

На правах рукописи

Гостев Александр Александрович

**Исследование биосовместимости и биостабильности синтетических
сосудистых протезов, изготовленных методом электроспиннинга из
полиуретана**

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск 2020г.

Работа выполнена в **Центре сосудистой и гибридной хирургии ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России**

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Карпенко Андрей Анатольевич**
кандидат биологических наук **Лактионов Павел Петрович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Вавилов Валерий Николаевич**
(кафедра хирургии факультетской ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ (г. Санкт – Петербург); профессор кафедры)

доктор медицинских наук **Антонова Лариса Валерьевна**
(лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной и клинической кардиологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний" (г. Кемерово); заведующая лабораторией)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «**НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР КАРДИОЛОГИИ**»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а)

Защита состоится 29.04.2020 года в 10. часов на заседании
диссертационного совета Д 208.063.01 при ФГБУ «Национальный
Медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина»
Минздрава России
Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;
e-mail: meshalkin@yandex.ru; <http://www.meshalkin.ru/>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России и на сайте www.meshalkin.ru

Автореферат разослан 27 марта 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета
д-р мед. наук

Альсов С. А.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВПКЧ – вена пупочного канатика человека

ГА – глутаральдегид

ГФИП - 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол

ДС – дуплексное сканирование

ЛСК – линейная скорость кровотока

ПУ – полиуретан

ПС – протез сосуда

ПТФЭ – политетрафторэтилен

СД – сахарный диабет

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УЗДГ - ультразвуковая доплерография

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ЭС – электроспиннинг

Жл – желатин

Бив – бивалирудин

Тек – полиуретан Tecoflex – EG 80A™

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на широкое использование баллонопластики и сосудистых стентов, трехлетняя первичная проходимость стентированных артериальных сегментов ниже паховой складки составляет не более 19% (Dearing D. D. et al, 2009; Laird J. R. et al, 2010), что требует замены пораженных сосудов, т.е. открытого хирургического вмешательства. Для протезирования таких сосудов в современной хирургии используют аутологичные вены или артерии, децеллюляризованные ксеногенные сосуды или синтетические протезы сосудов (ПС), изготовленные из вспененного политетрафторэтилена (ПТФЭ), или полиэтилентерефталата (ПЭТ). Необходимо отметить, что аутологичные сосуды не всегда доступны, а децеллюляризованные ксеногенные ПС отличаются склонностью к формированию аневризм в отдаленной перспективе (Conklin B. S. et al, 2002). Синтетические ПС хорошо зарекомендовали себя при замене сосудов большого диаметра, однако при протезировании сосудов малых диаметров (<6 мм), используемые для этих целей протезы из ПТФЭ не обладают достаточной механической совместимостью со стенкой нативного сосуда, био- и гемосовместимостью, в связи с чем, возникает большое количество тромбозов в раннем и окклюзий в отдаленном послеоперационном периоде (Seifu D. G. et al., 2013). Одним из наиболее перспективных классов полимеров являются полиуретаны, обладающие прекрасными механическими свойствами, высокой биосовместимостью (Kucinska-Lipka J. et al., 2015). Представленные на рынке ПС на основе полиуретанов (ПУ), изготовленные методом электроспиннинга (ЭС) предназначены только для сосудистого доступа при гемодиализе (Nicast Ltd). Однако такие ПС также подвержены процессам гиперплазии неоинтимы и тромбообразованию в течение 6 месяцев, что приводит к их несостоятельности (Wijeyaratne S. M. et al., 2011). Таким образом необходимо повышение био- и гемосовместимости ПС, улучшение формирования эндотелиальной выстилки, механических свойств, биосовместимости – т.е.

оптимизация материала, а также обширные исследование ПС из новых материалов *in vitro* и *in vivo*.

Научная гипотеза

Изготовление протезов сосудов малого диаметра методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного полиуретана, белка внеклеточного матрикса желатина и прямого антикоагулянта бивалирудина, позволит снизить процессы тромбообразования и гиперплазии неоинтимы, тем самым увеличить проходимость таких протезов в раннем и отдаленном послеоперационном периоде.

Цель исследования

Разработать технологию изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга, используя в качестве базового синтетического полимера полиуретан, и исследовать механические и биологические свойства таких протезов.

Задачи исследования

1. Разработать технологию изготовления методом электроспиннинга 3Д матриц и протезов сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина.
2. Выполнить исследование физических свойств материалов, изготовленных по предлагаемому протоколу, и сравнить их с физическими свойствами протезов сосудов из ПТФЭ и нативных артерий.
3. Провести исследования, изготовленных ПС из полиуретана *in vitro*, на цитотоксичность, гемосовместимость, способность поддерживать адгезию и пролиферацию эндотелиоцитов человека.
4. Выполнить интраоперационные сравнительные исследования протезов сосудов из полиуретана и ПТФЭ в эксперименте *in vivo*. Оценить проницаемость протезов для крови, устойчивость к «разволоknению»

краев, формирование анастомозов с нативной артерией, гемостаз мест проколов, биостабильность при выполнении операции по протезированию инфраренального отдела брюшной аорты крыс линии Wistar.

5. Оценить и сравнить гемо- и биосовместимость, а также проходимость ПС из полиуретана и ПТФЭ в ближайший и отдаленный послеоперационный период на сроках наблюдения от 1 до 24 недель.

Научная новизна исследования

1. Предложены новые 3Д матрицы, полученные методом электроспиннинга из смеси полиуретана с желатином, и смеси полиуретана с желатином и бивалирудином (слой, экспонированный на контактирующей с кровью поверхности) для изготовления ПС.

2. Установлено, что физико-химические характеристики 3Д матриц и ПС, изготовленных по предложенному протоколу, обладают высокой прочностью на разрыв, прочностью на прорыв нитью, хорошей податливостью и эластичностью.

3. Показано, что предложенные материалы хорошо совместимы с кровью и клетками эндотелия сосудов: эндотелиоциты связываются и пролиферируют на поверхности таких матриц, при этом агрегация тромбоцитов снижена не менее, чем в 4 раза по сравнению с матрицами из чистого полиуретана. Исследуемые матрицы показывают низкий процент гемолиза – порядка 2,5%.

4. Установлено, что ПС, изготовленные по предложенному протоколу, после их имплантации в позицию брюшной аорты крысы обладают высокой проходимостью на сроках наблюдения до 24 недель.

