Страхова Лариса Анатольевна, Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии; адрес: Российская Федерация, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 20; тел.: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Колесова Сергей Алексеевич, Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии; адрес: Российская Федерация, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 20; тел.: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Потапова Ирина Александровна, Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии; адрес: Российская Федерация, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 20; тел.: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Орлов Андрей Львович, Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии; адрес: Российская Федерация, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 20; тел.: +7(831) 419-61-94; e-mail: recept@nniigr.ru

Чумаков Никита Викторович, Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии; адрес: Российская Федерация, 603950, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 20; тел.: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Larisa A. Strakhova, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7 (831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Sergey A. Kolesov, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7 (831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Irina A. Potapova, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Andrey L. Orlov, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Nikita V. Chumakov, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Поступила 25.05.2017 г.

Принята к печати 10.10.2017 г.

Author information

Rofail' S. Rakhmanov, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology; Address: 20, Semashko Str., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950; Phone: +7(831) 4196194; e-mail: recept@nniigr.ru

Tat'yana V. Blinova, Nizhny Novgorod research institute for hygiene and occupational pathology;

© АНТОНОВА Л. В., КРИВКИНА Е. О., СЕВОСТЬЯНОВА В. В., ВЕЛИКАНОВА Е. А., МАТВЕЕВА В. Г., МИРОНОВ А. В., БУРАГО А. Ю., БАРБАРАШ Л. С.

УДК: 616.13-77:615.461:577.11]-092.9

DOI: 10.20333/2500136-2017-6-85-93

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОАКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В СОЗДАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Л. В. Антонова, Е. О. Кривкина, В. В. Севостьянова, Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева, А. В. Миронов, А. Ю. Бураго, Л. С. Барбараш
Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово 650002, Российская Федерация

Цель исследования. Провести сравнительную оценку ремоделирования in vivo сосудистой ткани на основе графтов малого диаметра, изготовленных из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона, немодифицированных и модифицированных комплексом ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул – сосудистым эндотелиальным фактором роста, основным фактором роста фибробластов и стромальным фактором SDF-1α (GFmix).

Материал и методы. Биodeградируемые графты изготавливали методом электроспиннинга. Комплекс ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул инкорпорировали в состав графтов в процессе двухфазного электроспиннинга. Графты имплантировали в брюшную часть аорты крыс на 1, 3, 6 и 12 месяцев. После эксплантации исследование образцов проводили гистологическим, иммуногистохимическим и иммунофлуоресцентными методами

Результаты. Сосудистые графты с GFmix были полностью проходимы как через 1 месяц, так и 12 месяцев имплантации, что в 2 раза превышало проходимость немодифицированных образцов. На внутренней поверхности графтов с GFmix через 1 месяц имплантации образовывалась тонкая неинимальная выстилка, покрытая монослоем эндотелиальных клеток, состоявшем из зрелых (CD31+/CD34-) и прогениторных (CD31+/CD34+) эндотелиальных клеток, синтезировавших фактор фон Виллебранда (vWF+). Эндотелиальный монослой в графтах сохранялся до конца эксперимента. Количество фибробластоподобных и гладкомышечных клеток в толще стенок и коллагена IV на внутренней поверхности сосудистых графтов с GFmix превышали данные показатели немодифицированных графтов на всех этапах эксперимента.

Заключение. Послойное инкорпорирование биологически активных молекул в биodeградируемые сосудистые графты способствовало не только ускорению образования на месте графтов ткани de novo, но и стимулировало формирование структурных элементов, схожих по строению с нативным сосудом.

Ключевые слова: поликапролактон, полигидроксibuтират/валерат, электроспиннинг, сосудистый графт, сосудистый эндотелиальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов, стромальный фактор 1 альфа.

Для цитирования: Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Севостьянова ВВ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ, Миронов АВ, Бураго АЮ, Барбараш ЛС. Эффективность использования биоактивных молекул в создании функциональных биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра. *Сибирское медицинское обозрение*. 2017;(6): 85-93. DOI: 10.20333/2500136-2017-6-85-93

EFFICIENCY OF USING BIOACTIVE MOLECULES IN CREATION OF FUNCTIONAL BIODEGRADATED VASCULAR GRAFTS OF SMALL DIAMETER

L. V. Antonova, E. O. Krivkina, V. V. Sevostyanova, E. A. Velikanova, V. G. Matveeva, A. V. Mironov, A. Yu. Burago, L. S. Barbarash
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo 650002, Russian Federation

The aim of the research. To conduct a comparative evaluation of vascular tissue remodeling in vivo based on small-diameter grafts made from

polyhydroxybutyrate / valerate and polycaprolactone, unmodified and modified by a complex of growth factors and chemoattractant molecules - vascular endothelial growth factor, the main fibroblast growth factor and the stromal factor SDF-1 α (GFmix).

