие трубчатых и значительное количество волокнистых компонентов во внутренней структуре образцов Ф30PVC15, меньше волокон в Ф30PVC30 и минимальное количество в Ф30PVC60. Однако сканирующая электронная микроскопия не позволяет достоверно отличать структуры, относящиеся к различным компонентам (фибрин или поливиниловый спирт).

Хорошее визуальное разделение фибрина и PVC демонстрировала гистологическая окра-

ска гематоксилином и эозином. Фибрин окрашивался в ярко-красный цвет, PVC — в нежно-сиреневый (рис. 2B). Толща IPN-гидрогелей Ф30PVC15 и Ф30PVC30 включала равномерно распределенные волокна фибрина и полости, образованные PVC. IPN-гидрогель Ф30PVC60 имел неоднородную структуру, в которой фибрин формировал глыбки. Структура поверхности IPN-гидрогеля в образцах также отличалась. Количество волокон фибрина, прилегающих к поверхности и находящихся непосредственно вблизи краевой зоны IPN-гидрогеля, было максимальным в образцах Ф30PVC15, несколько меньше в Ф30PVC30, и они практически отсутствовали в Ф30PVC60. Край и поверхность IPN-гидрогеля Ф30PVC60 были почти полностью сформированы поливиниловым спиртом.

Результаты инфракрасной спектроскопии

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье показала на поверхности фибрина полосы, типичные для амидной связи белковой структуры (рис. 3A), а именно: $1\,635\text{ см}^{-1}$ (амид I, обусловлена растяжением связи C=O карбонильной группы), $1\,550\text{ см}^{-1}$ (амид II, обусловлена деформационными колебаниями связи N-H и растяжением связи C-N) [31; 32].

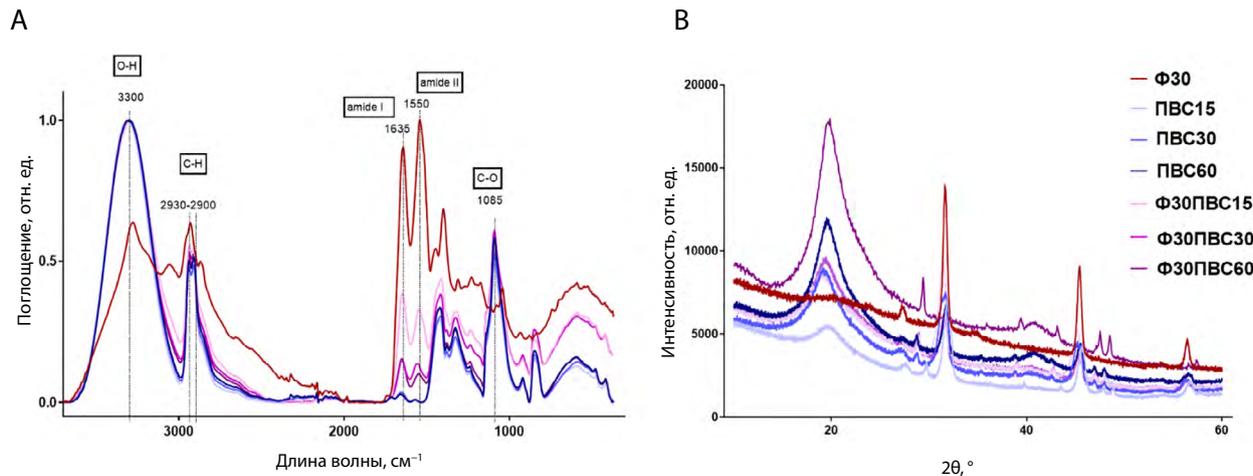


Рис. 3. Результаты спектральных методов изучения структуры образцов: спектры поглощения инфракрасной спектроскопии на поверхности (А); дифрактограммы образцов (В)

Примечание. Ф30 — фибрин 30 мг/мл; ПВС15, -30, -60 — поливиниловый спирт в соответствующей концентрации 15, 30 и 60 мг/мл; Ф30ПВС15, -30, -60 — гибридный гидрогель с взаимопроникающей полимерной сетью на основе фибрина и поливинилового спирта с соответствующей концентрацией компонентов.