5. Показано, что протезы из полиуретана сохраняют свою функциональную стабильность в артериальной позиции в течение 24 недель наблюдения, способствуют формированию тонкой внутренней выстилки с эндотелиоцит-подобными клетками.

Отличия новых научных результатов от результатов, полученных другими авторами

Анализ литературных данных показывает, что используемые в клиниках биотрансплантаты и синтетические ПС характеризуются высокой частотой осложнений. Следовательно, поиск не только оптимальных конструкций изделий, но и новых, более совместимых с организмом материалов является актуальной задачей сосудистой хирургии. Прделанная работа носит проспективный характер. Разработан протокол, который ранее не был заявлен в мировой литературе, изготовления протезов сосуда из белок наполненного полиуретана с добавлением прямого антикоагулянта во внутреннем слое методом электроспиннинга.

Достоверность выводов и рекомендаций

Дизайн исследования, достаточное количество наблюдений, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к анализу с применением современных методов статистической обработки свидетельствуют о достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Представленные в настоящей работе выводы не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

Практическая значимость полученных новых научных знаний

Результаты настоящего исследования демонстрируют новые возможности использования метода электроспиннинга в качестве одного из наиболее перспективных способов изготовления протезов кровеносных сосудов. Использованный в качестве полимера-основы полиуретан, позволяет максимально приблизить био- и гемосовместимость таких протезов к нативной артерии. Разработанный протокол модификации способа производства таких протезов позволил значительно улучшить их биомеханические свойства, что позволяет рекомендовать такие протезы для проведения дальнейших этапов доклинических и клинических исследований.

Краткая характеристика клинического материала (объекта исследования) и научных методов исследования

Разработан протокол изготовления протеза сосуда из белок наполненного полиуретана с добавлением прямого антикоагулянта во внутреннем слое.

Работа содержит результаты стендовых испытаний и данные, полученные после выполненных 36 операций по имплантации экспериментальных ПС и протезов из ПТФЭ в брюшной отдел аорты животных (крысы линии Wistar).

Дана интраоперационная оценка качества, био- и гемосовместимости экспериментальных протезов путем их имплантации на 1, 12 и 24 недель в аорту крыс. По завершению срока наблюдения исследована проходимость протезов с помощью УЗИ, определена степень индукции неоинтимы при помощи обзорной микроскопии, а также клеточное заполнение путем обзорной микроскопии, гистологического и иммуногистохимического анализа.

Для накопления данных и их первичной сортировки использовали Microsoft Excel 2010. Результаты исследований были обработаны с использованием пакета программ для статистической обработки “Statistica 10” в среде Windows 7 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены в виде медианы с (интерквартильным размахом), а качественные - в виде общего количества и доли в процентах. Статистическая значимость различия между двумя группами по количественным данным определялась с помощью U критерия Манна – Уитни, а по качественным признакам - с помощью точного двустороннего теста Фишера. Уровень отклонения нулевой гипотезы об отсутствии различий между группами принимали при $p < 0,05$.

Методы исследования и используемая аппаратура

Растворы для электроспиннинга готовили в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропаноле (Sigma, США) (ГФИП), используя исходные растворы полимеров: 10% ПУ Tecoflex -80A™ (Lubrizol Advanced Materials, Europe)

(Тек), 5% раствор желатина (Жл) и 1,5% раствор бивалирудина (Sigma, США) (Бив). ПС готовили с помощью устройства для ЭС NF-103 (МЕСС, Япония) с использованием цилиндрических стальных коллекторов диаметром 2,7 мм и длиной 190 мм. ПС состояли из внутреннего и внешнего слоев (с 1,5% Бив и без него соответственно). Внутренний слой был толщиной 25–30 мкм, наружный - 100–105 мкм.

ПС обрабатывали глутаральдегидом (ГА) для сшивания белка в волокне. Для стерилизации ПС использовали ускоритель ИЛУ-6 (ИЯФ, Россия), поглощенная доза составила 25 кГр.

Прочность протезов на разрыв и прорезывание нитью измеряли с помощью разрывной машины Z100 (Zwick/Roell, Германия), используя растяжение со скоростью 10 мм/мин и прошивая сосуд на расстоянии 2 мм от края монофиламентной полипропиленовой нитью с диаметром 15 мкм (диаметр иглы 170 мкм).

Эластичность, податливость ПС исследована с использованием стенда для моделирования перепада давления, оснащенного бесконтактным измерителем толщины (64 измерения / с). Систолическое / диастолическое давление (120/80 мм рт. ст.) симулировали с использованием двух емкостей с физиологическим раствором с электромагнитными клапанами ввода / вывода (контролируемыми в соответствии с заранее определенной программой) и образцом ПС, закрепленным между ними. Цикл нагрузки включал приложение давления (500 мс), удержание (100 мс), сброс (200 мс) и промежуток времени между циклами (50 мс). В качестве контроля использовалась брюшная аорта крыс линии Вистар. Податливость (комплаинс) стенки сосуда рассчитывали по формуле: C (податливость) = $\Delta d \times 104 / d_{\text{dias}} \times \Delta P$, где Δd - изменение диаметра в течение сердечного цикла; ΔP - разница между систолическим и диастолическим давлением; и d_{dias} - это диастолический диаметр. Параметр отображается в виде ($\% / \text{мм рт.ст.}^{-1} \times 10^{-2}$).

Для измерения давления разрыва ПС использовался баллон для

ангиопластики с превосходящим диаметром (8,0 мм). Баллон сначала опустошали и помещали в просвет ПС; давление медленно увеличивали со скоростью 0,5 МПа / мин до 2 МПа (20 атм) или до тех пор, пока исследуемый ПС не разрывался. Параметр представлен в мм рт ст.

Для исследования были использованы стандартные наборы реактивов, используемые в клинической лаборатории НМИЦ, а именно, для измерения фибриногена использовался реактив «Тромбин реагент» (кат. № 10445721), АПТВ – «Патромтин SL» (кат. № OQGS29) и Д-димера «Д-димер иннованс» (кат. № 10445980, все реагенты производства Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия). Данные получали при помощи автоматического анализатора Sysmex CS-2100i (Япония).