Material and methods. Biodegradable grafts were made by the method of electrospinning. A complex of growth factors and chemoattractant molecules were incorporated into the graft composition during the two-phase electrospinning process. Grafts were implanted into the abdominal part of the aorta of rats at 1, 3, 6 and 12 months. After the explantation, the samples were examined by histological, immunohistochemical and immunofluorescent methods.

Results. Vascular grafts with GFmix were completely passable as in 1 month so in 12 months of implantation, which was 2 times greater than the passability of unmodified samples. On the inner surface of grafts with GFmix, after 1 month of implantation, a thin neoimimal lining was formed, covered with a monolayer of endothelial cells consisting of mature (CD31 + / CD34-) and progenitor (CD31 + / CD34 +) endothelial cells synthesizing von Willebrand's phaketter (vWF +). The endothelial monolayer in the grafts was preserved until the end of the experiment. The number of fibroblast-like and smooth muscle cells in the wall thickness and collagen IV on the inner surface of vascular grafts with GFmix exceeded these indices of unmodified grafts at all stages of the experiment.

The conclusion. The layered incorporation of biologically active molecules into biodegradable vascular grafts not only facilitated the formation of de novo tissue in situ, but also stimulated the formation of structural elements similar in structure to the native vessel.

Key words: polycaprolactone, polyhydroxybutyrate / valerate, electrospinning, vascular graft, vascular endothelial growth factor, main fibroblast growth factor, stromal factor 1 alpha.

Citation: Antonova LV, Krivkina EO, Sevostyanova VV, Velikanova EA, Matveeva VG, Mironov AV, Burago AYU, Barbarash LS. Efficiency of using bioactive molecules in creation of functional biodegradable vascular grafts of small diameter. *Siberian Medical Review*. 2017;(6): 85-93. DOI: 10.20333/2500136-2017-6-85-93

Введение

Одной из нерешенных проблем в кардиохирургии является отсутствие протезов для замещения артерий малого диаметра [1]. Возможный путь решения данной проблемы – создание сосуда непосредственно в организме на основе биodeградируемого сосудистого графта, обладающего высокой биосовместимостью, гемосовместимостью и атромбогенностью [2]. Существует дополнительная возможность инкорпорировать в состав сосудистого графта биологически активные вещества, способствующие ранней эндотелизации внутренней поверхности и скорейшему формированию новообразованной ткани в зоне локации графта.

Метод электроспиннинга – универсальный метод для изготовления нано/микромасштабных волокон, которые обладают большим потенциалом для имитации микроархитектоники природного внеклеточного матрикса. К достоинствам метода электроспиннинга относятся относительная простота технологического процесса и эффективный контроль над его ключевыми параметрами, а также возможность инкорпорировать в матриксы, изготавливаемые методом электроспиннинга, биологически активные компоненты без изменения структуры и функциональной активности последних [3, 4, 5].

Общепринятой является точка зрения, что полноценная адгезия эндотелиальных клеток к полимерному каркасу является важной стадией раннего образования эндотелиального монослоя, что в последующем предотвращает гиперплазию интимы и тромбоз [7, 8]. В последние годы было разработано множество стратегий для улучшения или придания полимерным поверхностям способности селективно адгезировать эндотелиальные клетки с целью ускорения эндотелизации. Большинство из них заключаются в иммобилизации или фиксации на поверхность специфических белков клеточной адгезии и биоактивных пептидов

[7, 9]. Для стимуляции эндотелизации графтов используют сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), так как он является важнейшим регулятором развития сосудов в эмбриогенезе, а также их формирования во взрослом организме [10, 11, 12]. VEGF индуцирует миграцию, пролиферацию и выживание эндотелиальных клеток, выработку оксида азота, сосудистую проницаемость и модулирует экспрессию генов [7, 13]. Признанным является постулат, что эндотелизация сосудистых графтов именно *in situ*, а не *in vitro*, обеспечивает функциональную полноценность формирующегося эндотелиального монослоя и, как следствие, проходимость сосудистых графтов [9, 14].

Тем не менее, в управлении процессами ремоделирования тканей в целом, и поддержания жизнеспособности и метаболической активности эндотелиальных клеток в частности, участвуют различные дифференцировочные молекулы. Основным фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, bFGF) ответственен за стимуляцию роста эндотелиальных клеток и организацию их в трубчатую структуру. bFGF ускоряет ангиогенез за счёт роста новых кровеносных сосудов из уже существующей сосудистой сети, а также осуществляет хемотаксис, активацию и пролиферацию фибробластов, участвующих в репарации в очаге воспаления [15, 16, 17]. Стромальный фактор (stromal cell-derived factor 1 alpha, SDF-1 α) является хемоаттрактантной молекулой, привлекающей эндотелиальные прогениторные клетки из костного мозга, участвует в различных этапах пролиферации эндотелиальных клеток, препятствуя их апоптозу и стимулируя формирование капиллярной трубки [18, 19, 20]. Помимо этого, SDF-1 α способствует миграции мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, которые экспрессируют CXCR4 (рецептор для SDF-1 α /CXCL12) и могут дифференцироваться в гладкомышечные клетки внутри стенки графта [21, 22].