Характерные пики поглощения валентных колебаний связи О–Н от меж- и внутримолекулярных водородных связей отмечены при $3\,300\text{ см}^{-1}$ в спектрах ПВС, полосы дублировались и в спектрах IPN-композитных структур. Также в обоих спектрах (ПВС и IPN-гидрогелей) обнаружены полосы валентных колебаний С–Н алкильных групп в области $2\,930\text{--}2\,900\text{ см}^{-1}$ и растяжения С–О-связи гидроксильной группы при $1\,085\text{ см}^{-1}$ [33; 34].

По сравнению с чистым ПВС в спектрах IPN-гидрогелей наблюдали рост интенсивности полос в области, соответствующей амидной связи, что обусловлено присутствием фибрина в составе композитных материалов. Различия в спектрах поверхности IPN-гидрогелей демонстрировали присутствие наибольшего количества фибрина в образцах Ф30ПВС15 и наименьшего — в Ф30ПВС60.

Рентгеноструктурный анализ

Спектры дифракции рентгеновских лучей, полученные для всех криогелей, содержащих ПВС, показали характерный пик с центром около 19° (значения 2θ) (рис. 3В), который можно отнести к полукристаллическому ПВС [35]. Увеличение интенсивности пика с ростом концентрации ПВС может свидетельствовать о повышении числа кристаллических доменов криогеля. Введение фибрина в структуру гидрогеля не повлияло в значительной степени на дифракционную картину. Серия интенсивных пиков, присутствующих на дифрактограмме чистого фибрина, относится к следам хлорида натрия, сохранившимся в системе после получения образцов.

Биологические свойства образцов

Наибольшее количество адгезированных клеток зарегистрировали на образцах фибрина — $0,2918$ ($0,2487$; $0,3318$) кл/мкм² и Ф30ПВС15 — $0,2353$ ($0,2142$; $0,2495$) кл/мкм², между ними различий не обнаружили. ПВС в изучаемых концентрациях показал низкую адгезионную способность. Количество клеток на поверхности любых вариантов ПВС было значительно меньше по сравнению с фибрином и IPN Ф30ПВС15. Присутствие фибрина в структуре IPN значительно улучшало адгезионные свойства ПВС любой концентрации. Так, адгезированных клеток на IPN Ф30ПВС15, -30 и -60 было значительно больше по сравнению с соответствующими образцами ПВС15, -30 и -60. Различия в количестве клеток хорошо заметны на фотографиях (рис. 4А), количественное сравнение представлено на графике (рис. 4В).

Аналогично высокую пролиферативную активность продемонстрировали образцы фибрина и IPN Ф30ПВС15, при этом показатели значительно превышали чистый ПВС любой концентрации, IPN Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60. Не выявили различий между ПВС30 и Ф30ПВС30, а также ПВС60 и Ф30ПВС60.

Метаболическая активность клеток на фибрине и IPN Ф30ПВС15 значительно не различалась и была выше, чем на ПВС и IPN Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60. Внутри групп ПВС30 / IPN Ф30ПВС30 и ПВС60 / IPN Ф30ПВС60 также не отметили различий. Жизнеспособность адгезированных клеток на всех материалах оставалась высокой.