Из матриксов были сделаны образцы квадратной формы (10x10мм) (толщина 110 мкм) и помещены в 2 мл пластиковые пробирки. Предварительно 3Д матриксы были вымочены в физиологическом растворе в течение 30 мин и затем высушены. Далее в каждую пробирку с соответствующим образцом добавляли по 750 мкл донорской крови, смешанной с цитратом натрия, и медленно перемешивали на мешалке Overhead (3 оборота/мин) в течение 30 мин. После этого кровь из пробирок с образцами центрифугировали, а полученную плазму использовали для анализа. В качестве первого контроля брали плазму крови этого же донора после контакта с пластиковой пробиркой. В качестве второго контроля брали плазму крови этого же донора после контакта с пластиковой пробиркой в течение 30 минут. Все измерения были повторены 3 раза, использовалась кровь от 3-х разных здоровых добровольцев – доноров.

Для исследования адгезии тромбоцитов к поверхности матриксов 3Д матриксы инкубировали с фракцией, обогащенной тромбоцитами плазмы и оценивали количество адсорбированных тромбоцитов при помощи СЭМ.

Для исследования гемолиза крови при контакте с матриксами, из последних были сделаны образцы округлой формы, диаметром 10 мм (толщина 110 мкм) и помещены в 48-луночный планшет в дублях. Образцы

вымочены в физиологическом растворе в течение 30 мин и затем высушены. У 3-х разных доноров в условиях процедурного кабинета была взята венозная кровь в вакутейнеры с антикоагулянтом ЭДТА. 2,5 мл крови из каждой пробирки были смешаны с 2,5 мл физиологического раствора. В каждую лунку с матриксом добавили по 200 мкл разбавленной крови от каждого донора. В качестве отрицательного контроля к 1 мл физиологического раствора добавили 100 мкл донорской крови. В качестве положительного контроля к 1 мл воды добавили 100 мкл донорской крови. Систему инкубировали в течение 60 мин. Инкубированную кровь помещали в отдельные пластиковые пробирки, которые центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму помещали в 96-луночный планшет. Для определения гемолиза определяли оптическую плотность плазмы на длине волны 445 нм (Multiscan FC, Thermo Fisher, США). Процент гемолиза рассчитывался по следующей формуле: Гемолиз (%) = $(A_{\text{образца}} - A_{\text{отр.контроль}}) * 100 / (A_{\text{пол.контроль}} - A_{\text{отр.контроль}})$.

На каждый срок наблюдения (на 1, 12 и 24 недели) в инфраренальный отдел аорты шести животных были имплантированы по 1 образцу экспериментальных ПС или ПС из ePTFE в качестве контроля. Анастомозы протеза с аортой выполняли с помощью мононити Premilene 8.0 с атравматической иглой, 8-10 узловыми швами. По завершению хирургического вмешательства и после пробуждения животного от наркоза его помещали на 3 дня в отдельную клетку, где выполняли инъекцию клексана подкожно из расчета 1 мг/кг -1 раз в сутки для профилактики тромбоза и ежедневные перевязки с обработкой послеоперационных швов антисептическим средством (10% Бетадин). Последующее время наблюдения животные не получали каких-либо лекарственных препаратов. После имплантации протезов животных содержали в стационарных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной лабораторной диете и свободным доступом к воде. По истечению срока наблюдения перед эксплантацией исследуемого материала проводили ультразвуковое

исследование. Оценку средней линейной скорости кровотока (ЛСК) в протезе выполняли с помощью диагностической ультразвуковой системы DC7 (Mindray, КНР). Точками исследования были: зона перед проксимальным анастомозом между аортой и протезом, середина протеза и зона сразу после дистального анастомоза. По завершению УЗИ выполняли повторную операцию "Забор исследуемого материала" используя наркоз, а также релапаротомию, выделение и иссечение протеза с захватом 5 мм аорты от анастомозов. Выведение животных из эксперимента осуществляли сразу после забора экспериментального протеза (не дожидаясь пробуждения от наркоза). После ПС споласкивали физраствором, помещали в 4% раствор формальдегида, как требуется для гистологического исследования, и выполняли обзорную микроскопию с помощью бинокулярного микроскопа Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) с измерением основных параметров (внешний и внутренний диаметры, толщину неоинтимы) с помощью программного обеспечения AxioVision. Для оценки неоинтимы измеряли толщину стенки протеза в 4 точках (в области максимальной толщины неоинтимы, и на равноудаленном друг от друга расстоянии).

Для гистологического и иммуногистохимического анализа эксплантированных протезов сосудов изготавливали серийные поперечные криосрезы с толщиной 10 мкм, используя криомикротом «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия). Гистологическое исследование препаратов проводили с помощью окраски гематоксилином-эозином (Biovitrum, Санкт-Петербург).

Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартному протоколу в иммуностейнере LabVision Autostainer 720 (Thermo Scientific, США) при помощи системы UltraVision Quanto HRP DAB Protocol с первичными моно- и поликлональными антителами (ThermoScientific, США) к collagen-4 (клон PHM-12+CIV22), α -SMA (клон 1A4/asm-1), Factor VIII (кроличье, поликлональное) мечеными пероксидазой хрена.

Морфометрический анализ включал изучение планиметрических и стереологических количественных показателей. Количественным и

полуколичественным методом оценивали содержание клеточных и структурных элементов в стенке экспериментальных протезов и неоинтимальном слое. Кальцифицированную площадь среза определяли в каждом исследуемом случае методом прямой планиметрии на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином. Для этого изображение поперечного среза протеза с помощью видеокамеры светового микроскопа (AxioCam Hrc5s) выводили на экран монитора и, используя систему обработки и анализа изображения (ZEN 2.3), определяли площадь стенки протеза и новообразованной интимы и отдельно – площадь кальцификатов. Затем рассчитывали относительную величину кальцификации среза в процентах по отношению ко всей площади протеза.

Объемную плотность (в %) иммуногистохимически окрашенных участков внеклеточного матрикса оценивали с использованием программы «ZEN 2.3» при увеличении в 400 раз с помощью закрытой тестовой системы из 100 точек. В каждом срезе исследовали все поля зрения новообразованной интимы (не менее 10 полей зрения) и в каждом из них измерения проводили при 5 различных произвольно выбранных положениях окулярной сетки. Экспрессию коллагена 4-го типа оценивали полуколичественным методом по объемной плотности окрашенного внеклеточного матрикса как выраженную «3+» (при окрашивании >50% внеклеточного матрикса), умеренную «2+» (при окрашивании 25–50% внеклеточного матрикса), слабую «1+» (при окрашивании <25% внеклеточного матрикса), отсутствие окрашивания «–». Экспрессию ASM оценивали по доле позитивно окрашенных гладкомышечных клеток. Экспрессию фактора VIII оценивали также по доле позитивно окрашенной цитоплазмы эндотелиоцитов. В каждом случае подсчитывали не менее 100 клеток.