Поэтому совместная доставка нескольких ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул с различными свойствами в зону имплантации сосудистого протеза может обеспечить полноценность стимуляции и регуляции формирования тканей стенки кровеносного сосуда на месте временного биодеградируемого каркаса.

Целью исследования явилась сравнительная оценка ремоделирования *in vivo* сосудистой ткани на основе графтов малого диаметра, изготовленных из полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона, немодифицированных и модифицированных комплексом ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул – сосудистым эндотелиальным фактором роста, основным фактором роста фибробластов и хемоаттрактантной молекулой SDF-1 α .

Материал и методы

Изготовление графтов. Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм изготавливали методом электроспиннинга на установке NANON-01A (МЕСС, Япония) из смеси 10 %-го поликапролактона (poly(ϵ -caprolactone), PCL, Sigma–Aldrich, США) и 5 %-го полигидроксибутирата/валерата (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV, Sigma–Aldrich, США) в хлороформе. Полученный раствор использовали для изготовления графтов при следующих условиях электроспиннинга: игла для подачи раствора – 22 G, напряжение – 20 кВ, скорость подачи раствора – 0,3 мл/ч, расстояние до коллектора – 150 мм, коллектор – штифт диаметром 2 мм.

Функционально активные графты (PHBV/PCL/GFmix) изготавливали с послойным введением рекомбинантного VEGF (Sigma–Aldrich, США) во внутреннюю 1/3 стенки, а также смеси рекомбинантного bFGF крысы (Sigma–Aldrich, США) и рекомбинантного SDF-1 α крысы (Sigma–Aldrich, США) во внешние 2/3 стенки графта. Для этого внутреннюю 1/3 стенки графта изготавливали из суспензии PHBV/PCL с раствором 10 мкг/мл VEGF в фосфатно-солевом буфере (PBS, Invitrogen, США) в соотношении 20:1 методом электроспиннинга при напряжении 23 кВ, с использованием иглы 27G и остальных условиях как описано выше. При изготовлении внешних 2/3 стенки электроспиннинг продолжали на игле 22G с эмульсией (20:1) из раствора PHBV/PCL со смесью 20 мкг/мл bFGF и 20 мкг/мл SDF-1 α в PBS. Конечная концентрация каждого вида биомолекул составила 500 нг/мл полимерного раствора.

PHBV/PCL графты, не содержащие ростовые факторы и хемоаттрактантные молекулы, использовали в качестве контроля.

Имплантация *in vivo*. Графты PHBV/PCL и PHBV/PCL/GFmix имплантировали в брюшную аорту самцов крыс популяции Wistar (n=32) на 1, 3, 6 и 12 ме-

сяцев. Все процедуры осуществляли, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Животных вводили в наркоз 3 % изофлюраном, во время проведения операции использовали ингаляционный наркоз 1,5 % изофлюрана. Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм и длиной 10 мм, стерилизованные этилен оксидом, имплантировали в брюшную часть аорты крыс. Для этого осуществляли срединную лапаротомию, открывали забрюшинное пространство и выделяли аорту. Далее аорту пережимали ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Проксимальный анастомоз выполняли с использованием шовного материала 8-0. Графт промывали и аорту повторно пережимали. Дистальный анастомоз выполняли подобным образом. После имплантации разрез ушивали послойно.

Животных с графтами PHBV/PCL и PHBV/PCL/GFmix выводили из эксперимента через 1, 3, 6 и 12 месяцев (n=4 в каждой группе). Графты выделяли с участками прилежащей аорты и делили на две части. Одну часть замораживали при -140 °C для последующего проведения иммунофлуоресцентного анализа. Вторую часть фиксировали в 10 % забуференном формалине (Electron Microscopy Sciences) в течение 24 часов при температуре 4 °C, после чего осуществляли гистологическое и гистохимическое исследования.

Гистологическое исследование. Эксплантированные образцы, фиксированные в формалине, дегидратировали в изопропанол в течение 30 часов при 4 °C, далее отмывали в дистиллированной воде, заключали в парафин (Electron Microscopy Sciences, США), изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм и помещали их на предметные стекла для микроскопии. Для депарафинизации срезы нагревали до 60 °C в течение 20 мин, после чего последовательно погружали в трех порциях ксилола (Electron Microscopy Sciences, США) на 10 минут, 100, 95, 70, 50, 30 % растворы этанола, в каждый по 1 минуте, физиологический раствор – 2 минуты, фосфатно-солевой буфер на две минуты, и отмывали проточной водой. Окраску гематоксилином и эозином осуществляли погружением срезов в раствор гематоксилина Харриса (Electron Microscopy Sciences, США) на 1 минуту, отмывали проточной водой и далее помещали в 1 % раствор эозина Y (Electron Microscopy Sciences, США) на 1 минуту, отмывали проточной водой, дегидратировали в растворах этилового спирта с последовательным увеличением концентрации (50, 70, 80, дважды 95 %, и дважды 100 %), и затем дважды обрабатывали ксилолом. Полученные препараты изучали методом световой микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистохимическое исследование. Для проведения иммуногистохимической реакции использовали