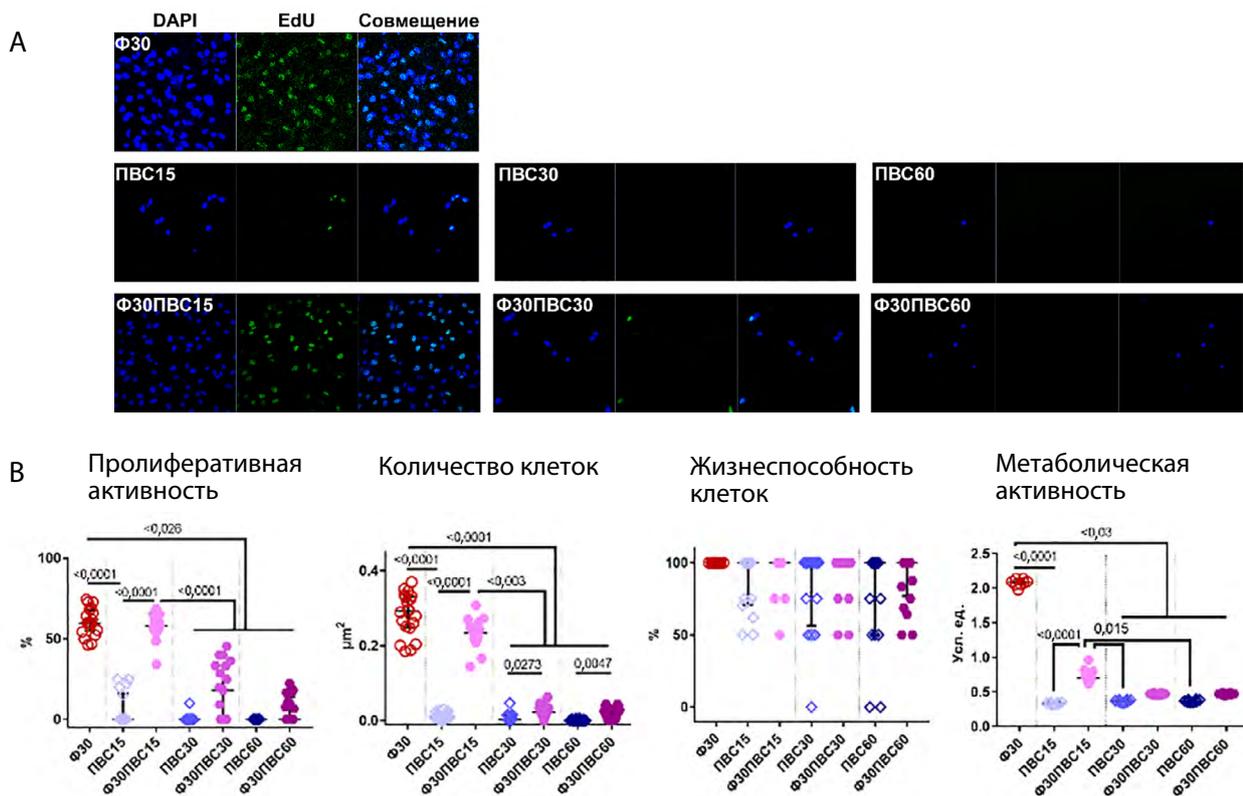


Рис. 4. Оценка жизнедеятельности эндотелиальных клеток через 3 сут. культивирования на поверхности образцов: фотографии пролиферативной активности клеток (конфокальная микроскопия, шкала 50 мкм) (А); графическое представление результатов (В)

Примечание. Ф30 — фибрин 30 мг/мл; ПВС15, -30, -60 — поливиниловый спирт в соответствующей концентрации 15, 30 и 60 мг/мл; Ф30ПВС15, -30, -60 — гибридный гидрогель с взаимопроникающей полимерной сетью на основе фибрина и поливинилового спирта с соответствующей концентрацией компонентов.

Механические характеристики гидрогелей

Все варианты образцов обладали более низкой прочностью и жесткостью (E mod) по сравнению с *a. mattingia* (таблица). По этим показателям не было отличий между фибрином, ПВС15 и IPN Ф30ПВС15. Наиболее прочными и жесткими были образцы ПВС30, -60 и их IPN-варианты Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60.

Удлинение до разрыва всех исследуемых образцов было выше, чем у *a. mattingia*. При этом фибрин отличался меньшим удлинением по сравнению с ПВС и IPN фибрин/поливиниловый спирт.

Обсуждение

Мы изучили наиболее важные для сосудистой инженерии свойства гибридного IPN-гидрогеля Ф/ПВС и сравнили со свойствами соответствующих монокомпонентных гидрогелей. Визуализация структуры IPN-гидрогелей подтвердила возможность последовательной полимеризации сначала фибрина и далее ПВС методом криоструктурирования. Полу-

ченный IPN-гидрогель состоял из волокон фибрина, покрывающих полостные структуры ПВС. Структура толщи IPN Ф30ПВС15 и Ф30ПВС30 характеризовалась равномерным распределением фибриновых волокон, тогда как в толще Ф30ПВС60 визуализировались глыбки фибрина. Возможной причиной глыбчатой полимеризации фибрина в толще IPN Ф30ПВС60 может быть высокая вязкость стокового раствора ПВС (150 мг/мл), который препятствует равномерному смешиванию компонентов.