Личный вклад автора в получении новых научных результатов данного исследования

Автором лично изготовлены все исследуемые протезы и проведены испытания их механических свойств *in vitro*, выполнены все операции по

имплантации и забору экспериментальных ПС, а также контроль над состоянием животных на протяжении всего срока наблюдения. Автор принимал участие в исследовании ПС на цитотоксичность и гемосовместимость, функциональной оценке ПС с помощью ультразвукового доплеровского сканирования *in vivo*, исследовании послеоперационной морфологической и гистологической картины полученных результатов, анализе и интерпретации полученных результатов. Статистическая обработка данных произведена с применением пакетов программ “Statistica 10” и Excel 2010.

Реализация и внедрение результатов исследований

Результаты настоящего исследования демонстрируют новые возможности использования метода ЭС в качестве одного из наиболее перспективных способов изготовления протезов кровеносных сосудов. Использованный в качестве полимера-основы ПУ, позволяет максимально приблизить био- и гемосовместимость таких протезов к нативной артерии. Разработанный протокол модификации способа производства таких ПС позволил значительно улучшить их биомеханические свойства, что позволяет рекомендовать такие протезы для проведения дальнейших этапов доклинических и клинических исследований.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

- Форум с международным участием «Биомедицина 2016» (Новосибирск, 2016).
- 10th European Symposium on Vascular Biomaterials (Страсбург, 2017).
- ISBPPB 2018 - 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials (Краков, 2018).
- XXXIV Международная конференция «Перспективы развития сосудистой хирургии в стране и её регионах (Ярославль, 2018)

- XXXV Международная конференция «Внедрение высоких технологий в сосудистую хирургию и флебологию» (Санкт-Петербург, 2019)
- X Научные чтения, посвященные памяти академика РАМН Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, 2019)

Результаты работы опубликованы в 4 ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК)

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, содержащих литературный обзор, описание используемых материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Указатель литературы содержит 28 отечественных и 186 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 20 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный протокол изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного ПУ Tecoflex EG-80A™, желатина и бивалирудина, позволяет создать протезы сосудов малого диаметра, не уступающие по прочности протезам сосудов из ПТФЭ, но, при этом, более эластичные и податливые, чем протезы сосудов из ПТФЭ.
2. Изготовленные протезы сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина методом электроспиннинга, обладают низкой цитотоксичностью для эндотелиоцитов, а также, хорошей гемосовместимостью.
3. Исследуемые протезы сосудов, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси полиуретана, желатина и бивалирудина, обладают физическими свойствами, позволяющими интраоперационно легко формировать анастомоз с нативной артерией,

осуществлять быстрый и качественный гемостаз.

4. Исследуемые протезы сосудов, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси полиуретана, желатина и бивалирудина являются более тромборезистентными, не вызывают избыточного образования нефиброзной капсулы, неинтимы и кальцификации, по сравнению с протезами из ПТФЭ в эксперименте *in vivo* на сроках наблюдения до 24 недель.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Для достижения цели и решения поставленных задач была намечена схема исследования, которая включала в себя: разработку протокола изготовления ПС методом ЭС, оценку их механических свойств, исследование био- и гемосовместимости *in vitro*, а также путем имплантации ПС в брюшной отдел аорты крыс, с последующим интраоперационным анализом, оценкой проходимости (УЗИ), обзорной микроскопией и исследованием гистологической и иммуногистохимической картины.

Механические свойства протезов сосудов

В таблице 1 приведены механические свойства ПС на основе ПУ Tecoflex EG 80A™ с желатином и бивалирудином (Тек-Жл-Бив) и ПС из ПТФЭ. Согласно СЭМ все матрицы состояли из волокон диаметром около $1,81 \pm 0,31$ мкм и имели поры $2,28 \pm 0,92$ мкм (Таблица 1; Рисунок 1, Панель 1).

Прочность на разрыв по продольной оси ПС Тек-Жел-Бив была близка к таковой у ПС из ПТФЭ (таблица 1). Однако ПС из Тек-Жел-Бив были почти в три раза более устойчивым к прорезыванию нитью ($470 \pm 35,0$ г против $170 \pm 5,7$ г для e-PTFE). Отметим, что эти механические характеристики значительно превосходят нативные артерии (у которых предел прочности на разрыв по продольной оси составляет приблизительно 2 МПа [Konig G, McAllister TN, Dusserre N et al: Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials*. 2009 Mar 1;30(8):1542-50].

Давление разрыва ПС Тек-Жел-Бив составило $19,6 \pm 0,4$ атм (14 896 мм рт. ст.). Это в 11 раз больше по сравнению ПС из e-PTFE (Таблица 1). Модуль Юнга ПС Тек-Жел-Бив был в четыре раза ниже, чем у ПС из e-PTFE (0,84 против 3,98 МПа).

Податливость (комплаинс) ПС была исследована в пульсирующем потоке физиологического раствора с перепадом давления 120/80 мм рт.ст. с мониторингом (измерением) изменения диаметра ПС. Брюшная артерия крысы при таком перепаде давления меняет свой диаметр на 13–17% (рис. 1, панель 2А). C (комплаинс) = $29,9 \pm 0,13\% / \text{мм рт.ст.}^{-1} \times 10^{-2}$. ПС Тек-Жел-Бив примерно в два раза менее податливы и изменяют свой диаметр на 6–8% (Рисунок 1, Панель 2С). C (комплаинс) = $18,6 \pm 0,11\% / \text{мм рт.ст.}^{-1} \times 10^{-2}$. ПС из e-PTFE практически никак не изменяли свой диаметр при перепаде давления 120/80 мм рт.ст. (Рис. 1, панель 2В).