набор Spring (Spring Bioscience, США) и кроличьи антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -smooth muscle actin, α -SMA) (Spring bioscience, США). Парафиновые срезы эксплантированных графтов толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла (Bio optica, Италия) с полилизинным покрытием. Депарафинизацию срезов проводили в трех порцияхксилола в течение 10 мин при 37 °С. Далее проводили высокотемпературную демаскировку антигенов в цитратном буфере (0,01 М, pH 6,0). Далее на срезы наносили ингибитор эндогенной пероксидазы (Hydrogen Peroxidase Block) в течение 10 мин, после чего срезы промывали в 2-х порциях фосфатного буфера (0,01 М, pH 7,4) по 5 мин. Для снижения неспецифической окраски использовали полимерный блок (Protein Block) в течение 10 мин с последующей промывкой в 2-х порциях фосфатного буфера (0,01 М, pH 7,4) по 5 мин. Далее на срезы наносили по 50 мкл первичных антител к α -SMA и инкубировали во влажной камере в течение 1 часа. По завершению этапа инкубации срезы обрабатывали биотинилированными анти-кроличьими вторичными антителами. После промывки в фосфатном буфере (0,01 М, pH 7,4) наносили стрептавидин-пероксидазный комплекс (Polymer Block), а также хромоген – диаминобензидин. Реакцию останавливали помещением срезов в дистиллированную прохладную воду, после чего докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадском бальзаме. Препараты изучали с помощью светового микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентное исследование. Из замороженных образцов с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 8 мкм и на стекла, покрытые L-полилизин (Menzel, Германия). Для блокировки неспецифического связывания срезы инкубировали в 1 % растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma-aldrich, США) в PBS (pH 7,4; Invitrogen, США) в течение 1 часа. Далее наносили смесь неконъюгированных первичных антител: антитела мыши к CD31 крысы (ab119339, Abcam, Великобритания) и антитела кролика к CD34 крысы (ab185732, Abcam, Великобритания), или антитела мыши к коллагену I крысы (ab28028, Abcam, Великобритания) и антитела кролика к коллагену IV крысы (ab6586, Abcam, Великобритания), или антитела к фактору фон Виллебранда, конъюгированные с FITC (ab8822, Abcam, Великобритания). Срезы инкубировали при температуре +4 °С в течение ночи. Затем в случае неконъюгированных первичных антител на срезы наносили смесь вторичных антител: антитела козы к Ig мыши, конъюгированные с AlexaFluor568 (ab175473, Abcam, Великобритания) и антитела осла к Ig кролика, конъюгированные с AlexaFluor488 (ab150105, Abcam, Великобритания) и

инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Автофлуоресценцию удаляли с помощью реагента Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, США) согласно инструкции производителя. Срезы докрашивали ядерным красителем DAPI (Sigma-aldrich, США) в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. Готовые срезы заключали в ProLong (Life Technologies, США) под покровное стекло. Полученные препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Вследствие небольшой выборки (по 4 графта на точку вывода) данные представлены в виде процентного соотношения. Остальные результаты имели качественный характер и не подвергались статистической обработке.

Результаты и обсуждение

Монослой эндотелиальных клеток, гладкомышечный слой, волокна коллагена, эластина и других белков внеклеточного матрикса являются основными компонентами стенки кровеносного сосуда. Общепризнанным является то, что сформированный непрерывный эндотелиальный слой на внутренней поверхности сосудистых имплантатов препятствует тромбообразованию, в то время как слой гладкомышечных клеток и организованная структура межклеточного матрикса с достаточным содержанием коллагена и эластина, обеспечивают сократимость стенки и строение близкое к нативным артериям, что обеспечивает оптимальную комплаентность стенки. Следовательно, быстрая эндотелизация, формирование слоя гладкомышечных клеток, и большое количество клеток, продуцирующих межклеточный матрикс являются решающими факторами, обеспечивающими высокий уровень первичной проходимости сосудистых графтов [2, 5, 6].