Другая важная особенность в структуре IPN-гидрогеля, напрямую влияющая на биологические свойства, связана с распределением биомиметического компонента фибрина на поверхности. ПВС известен своей гидрофильной природой, к тому же не содержит сайты для адгезии клеток, что затрудняет прикрепление и удержание клеток [36]. Подтверждение этому мы наблюдали в своем эксперименте, где все образцы ПВС практически не содержали клеток на своей поверхности через 3 сут. после заселения. Количество волокон фибрина на поверх-

Механические свойства матриц

Образец	Предел прочности, МПа		Удлинение, %		Модуль Юнга, МПа	
A. mammaria	2,480 (1,225; 3,385)		29,72 (23,29; 41,26)		29,720 (23,29; 36,25)	
Ф30	0,079 (0,066; 0,086)	*	156,3 (138,8; 161,7)	*	0,112 (0,092; 0,126)	*
ПВС15	0,085 (0,064; 0,117)	*	278,5 (249,9; 346,7)	* **	0,075 (0,062; 0,102)	*
ПВС30	0,212 (0,185; 0,261)	* ** #	319,3 (265,4; 357,1)	* **	0,192 (0,154; 0,251)	* **
ПВС60	0,212 (0,146; 0,293)	* ** #	248,1 (203,8; 287,1)	* **	0,349 (0,197; 0,447)	* **
Ф30ПВС15	0,066 (0,057; 0,092)	*	230,5 (211,2; 263,1)	* **	0,144 (0,130; 0,181)	*
Ф30ПВС30	0,124 (0,107; 0,161)	* ** #	247,6 (220,0; 293,2)	* **	0,248 (0,219; 0,283)	* **
Ф30ПВС60	0,193 (0,145; 0,229)	* ** #	236,9 (206,2; 255,9)	* **	0,524 (0,480; 0,694)	* ** ##

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с a. mammaria; ** — $p < 0,05$ по сравнению с Ф30; # — $p < 0,05$ по сравнению с взаимопрони- кающей полимерной сетью Ф30ПВС15; ## — $p < 0,05$ по сравнению с взаимопрони- кающей полимерной сетью Ф30ПВС30. Количес- венные данные представлены в виде медианы и 1-го и 3-го квартилей (Me (Q1; Q3)).

ности определяет количество сайтов клеточной ад- гезии (количество клеток) и создает условия для поддержания жизнедеятельности клеток (пролифе- ративная и метаболическая активность). Если рас- сматривать с этой позиции, то поведение клеток на образцах становится хорошо предсказуемым. По- верхность IPN Ф30ПВС15 содержала максимальное количество фибрина, что подтверждается гистоло- гией и результатами инфракрасной спектроскопии. Соответственно, эта группа образцов демонстриро- вала лучшие биологические характеристики (коли- чество клеток, пролиферативная и метаболическая активность), сравнимые с чистым фибрином. На по- верхности Ф30ПВС30 определялось меньше фибри- на, чем Ф30ПВС15, и минимальное количество, а ме- стами и полное отсутствие фибрина на поверхности Ф30ПВС60. Соответственно, поверхности образцов Ф30ПВС30 и Ф30ПВС60 были лучше заселены клет- ками по сравнению с ПВС30 и -60, но количество клеток оставалось низким, так же как биологиче- ская привлекательность (пролиферативная и ме- таболическая активность). Следует отметить, что чистый ПВС и IPN-гидрогель не обладали цитоток- сичностью и об этом свидетельствует высокая жиз- неспособность адгезированных клеток.

Предложенный нами вариант усиления проч- ности фибрина путем сополимеризации с ПВС ме- тодом криоструктурирования имел особенности и ограничения. К сожалению, он не позволил до-

биться механических характеристик, сравнимых с a. mammaria человека. Однако ПВС в concentra- ции 30 мг/мл и более в составе IPN смог значимо улучшить механические свойства фибрина. Отрица- тельным результатом признаны ПВС15 и соответст- вующий IPN Ф30ПВС15, у которых прочность на раз- рыв и жесткость не отличались от фибрина.