Таблица 1. Физико-химические свойства ПС

Вид протеза сосуда	Угол смачивания поверхности, °	Сила разрыва (продольно), МПа	Сила прорезывания шва, г	Модуль Юнга, (МПа)	Давление разрыва (мм рт. ст.)	Податливость (комплаинс) %/мм рт. ст. ⁻¹ × 10 ⁻²
Тек+Жел+Бив	87.10 ± 2.20	15.60 ± 0.80	470.00 ± 35.00	0.84 ± 0.20	14896 ± 304	18.6 ± 0.11
e-PTFE	125.00 ± 3.10	16.00 ± 0.90	170.00 ± 5.70	3.98 ± 0.37	1327 ± 289	3.26 ± 0.08
p	0,005	0,37	0,005	0,005	0,005	0,005

*среднее ± стандартное отклонение

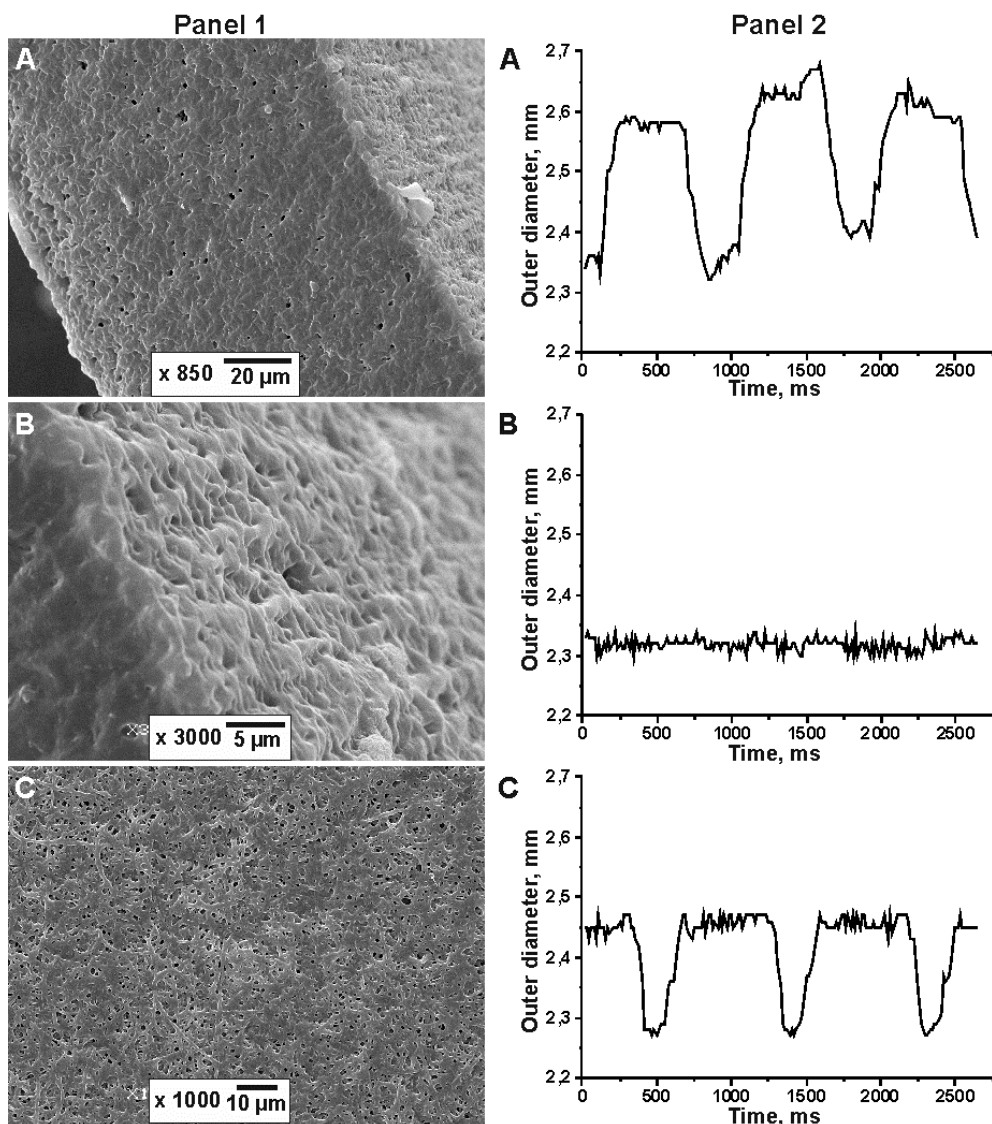


Рисунок 1. Панель 1. СЭМ исследуемого ПС из полимерной смеси, изготовленного методом электроспиннинга: (А) поперечное сечение стенки; (В) вид сбоку внутренней поверхности ПС; (С) перпендикулярный вид внутренней поверхности ПС. Панель 2. Сравнение податливости ПС. Изменение внешнего диаметра ПС и брюшной аорты крысы контролировали в пульсирующем потоке жидкости с перепадом давления 120/80 мм рт.ст. : (А) брюшная аорта крысы; (В) ПС из ПТФЭ; (С) ПС из Тек-Жл-Бив. Ось X, время, мс и ось Y, внешний диаметр ПС, мм.

Взаимодействие эндотелиальных клеток с поверхностью исследуемых матриц

На рис. 2 представлены результаты определения жизнеспособности эндотелиальных клеток на поверхности различных матриц. Показано, что увеличение концентрации Жл в смеси для электроспиннинга приводит к повышению способности эндотелиальных клеток прикрепляться и

пролиферировать на поверхности матриксов из 3% ПУ Тес + 15% Жл. Обработка матриксов глутаровым альдегидом в целом повышала эффективность культивирования эндотелиальных клеток на поверхности матриксов, вероятно, это связано с отсутствием изменения структуры волокон в результате гидратации. Однако из полученных данных видно, что наиболее универсальным матриксом для эндотелиальных клеток человека является матрикс, содержащий 3% ПУ Тес + 15% Жл и обработанный глутаровым альдегидом.