Инкорпорирование ростовых факторов в полимерные тканеинженерные матриксы, методом электроспиннинга, представляет собой перспективный подход для создания материалов, способных привлекать на свою поверхности клетки, а также стимулировать их адгезию, пролиферацию и жизнеспособность. Ранее в экспериментах *in vivo* нами была доказана сохранность биологической активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в изолированном варианте в биodeградируемые полимерные матриксы [23]. При создании биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра с целью формирования эндотелиального монослоя посредством как привлечения эндотелиальных прогениторных клеток из кровотока, так и усиления миграции зрелых эндотелиальных клеток из зон анастомозов, VEGF был инкорпорирован во внутреннюю треть стенки графтов. bFGF и SDF-1a в совокупности были

введены в состав наружных 2/3 стенки графтов с целью привлечения в эту зону фибробластоподобных и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для формирования клеточной стенки будущего сосуда, который должен будет сформироваться после полного рассасывания полимерного каркаса (рис. 1).

Рисунок 1. Вид биодеградируемых сосудистых графтов до и после имплантации.

В ходе эксперимента с имплантацией сосудистых графтов PNBV/PCL и PNBV/PCL/GFmix в брюшную аорту крыс все животные дожили до предполагаемых контрольных точек. При эксплантации графтов через 1, 3, 6 и 12 месяцев не было обнаружено кровоизлияний, а также повреждений и аневризм стенки имплантатов.

Гистологическое исследование экспантированных графтов показало, что графты PNBV/PCL/GFmix были полностью проходимы как через 1, так и 12 месяцев имплантации, что в 2 раза превышало проходимость немодифицированных PNBV/PCL образцов, на внутренней поверхности которых в 50 % - 75 % случаев в зависимости от срока эксперимента выявлены пристеночные тромбы, перекрывавшие большую часть просвета графтов (рис. 2).

Рисунок 2. Результаты имплантации биодеградируемых сосудистых графтов малого диаметра PNBV/PCL/GFmix и PNBV/PCL, окраска гематоксилин-эозин, ув. х 50.

О сбалансированности послойного введения ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул и их функциональной активности в составе биодеградируемого трубчатого матрикса свидетельствовало ускорение образования эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистых графтов

PNBV/PCL/GFmix, который начинал активно формироваться уже через 1 месяц имплантации. При этом эндотелиальные клетки имели переходный фенотип (CD31+/CD34+), что свидетельствовало о том, что эндотелизация внутренней поверхности графтов происходила как за счет зрелых эндотелиальных клеток, так и за счет прогениторных клеток гемопоэтического происхождения, которые привлекались из кровотока, а после адгезии к поверхности графта начинали дифференцироваться в эндотелиальные клетки (рис. 3).

Рисунок 3. Результаты иммунофлуоресцентной и иммуногистохимической окраски графтов PNBV/PCL/GFmix на разных сроках имплантации. Иммунофлуоресценция: CD31 – красное свечение цитоплазмы эндотелиальных клеток (ув. х 630); CD 34 – зеленое свечение цитоплазмы прогениторных клеток (ув. х 630); vWF – фактор фон Виллебранда, зеленое свечение цитоплазмы клеток (ув. х 200); DAPI – окраска ядер клеток в синий цвет; Collagen IV – зеленое свечение волокон (ув. х 200). Иммуногистохимия: α-актин – коричневое окрашивание цитоплазмы клеток (ув. х 630).

Через 3 месяца имплантации на внутренней поверхности графтов с PNBV/PCL/GFmix определяли монослой зрелых эндотелиальных клеток (CD31+/CD34-), который сохранялся на протяжении 12 месяцев исследования, тогда как в немодифицированных графтах лишь спустя 3 месяца имплантации отмечено начало спонтанной эндотелизации (рис. 4).

Кроме того, фактор фон Виллебранда (vWF+), выявлявшийся на внутренней поверхности графтов PNBV/PCL/GFmix на всех временных точках эксперимента, свидетельствовал о функциональной активности эндотелиальных клеток, выстилавших внутреннюю поверхность полимерных сосудистых графтов (рис. 3). При этом в 25 % (1 из 4) проходимых немодифицированных PNBV/PCL графтах формирование эндотелиального монослоя наблюдали лишь через 6 месяцев имплантации.

Рисунок 4. Результаты иммунофлуоресцентной и иммуногистохимической окраски графтов PNBV/PCL на разных сроках имплантации. Иммунофлуоресценция: CD31 – красное свечение цитоплазмы эндотелиальных клеток (ув. х 630); CD 34 – зеленое свечение цитоплазмы прогениторных клеток (ув. х 630); vWF – фактор фон Виллебранда, зеленое свечение цитоплазмы клеток (ув. х 200); DAPI – окраска ядер клеток в синий цвет; Collagen IV – зеленое свечение волокон (ув. х 200). Иммуногистохимия: α-актин – коричневое окрашивание цитоплазмы клеток (ув. х 630).

На внутренней поверхности функционально активных графтов PNBV/PCL/GFmix через 1 месяц имплантации появлялась тонкая неоинтимальная выстилка, состоящая из вытянутых клеток, позитивных на альфа-актин, и сохранявшаяся вплоть до 12 месяцев имплантации (рис. 3). При этом ни в одном из графтов не отмечали увеличения размера неоинтимы или ее гиперплазии с течением времени. В немодифицированных сосудистых графтах неоинтима начинала формироваться спустя 3 месяца имплантации, была тонкой и не всегда сохраняла свою непрерывность.