Каркасные свойства ПВС в концентрациях 30 и 60 мг/мл существенно повысили резистентность соответствующих IPN-гидрогелей Ф/ПВС к усадке. Образцы ПВС60 и IPN Ф30ПВС60 не подвергались усадке и сохраняли объем. IPN Ф30ПВС30 после от- мывания немного уменьшился в объеме, однако каркасность ПВС30 препятствовала значимой ре- тракции фибрина. Каркасные свойства ПВС15 ока- зались недостаточны из-за неполной полимериза- ции. После отмывания матрицы ПВС15 теряли до трети объема за счет выхода в раствор неполимери- зованного ПВС. Присутствие неполимеризованных молекул ПВС подтверждает рентгеноструктурный анализ, обнаруживая меньшую кристалличность образцов ПВС15.

Таким образом, концентрация ПВС более 15 мг/мл в структуре IPN Ф/ПВС улучшает прочность, эластич- ность и жесткость гидрогеля, формирует резистент- ность к усадке, что облегчает использование мате- риала для создания тканеинженерных конструкций заданной формы. Однако повышение прочност- ных характеристик IPN Ф/ПВС сопровождается

снижением биологической привлекательности гидрогеля. Предложенный метод полимеризации позволяет максимально сохранить биологические, улучшить каркасные и механические свойства фибрина при концентрации ПВС в диапазоне более 15 и менее 60 мг/мл.

На данном этапе разработки применение полученного IPN Ф/ПВС ограничено модифицирующим покрытием для протезов сосудов малого диаметра, поскольку его прочность значительно уступает а. татмариа. Предложенный подход к полимеризации IPN-гидрогеля Ф/ПВС требует доработки. Возможным вариантом улучшения биологических свойств матриц может стать повышение концентрации фибриногена в преципитате [37], а увеличения прочности и жесткости ПВС — повышение молекулярной массы линейного ПВС, увеличение количества криоциклов [38], формирование дополнительных химических швов в структуре ПВС при полимеризации [39].

Заключение

Предложенный способ последовательной полимеризации фибрина и ПВС в концентрации более 15 и менее 60 мг/мл позволяет получать IPN-гидрогели с резистентностью к усадке, улучшенными механическими и удовлетворительными биологическими свойствами, однако недостаточная прочность материала ограничивает его использование рамками модифицирующего покрытия протезов сосудов малого диаметра.