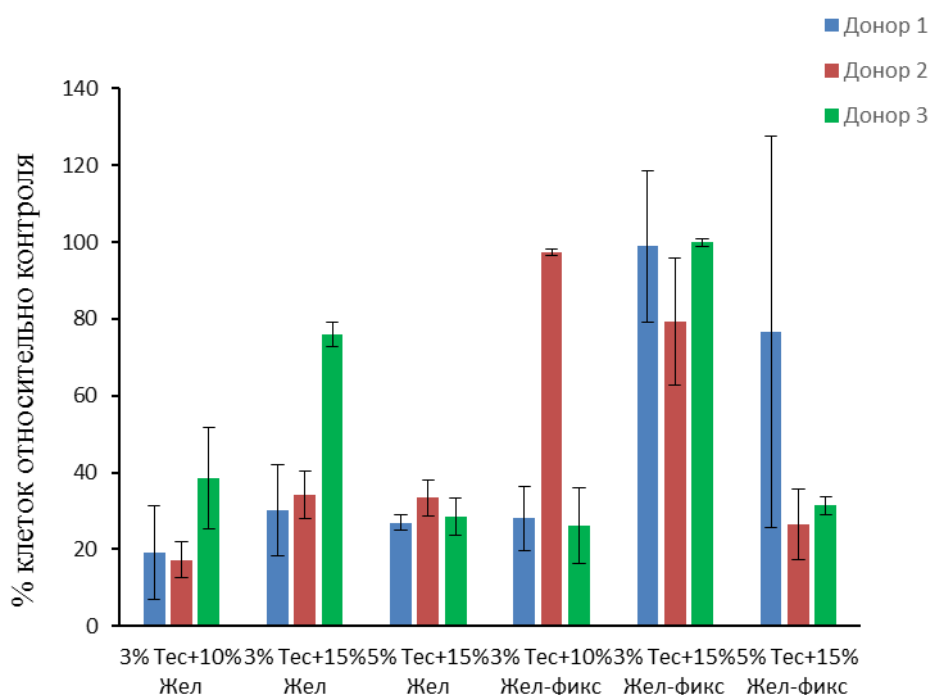


Рисунок 2. Жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности различных матриксов через 48 часов их культивирования с матриксами. Данные представлены как среднее трех повторов \pm стандартное отклонение.

Изготовленные из смеси 3% ПУ Тек с добавлением 15% Жл и обработанные ГА матриксы, имеют поверхность, с которой наилучшим образом связываются первичные эндотелиоциты человека вне зависимости от донора клеток.

Исследование матриц и ПС на гемосовместимость и тромбогенность поверхности

Мы оценивали количество бивалирудина, экспонированного на поверхности матриц до и после из инкубации в физрастворе, методом ИК-Фурье спектроскопии. Из данных представленных на рис. 3 видно, что около 60% бивалирудина выходит из состава матрикса после 10 дневной инкубации, однако 40% остается. Пролонгированное экспонирование бивалирудина на поверхности матриц позволяет надеяться на то, что такие матрицы будут обладать хорошими атромбогенными свойствами в течение длительного времени.

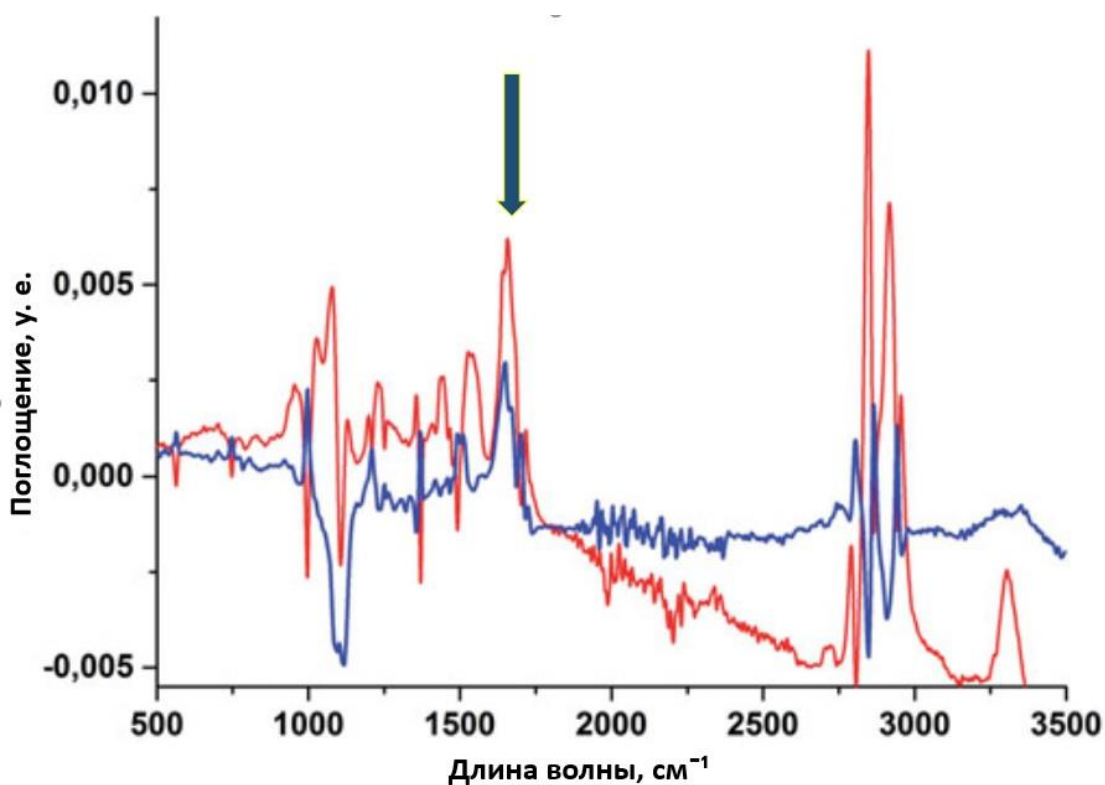
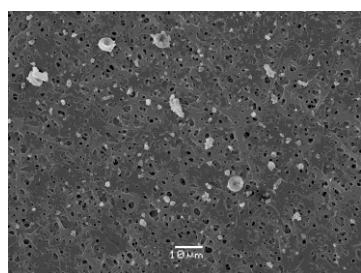


Рисунок 3. ИК-Фурье спектры матриц, изготовленных из 3%Тек+1,5%Бив без инкубации (красная линия) и после десятидневной инкубации в физиологическом растворе (синяя линия). Стрелкой указана длина волны, соответствующая пептидной связи бивалирудина. Ось X – абсорбция, у.е; Ось Y – длина волн, см⁻¹.