Клеточность стенок в PNBV/PCL/GFmix превышала данные показатели для PNBV/PCL во всех точках исследования. В PNBV/PCL/GFmix графтах через 1 месяц имплантации отмечали заселение стенки фибробластами, макрофагами и клетками инородных тел, через 3 месяца имплантации отмечали увеличение плотности клеточной популяции ближе к наружной поверхности. Максимальная клеточность зарегистрирована в графтах с GFmix во внешней 1/2 и 2/3 толщ стенок через 6 и 12 месяцев имплантации, соответственно.

В толще модифицированных графтов на ранних сроках имплантации определяли отдельные клетки, позитивные на α-актин и схожие по морфологии с гладкомышечными (α-SMA-клетки) (рис. 3). Через 3 месяца имплантации в сосудистых графтах PNBV/PCL/GFmix α-SMA-клетки были распределены повсеместно в толще стенок или формировали группы раз-

ного размера. Также отмечали увеличение плотности α-SMA-клеток по направлению к просвету протеза. Через 12 месяцев имплантации α-SMA-клетки выявляли вдоль внутренней поверхности графтов PNBV/PCL/GFmix, значительное количество данных клеток определяли в средней части стенки графтов, где они формировали отдельный слой (рис. 3). Образования слоя гладкомышечных клеток в стенке в немодифицированных PNBV/PCL графтах обнаружено не было (рис. 4).

Одним из основных признаков ремоделирования имплантированного сосудистого графта является образование элементов внеклеточного матрикса, в том числе коллагена. Формирование базальной мембраны, обязательного структурного элемента нативного сосуда, требует отложения цепей коллагена IV типа [24, 25]. Иммуноокрашивание на коллаген IV типа продемонстрировало, что слой коллагена IV типа располагался на внутренней поверхности графтов PNBV/PCL/GFmix непосредственно под монослоем эндотелиальных клеток на всех временных точках эксперимента (рис. 3). Ничего подобного не наблюдалось в немодифицированных графтах (рис. 4). Между волокнами полимера в толще стенок графтов также отмечали присутствие коллагена IV типа, однако его количество вновь преобладало в графтах PNBV/PCL/GFmix.

Таким образом, через 12 месяцев имплантации 100 % графтов PNBV/PCL/GFmix сохраняли свою проходимость. На внутренней поверхности графтов формировалась тонкая неоинтима, со стороны просвета выстланная эндотелиальным монослоем, образованным зрелыми эндотелиоцитами с фенотипом CD31+/CD34-/vWF+. Клеточность стенок графтов высокая, практически равномерная на всем протяжении. Формирование в зоне локализации графтов полноценной ткани de novo доказано обнаружением на внутренней поверхности графтов тонкого слоя коллагена IV типа, который формировал аналог базальной мембраны, в наружной капсуле и в толще стенки - коллагена I и IV типа, фибробластоподобных и гладкомышечных клеток.

Заключение

Послойное распределение биологически активных молекул в биodeградируемых сосудистых графтах на основе PNBV/PCL стимулирует формирование структурных элементов стенки кровеносного сосуда, схожих по своему строению с нативным сосудом. Предложенная модификация PNBV/PCL графтов улучшает клеточную интеграцию, поскольку после имплантации происходит раннее воссоздание и сохранение эндотелиальной выстилки, интенсивное заселение клетками стенки модифицированных графтов и формирование соединительнотканного компонента, поддерживающего белки внеклеточного матрикса.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Литература