Список литературы / References

1. Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C., Michalopoulos E. Future perspectives in small-diameter vascular graft engineering. *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(4):160. PMID: 33321830; PMCID: PMC7763104. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040160>
2. Zizhou R., Wang X., Houshyar S. Review of polymeric biomimetic small-diameter vascular grafts to tackle intimal hyperplasia. *ACS Omega*. 2022;7(26):22125-22148. PMID: 35811906; PMCID: PMC9260943. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01740>
3. Chlupáč J., Filová E., Riedel T., Houska M., Brynda E., Remy-Zolghadri M., Bareille R., Fernandez P., Daculsi R., Bourget C., Bordenave L., Bačáková L. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res*. 2014;63(2):167-177. PMID: 24397801. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932577>
4. Morin K.T., Tranquillo R.T. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp Cell Res*. 2013;319(16):2409-2417. PMID: 23800466; PMCID: PMC3919069. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.006>
5. Матвеева В.Г., Сенокосова Е.А., Ханова М.Ю., Глушкова Т.В., Антонова Л.В. Влияние способа полимеризации на свойства фибриновых матриц (пилотное исследование *in vitro*). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2022;11(45):134-145. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-45-134-145>
Matveeva V.G., Senokosova E.A., Khanova M.Yu., Glushkova T.V., Antonova L.V. Influence of the polymerization method on the properties of fibrin matrices. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2022;11(45):134-145. (In Russ.) <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-45-134-145>
6. 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>
Matveeva V.G., Khanova M.U., Antonova L.V., Barbarash L.S. Fibrin — a promising material for vascular tissue engineering. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020;22(1):196-208. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-196-208>
7. Mironi-Harpaz I., Zigeron S., Seliktar D. Fibrin-based hydrogel scaffolds for controlling cell-matrix interaction in vascular tissue engineering. *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine*. 2014;1(1):28-37. <https://doi.org/10.24411/2409-2568-2014-00004>
8. Akpalo E., Bidault L., Boissière M., Vancaeyzeele C., Fichet O., Laretta-Garde V. Fibrin-polyethylene oxide interpenetrating polymer networks: new self-supported biomaterials combining the properties of both protein gel and synthetic polymer. *Acta Biomater*. 2011;7(6):2418-2427. PMID: 21382527. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.002>
9. Deneufchâtel M., Larreta-Garde V., Fichet O. Polyethylene glycol-albumin/fibrin interpenetrating polymer networks with adaptable enzymatic degradation for tissue engineering applications. *Polym Degrad Stab*. 2018;152:218-227. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.04.023>
10. Gsib O., Duval J.-L., Goczkowski M., Deneufchâtel M., Fichet O., Larreta-Garde V., Bencherif A.S., Egles C. Evaluation of fibrin-based interpenetrating polymer networks as potential biomaterials for tissue engineering. *Nanomaterials*. 2017;7(12):436. PMID: 29232876; PMCID: PMC5746926. <https://doi.org/10.3390/nano7120436>
11. Bidault L., Deneufchâtel 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. PMID: 24050436. <https://doi.org/10.1021/bm400991k>
12. Bidault L., Deneufchâtel 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>
13. Ma S., Wang S., Li Q., Leng Y., Wang L., Hu G.-H. A novel method for preparing poly(vinyl alcohol) hydrogels: preparation, characterization, and application. *Ind Eng Chem Res*. 2017;56(28):7971-7976. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01812>
14. Stauffer S.R., Peppast N.A. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Polymer*. 1992;33(18):3932-3936. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90385-A](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90385-A)