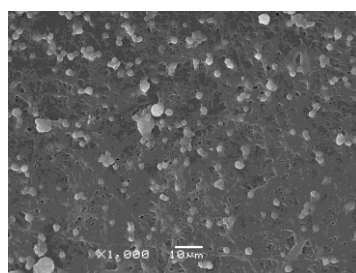
Для оценки влияния различных полимерных смесей на гемостаз и гемолиз мы инкубировали донорскую кровь на различных по составу

матрицах. Как видно из полученных данных (табл. 2), введение бивалирудина в матрицы привело к статистически значимому увеличению АПТВ по сравнению с контрольными образцами, что доказывает влияние введенного в состав полимерного волокна бивалирудина на коагуляцию крови. Данные, приведенные в таблице 2 показывают, что состав матриц мало влиял на стабильность эритроцитов. Обработка матриц, содержащих желатин, глутаровым альдегидом, приводила к статистически незначимому снижению процента гемолиза по сравнению с необработанными матрицами аналогичного состава.

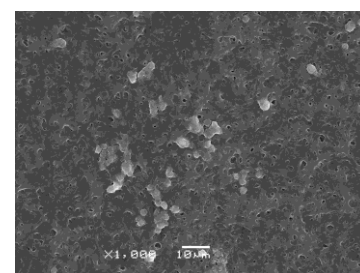
Для оценки взаимодействия тромбоцитов с поверхностью матриц мы использовали обогащённую тромбоцитами плазму крови с последующей оценкой эффективности адгезии тромбоцитов при помощи СЭМ (рис. 4, таб. 2).



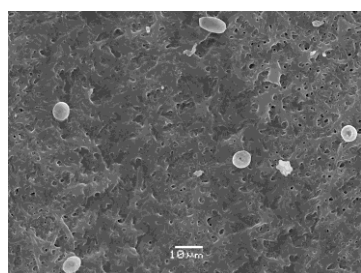
3% Тек



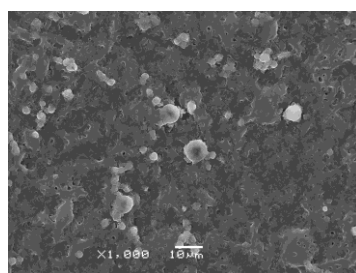
3% Тек + 15% ЖЛ



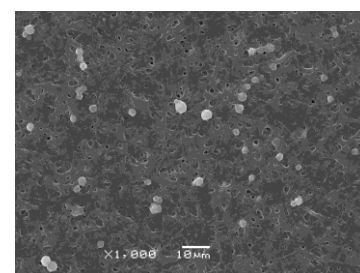
3% Тек + 15% ЖЛ +
1.5% Бив



3% Тек + 1.5% Бив



3% Тек + 15% ЖЛ_ГА



3% Тек + 15% ЖЛ +
1.5% Бив_ГА

Рисунок 4. Фотографии исследуемых матриц, полученные при помощи СЭМ (увеличение x 1000), после их инкубации с тромбоцит-обогащенной плазмой

Таблица 2. Оценка исследуемых матрицков на гемосовместимость *in vitro*

Состав образца	Фибриноген, г/л	АПТВ, сек *	Гемолиз, %	Количество тромбоцитов на 1 мм ² , × 10 ³ *
Контрольный образец крови	2.22 [2.18; 2.29]	29.2 [27.2; 34.8]	-	-
3% Тес	2.22 [2.19; 2.24]	29.1 [28.2; 34.4]	2.79 [2.36; 3.37]	15.67 [10.90; 20.25]
3% Тес + 1.5% Бив	2.27 [2.21; 2.32]	63.5 [58.3; 75.4]	3.76 [2.34; 4.88]	1.43 [1.31; 1.59]
3% Тес + 15% Жл	2.25 [2.24; 2.32]	31.1 [27.6; 35.0]	3.36 [2.22; 4.87]	17.72 [17.25; 18.81]
3% Тес + 15% Жл + 1.5% Бив	1.98 [1.96; 1.98]	126.7 [100.4; 133.4]	2.55 [2.27; 4.36]	2.23 [1.97; 2.41]
3% Тес + 15% Жл обработанный ГА	2.17 [2.15; 2.27]	28.5 [26.9; 33.9]	2.74 [1.94; 3.12]	5.74 [5.02; 6.06]
3% Тес + 15% Жл + 1.5% Бив обработанный ГА	2.27 [2.19; 2.27]	30.3 [28.0; 35.2]	3.13 [2.39; 4.93]	3.79 [2.69; 4.24]

Данные представлены в виде медианы с межквартильным диапазоном. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Крускала – Уоллиса ANOVA. Значения вероятности $p < 0,05$ считались значимыми и помечены «*».

Из представленных данных видно, что введение желатина в состав матрикса приводит к увеличению количества связанных с поверхностью матрикса тромбоцитов, при этом возрастает количество агрегатов тромбоцитов. Введение бивалирудина в состав матрицков приводит к 10-кратному уменьшению количества тромбоцитов на поверхности матрицков по сравнению с матриксом из чистого ПУ.

Экспериментальная часть *in vivo*

Имплантация экспериментальных протезов была выполнена 36 самцам крыс линии wistar, имеющих spf-статус. Для двух типов протезов (экспериментального, изготовленных в рамках исследования и контрольного из ПТФЭ) были сформированы две группы наблюдения. Первой группе животных была выполнена имплантация протезов из ПУ Тек с желатином и бивалирудином во внутреннем слое, обработанных с помощью 2% раствора

глутарового альдегида; второй группе - были имплантированы протезы из ПТФЭ (Экофлон, Россия). Животные в группах наблюдения не отличались по весу, полу и возрасту. Группы были полностью сопоставимы по количеству Ксилазина и Золетила, используемых для инъекционного наркоза. Длина имплантированного протеза (в зависимости от анатомической особенности животного) составила от 15 до 20 мм.

Интраоперационная оценка качества изготовленных протезов показала их хорошую устойчивость к «разволоknению» при отрезании части ножницами, высокую способность сохранять свою цилиндрическую форму на протяжении всех этапов имплантации. Формирование анастомозов не сопровождалось подворачиванием краев ПС, а область соединения ПС с нативной артерией была в виде плотного контакта. После запуска кровотока не наблюдалось пропитывания кровью стенки ПС ни в одной группе (рис. 5).

А



Б

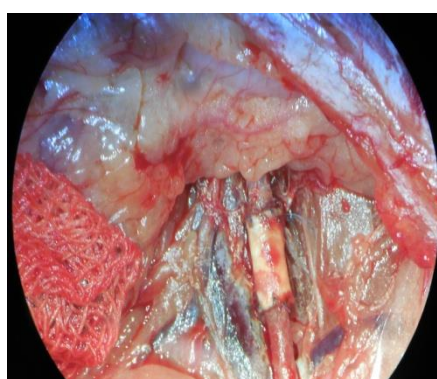


Рисунок 5. Внешний вид протезов сосуда непосредственно после имплантации в инфраренальный сегмент брюшной аорты крысы: Протез из Tecoflex (А); протез из ePTFE (Б). Микроскоп Carl ZEISS OPMI Pico, увеличение x 6.