1. Бокерия ЛА, Гудкова РГ. Сердечно-сосудистая хирургия – 2013. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева; 2014. 220с.
2. Catto V, Fare S, Freddi G, Tanzi MC. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. *ISRN Vascular Medicine*. 2014;1-27. DOI: 10.1155/2014/923030.
3. Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Haul A, Dokmeci MR. et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(1):11-25. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.022.
4. Rošić R, Pelipenko J, Kocbek P, Baumgartner S, Bester-Rogac M, Kristl J. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *European Polymer Journal*. 2012;48(8):1374-84. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.05.001.
5. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *The International Journal of Artificial Organs*. 2014;37(7):503-12. DOI: 10.5301/ijao.5000343.
6. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J, Hao X, Lv J, Ma N, Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(15):5680-742. DOI: 10.1039/c4cs00483c.
7. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Krivkina EO, Mironov AV, Burago AY, Velikanova EA, Matveeva VG, Glushkova TV, Sergeeva EA, Vasyukov GY, Kudryavtseva YA, Barbarash OL, Barbarash LS. Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2016(7):1-10. DOI: 10.3389/fphar.2016.00136.
8. Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD. Tissue engineered vascular grafts--preclinical aspects. *International Journal of Cardiology*. 2013;167(4):1091-100. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.069.
9. Kang TY, Lee JH, Kim BJ, Kang JA, Hong JM, Kim BS, Cha HJ, Rhie JW, Cho DW. In vivo endothelialization of tubular vascular grafts through in situ recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins. *Biofabrication*. 2015;7(1):015007. DOI: 10.1088/1758-5090/7/1/015007.
10. Maes C. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanisms of Development*. 2002;111(1-2):61-73. DOI: 10.1016/s0925-4773(01)00601-3.
11. Повещенко ОВ, Повещенко АФ, Коненков ВИ. Эндотелиальные прогениторные клетки и неоваскулогенез. *Успехи современной биологии*. 2012;132(1):69-76.
12. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Matveeva VG, Velikanova EA, Mironov AV, Shabaev AR, Glushkova NV, Senokosova EA, Vasyukov GYu, Krivkina EO, Burago AY, Kudryavtseva YuA, Barbarash OL, Barbarash LS. 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. DOI: 10.3390/ijms17111920.
13. Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, Prestwich GD, Peattie RA. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials*. 2006;27(30):5242-251. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.018.
14. Lee YB, Shin YM, Lee JH, Jun I, Kang JK, Park JC, Shin H. Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. *Biomaterials*. 2012;33(33):8343-52. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.011.
15. Vlodavsky CR, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Le Boulch P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nature Medicine*. 2003;9(5):604-13. DOI: 10.1038/nm848.
16. Сологуб ТВ, Романцов МГ, Кремень НВ, Александрова ЛМ, Аникина ОВ, Суханов ДС. Свободно-радикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты). М.: Академия Естествознания; 2008. 162с.
17. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y. et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR signaling. *Journal of Cell Science*. 2005;118:3759-68. DOI: 10.1242/jcs.02483.
18. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007;50(3):274-80. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f.
19. Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene

expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Proliferation*. 2003;36(2):75-86. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00262.x.

20. Lee KW, Johnson NR, Gao J, Wang Y. Human progenitor cell recruitment via SDF-1 α coacervate-laden PGS vascular grafts. *Biomaterials*. 2013;34(38):9877-85. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.082.

21. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiology Research and Practice*. 2012;1-7. DOI: 10.1155/2012/143209.

22. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):359-70. DOI: 10.1080/mic.10.3-4.359.370.

23. Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Сергеева ЕА, Севостьянова ВВ, Бурого АЮ, Бурков НН, Шарифулин РФ, Великанова ЕА, Кудрявцева ЮА, Барбараш ОЛ, Барбараш ЛС. Тканеинженерный матрикс, модифицированный биологически активными молекулами для направленной регенерации тканей. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2016;(1):18-25. DOI:10.17802/2306-1278-2016-1-18-25.

24. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):422-433. DOI: 10.1038/nrc1094.

25. Osidak MS, Osidak EO, Akhmanova MA, Domogatsky SP, Domogatskaya AS. Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Current Pharmaceutical Design*. 2015;21(9):1124-33. DOI: 10.2174/1381612820666141013122906.

References

1. Bockeria LA, Gudkova RG. Cardiovascular surgery - 2013. Disease and congenital anomalies of the circulatory system. Moscow: Nauchnyy tsentr serdechno-sosudistoy khirurgii im. A.N. Bakuleva RAMS; 2014. 220p. (in Russian)

2. Catto V, Fare S, Freddi G, Tanzi MC. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. *ISRN Vascular Medicine*. 2014;1-27. DOI: 10.1155/2014/923030.

3. Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Haul A, Dokmeci MR. et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(1):11-25. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.022.

4. Rošić R, Pelipenko J, Kocbek P, Baumgartner S, Bester-Rogac M, Kristl J. The role of rheology of polymer

solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. *European Polymer Journal*. 2012;48(8):1374-84. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.05.001.

5. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *The International Journal of Artificial Organs*. 2014;37(7):503-12. DOI: 10.5301/ijao.5000343.

6. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J, Hao X, Lv J, Ma N, Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(15):5680-742. DOI: 10.1039/c4cs00483c.

7. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Krivkina EO, Mironov AV, Burago AY, Velikanova EA, Matveeva VG, Glushkova TV, Sergeeva EA, Vasyukov GY, Kudryavtseva YA, Barbarash OL, Barbarash LS. Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2016(7):1-10. DOI: 10.3389/fphar.2016.00136.

8. Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD. Tissue engineered vascular grafts--preclinical aspects. *International Journal of Cardiology*. 2013;167(4):1091-100. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.069.

9. Kang TY, Lee JH, Kim BJ, Kang JA, Hong JM, Kim BS, Cha HJ, Rhie JW, Cho DW. In vivo endothelialization of tubular vascular grafts through in situ recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins. *Biofabrication*. 2015;7(1):015007. DOI: 10.1088/1758-5090/7/1/015007.