15. Shipp D.A. Reversible-deactivation radical polymerizations. *Polym Rev.* 2011;51(2):99-103. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.566406>
16. Millon L.E., Nieh M.-P., Hutter J.L., Wan W.K. SANS Characterization of an anisotropic poly(vinyl alcohol) hydrogel with vascular applications. *Macromolecules.* 2007;40(10):3655-3662. <https://doi.org/10.1021/ma062781f>
17. Kumar A., Han S.S. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2017;66(4):159-182. <https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930>
18. Jiang S., Liu S., Feng W. PVA hydrogel properties for biomedical application. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(7):1228-1233. PMID: 21783131. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>
19. Jiang Y., Schädlich A., Amado E., Weis C., Odermatt E., Mäder K., Kressler J. *In vivo* studies on intraperitoneally administrated poly(vinyl alcohol). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;93(1):275-284. PMID: 20119945. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31585>
20. Wang B.H., Campbell G. Formulations of polyvinyl alcohol cryogel that mimic the biomechanical properties of soft tissues in the natural lumbar intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009;34(25):2745-2753. PMID: 19940732. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181b4abf5>
21. Bourke S.L., Al-Khalili M., Briggs T., Michniak B.B., Kohn J., Poole-Warren L.A. A photo-crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel growth factor release vehicle for wound healing applications. *AAPS PharmSci.* 2003;5(4):E33. PMID: 15198521; PMCID: PMC2750995. <https://doi.org/10.1208/ps050433>
22. Barrett D.A., Hartshome M.S., Hussain M.A., Shaw P.N., Davies M.C. Resistance to nonspecific protein adsorption by poly(vinyl alcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. *Anal Chem.* 2001;73(21):5232-5239. PMID: 11721924. <https://doi.org/10.1021/ac010368u>
23. Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv Polym Sci.* 2000;153:37-65. https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2
24. Dragan E.S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chem Eng J.* 2014;243:572-590. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.065>
25. Pohan G., Chevallier P., Anderson D.E.J., Tse J.W., Yao Y., Hagen M.W., Mantovani D., Hinds M.T., Yim E.K.F. Luminal plasma treatment for small diameter polyvinyl alcohol tubular scaffolds. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:117. PMID: 31192200; PMCID: PMC6541113. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00117>
26. Wan W., Dawn Bannerman A., Yang L., Mak H. Poly(vinyl alcohol) cryogels for biomedical applications. *Adv Polym Sci.* 2014;263:283-321. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05846-7_8
27. Chaouat M., Le Visage C., Baille W.E., Escoubet B., Chaubet F., Mateescu M.A., Letourneur D. A novel cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for vascular grafts. *Adv Funct Mater.* 2008;18(19):2855-2861. <https://doi.org/10.1002/adfm.200701261>
28. Cutiongco M.F.A., Kukumberg M., Peneyra J.L., Yeo M.S., Yao J.Y., Rufaihah A.J., Le Visage C., Ho J.P., Yim E.K.F. Submillimeter diameter poly(vinyl alcohol) vascular graft patency in rabbit model. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4:44. PMID: 27376059; PMCID: PMC4896917. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00044>
29. Gupta S., Greeshma T., Basu B., Goswami S., Sinha A. Stiffness- and wettability-dependent myoblast cell compatibility of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(2):346-354. PMID: 23165741. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32845>
30. Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Глушкова Т.В., Антонова Л.В. Влияние различных концентраций фибриногена на свойства фибриновой матрицы для тканевой сосудистой инженерии. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2021;29(1):21-34. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ202129121-34>
Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Glushkova T.V., Antonova L.V. Influence of different concentrations of fibrinogen on the properties of a fibrin matrix for vascular tissue engineering. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2021;29(1):21-34. (In Russ.) <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ202129121-34>
31. Brown E.E., Zhang J., Laborie M.-P.G. Never-dried bacterial cellulose/fibrin composites: preparation, morphology and mechanical properties. *Cellulose.* 2011;18(3):631-641. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9500-8>
32. Blat A., Dybas J., Chrabaszc K., Bulat K., Jaształ 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(1):15475. PMID: 31664105; PMCID: PMC6820737. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51932-0>
33. 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 (Basel).* 2021;13(15):2459. PMID: 34372062; PMCID: PMC8347342. <https://doi.org/10.3390/polym13152459>
34. 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. PMID: 28773763; PMCID: PMC5509094. <https://doi.org/10.3390/ma9080644>
35. Lee H., Yamaguchi K., Nagaishi T., Murai M., Kim M., Wei K., Zhang K.-Q., Kim I.S. Enhancement of mechanical properties of polymeric nanofibers by controlling crystallization behavior using a simple freezing/thawing process. *RSC Advances.* 2017;7:43994-44000. <https://doi.org/10.1039/C7RA06545K>
36. Ino J.M., Chevallier P., Letourneur D., Mantovani D., Le Visage C. Plasma functionalization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for cell adhesion enhancement. *Biomater.* 2013;34(4):e25414. PMID: 23989063; PMCID: PMC3825233. <https://doi.org/10.4161/biom.25414>
37. Chiu C.L., Hecht V., Duong H., Wu B., Tawil B. Permeability of three-dimensional fibrin constructs corresponds to fibrinogen and thrombin concentrations. *Biores Open Access.* 2012;1(1):34-40. PMID: 23515363; PMCID: PMC3559212. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0211>
38. du Toit J.-P., Pott R.W.M. Transparent polyvinyl-alcohol hydrogel as immobilisation matrix for continuous biohydrogen production by phototrophic bacteria. *Biotechnol Biofuels.* 2020;13:105. PMID: 32536970; PMCID: PMC7285740. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01743-7>
39. Sau S., Pandit S., Kundu S. Crosslinked poly (vinyl alcohol): Structural, optical and mechanical properties. *Surfaces and Interfaces.* 2021;25:101198. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101198>

Structure and properties of fibrin/polyvinyl alcohol interpenetrating polymer network hydrogel as a modifying coating for small-diameter vascular grafts

Vera G. Matveeva¹, Maria A. Rezvova¹, Tatyana V. Glushkova¹, Anastasiya V. Sergeeva², Evgeniya O. Krivkina¹, Larisa V. Antonova¹, Leonid S. Barbarash¹

¹ Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Corresponding author: Vera G. Matveeva, matveeva_vg@mail.ru

Abstract

Background: Interpenetrating polymer network (IPN) hybrid hydrogels enable regulating their properties by varying the composition and concentration of their components. Fibrin is an available natural polymer with ideal biological properties but low strength and tendency to retraction. Polyvinyl alcohol hydrogels are stable, comparable in strength to biological tissues but bioinert. Fibrin/polyvinyl alcohol (F/PVA) IPN can overcome the shortcomings of each component and create an improved material for tissue engineering.

Objective: To assess the possibility of and conditions for obtaining a homogeneous IPN by subsequent fibrin polymerization and polyvinyl alcohol cryostructuring while preserving as much as possible mechanical and biological properties beneficial for tissue engineering.

Methods: F/PVA IPN was obtained by subsequent fibrin polymerization (30 mg/mL) and polyvinyl alcohol cryostructuring (15, 30, and 60 mg/mL). We studied the structure using a scanning electron microscope, histology, infrared spectroscopy, and X-ray diffraction analysis. We tested mechanical properties and shrinkage of the samples. Biological features were assessed *in vitro* in terms of viability, cell count, proliferative and metabolic activity of EA.hy926 endothelial cell culture.

Results: Our study found the maximum amount of fibrin on the surface of F30PVA15 IPN and its minimum amount on the surface of F30PVA60. These results were supported by the high biological appeal of F30PVA15 compared with F30PVA30 and F30PVA60. F30PVA60 hydrogels demonstrated shrinkage resistance compared to the template; F30PVA30 and F30PVA15 samples decreased by 1.4 and 2.5 times, respectively. Although the mechanical strength of all monocomponent hydrogels and IPN samples did not compare to that of the internal thoracic vein, F30PVA30 and F30PVA60 demonstrated better results than F30PVA15 and fibrin alone.

Conclusion: Our method allows obtaining shrink-resistant IPN hydrogels with improved mechanical and tolerable biological properties at polyvinyl alcohol concentrations of > 15 mg/mL and < 60 mg/mL. However, the insufficient strength of this material limits its use in vascular engineering to a modifying coating.

Keywords: Fibrin; Hydrogels; Polymerization; Polymers; Polyvinyl; Tissue Engineering

Received 25 January 2023. Revised 17 March 2023. Accepted 29 March 2023.

Funding: This research was funded by the complex program of basic research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the basic research topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0419-2022-0001 "Molecular, cellular and biomechanical mechanisms of the pathogenesis of cardiovascular diseases in the development of new treatment methods based on personalized pharmacotherapy, minimally invasive medical devices, biomaterials and tissue-engineered implants".

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

Contribution of the authors

Conception and study design: V.G. Matveeva, M.A. Rezvova

Data collection and analysis: V.G. Matveeva, M.A. Rezvova, T.V. Glushkova, E.O. Krivkina, A.V. Sergeeva

Statistical analysis: V.G. Matveeva, M.A. Rezvova, T.V. Glushkova, A.V. Sergeeva. Drafting the article: V.G. Matveeva

Critical revision of the article: V.G. Matveeva, M.A. Rezvova, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

Final approval of the version to be published: V.G. Matveeva, M.A. Rezvova, T.V. Glushkova, A.V. Sergeeva, E.O. Krivkina, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

ORCID

V.G. Matveeva, <https://orcid.org/0000-0002-4146-3373>

M.A. Rezvova, <https://orcid.org/0000-0002-4405-8904>

T.V. Glushkova, <https://orcid.org/0000-0003-4890-0393>

E.O. Krivkina, <https://orcid.org/0000-0002-2500-2147>

L.V. Antonova, <https://orcid.org/0000-0002-8874-0788>

L.S. Barbarash, <https://orcid.org/0000-0001-6981-9661>

Copyright: © 2023 Matveeva et al.

How to cite: Matveeva V.G., Rezvova M.A., Glushkova T.V., Sergeeva A.V., Krivkina E.O., Antonova L.V., Barbarash L.S. Structure and properties of fibrin/polyvinyl alcohol interpenetrating polymer network hydrogel as a modifying coating for small-diameter vascular grafts. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2023;27(2):74-86. (In Russ.) <https://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2023-2-74-86>