10. Maes C. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanisms of Development*. 2002;111(1-2):61-73. DOI: 10.1016/s0925-4773(01)00601-3.

11. Poveshchenko OV, Poveshchenko AE, Kononov VI. Endothelial Progenitor Cells And Neovascularogenesis. *Biology Bulletin Reviews*. 2012;132(1):69-76. (in Russian)

12. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Matveeva VG, Velikanova EA, Mironov AV, Shabaev AR, Glushkova NV, Senokosova EA, Vasyukov GYu, Krivkina EO, Burago AY, Kudryavtseva YuA, Barbarash OL, Barbarash LS. 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. DOI: 10.3390/ijms17111920.

13. Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, Prestwich GD, Peattie RA. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials*.

2006;27(30):5242-251. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.05.018.

14. Lee YB, Shin YM, Lee JH, Jun I, Kang JK, Park JC, Shin H. Polydopamine-mediated immobilization of multiple bioactive molecules for the development of functional vascular graft materials. *Biomaterials*. 2012;33(33):8343-52. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.011.

15. Vlodavsky CR, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nature Medicine*. 2003;9(5):604-13. DOI: 10.1038/nm848.

16. Sologub TV, Romantsov MG, Kremen' NV, Aleksandrova LM, Anikina OV, Sukhanov DS. Free-radical processes and inflammation (pathogenic, clinical and therapeutic aspects). M.: Academy of Natural Sciences; 2008. 162p.(in Russian)

17. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y. et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFR signaling. *Journal of Cell Science*. 2005;118:3759-68. DOI: 10.1242/jcs.02483.

18. Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2007;50(3):274-80. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f.

19. Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Proliferation*. 2003;36(2):75-86. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00262.x.

20. Lee KW, Johnson NR, Gao J, Wang Y. Human progenitor cell recruitment via SDF-1 α coacervate-laden PGS vascular grafts. *Biomaterials*. 2013;34(38):9877-85. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.082.

21. Ho TK, Shiwen X, Abraham D, Tsui J, Baker D. Stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as potential target of therapeutic angiogenesis in critical leg ischaemia. *Cardiology Research and Practice*. 2012;1-7. DOI: 10.1155/2012/143209.

22. Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):359-70. DOI: 10.1080/mic.10.3.4.359.370.

23. Antonova LV, Krivkina EO, Sergeeva EA, Sevostyanova VV, Burago AY, Burkov NN, Sharifulin RF, Velikanova EA, Kudryavtseva YuA, Barbarash OL, Bar-

barash LS. Tissue engineered scaffold modified by bioactive molecules for directed tissue regeneration. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2016;(1):18-25. DOI:10.17802/2306-1278-2016-1-18-25. (in Russian)

24. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):422-433. DOI: 10.1038/nrc1094.

25. Osidak MS, Osidak EO, Akhmanova MA, Domogatsky SP, Domogatskaya AS. Fibrillar, fibril-associated and basement membrane collagens of the arterial wall: architecture, elasticity and remodeling under stress. *Current Pharmaceutical Design*. 2015;21(9):1124-33. DOI: 10.2174/1381612820666141013122906.

Сведения об авторах

Антонова Лариса Валерьевна, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 643802; e-mail: antonova.la@mail.ru

Кривкина Евгения Олеговна, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 643802; e-mail: leonora92@mail.ru

Севостьянова Виктория Владимировна, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 644650; e-mail: sevostv@gmail.com

Великанова Елена Анатольевна, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 644650; e-mail: telella@mail.ru

Матвеева Вера Геннадьевна, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 643802; e-mail: matveeva_vg@mail.ru

Миронов Андрей Владимирович, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 643802; e-mail: miroav@kemcardio.ru

Бурого Андрей Юрьевич, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 644317; e-mail: reception@kemcardio.ru

Барбараш Леонид Семенович, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; адрес: Российская Федерация, 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар 6; тел.: +7 (3842) 643308; e-mail: reception@kemcardio.ru

Author information

Larisa V. Antonova, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 64-38-02; e-mail: antonova.la@mail.ru

Evgeniya O. Krivkina, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Disease; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (951) 5937301; e-mail: leonora92@mail.ru

Victoria V. Sevostyanova, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 644650; e-mail: sevostv@gmail.com

Elena A. Velikanova, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 644650; e-mail: telella@mail.ru

Vera G. Matveeva, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 643802; e-mail: matveeva_vg@mail.ru

Andrey V. Mironov, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 643802; e-mail: miroav@kemcardio.ru

Andrey Yu. Burago, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 644317; e-mail: reception@kemcardio.ru

Leonid S. Barbarash, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; Phone: +7 (3842) 644317; e-mail: reception@kemcardio.ru

Поступила 28.02.2017 г.
Принята к печати 10.10.2017 г.