В группе протезов из ПТФЭ время местного гемостаза (время от снятия зажимов с аорты до прекращения кровотечения из области анастомозов и отверстий после проколов иглой) варьировало от 20,0 до 28,0 мин, в группе ПС из Тек-Жл-Бив - от 14,0 до 20,0 мин. Различные показатели времени хирургического гемостаза связаны с разными механическими и эластическими свойствами ПС. Протезы из ПТФЭ оказались более жесткими,

по сравнению с ПС из Тек-Жл-Бив. Это приводило к меньшей коаптации между краями ПС и аорты, а также с более длительным кровотоком из мест вколов. Различное время хирургического гемостаза влияло и на длительность операции соответственно.

Данные наиболее значимых событий в обеих группах за весь период наблюдения представлены в таблице 3.

Таблица 3. Значимые события в исследуемых группах за весь период наблюдения

Показатель	Группа Тек-Жл-Бив, n=18	Группа ПТФЭ, n=18	P
Смертность, n(%)	1 (5,5)	5 (27,7)	0,0887
Аневризма анастомоза, n(%)	1 (5,5)	0 (0,0)	0,89
Окклюзия протеза, n(%) из них:	1 (5,5)	6 (33,3)	0,0438
Ранняя окклюзия (срок до 7 сут), n(%)	0 (0,0)	3 (16,7)	0,228
Отсроченная окклюзия (срок более 7 сут), n(%)	1 (8,3)	3 (25,0)	0,2950

Таким образом, свобода от окклюзии ПС за весь период наблюдения составила: для группы Тек-Жл-Бив 94,5%; для группы ПТФЭ - 66,6% (p=0,0438).

Внешний вид протезов во время эксплантации на разных сроках наблюдения представлен на рис. 6. На 24 неделе наблюдения была выявлена некоторая деформация стенки ПС из ПТФЭ, возможно, вызванная процессами кальциноза, с плотным срастанием ПС с окружающими тканями. При этом у ПС из Тек-Жл-Бив подобных признаков не было выявлено. Во всех группах не было обнаружено признаков инфицирования или воспаления, гематом, как в зоне самого ПС, так и окружающих его тканей.

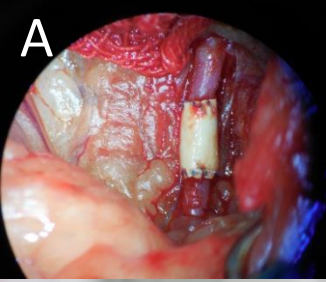

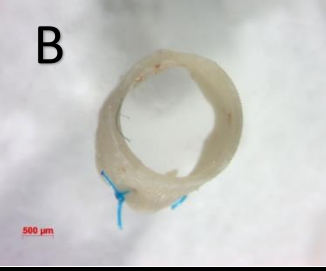
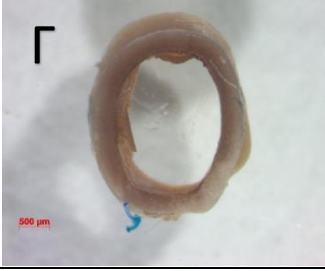
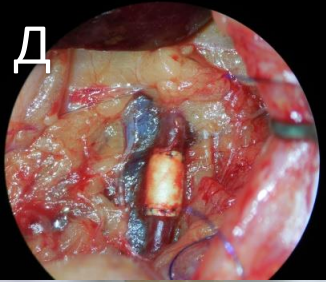
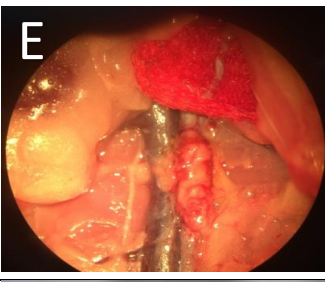
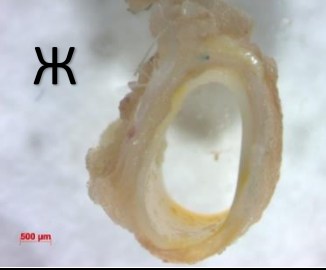
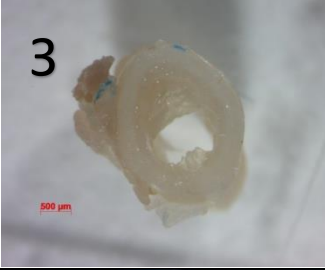
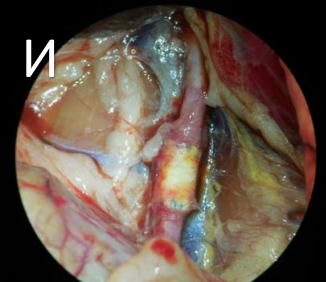
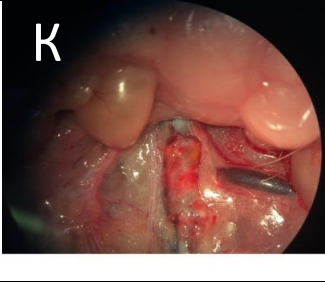
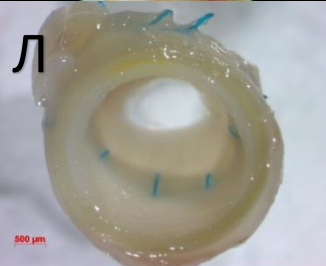
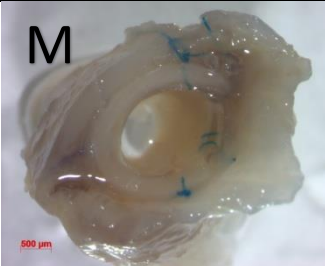
	Тек-ЖЛ-Бив	ПТФЭ
1 неделя		
		
12 неделя		
		
24 недели		
		

Рисунок 6. Внешний вид ПС на разных сроках наблюдения. А, Б, Д, Е, И, К – обзорная микроскопия (хирургический микроскоп ОРМІ Рісо, увеличение x 6); В, Г, Ж, З, Л, М – обзорная микроскопия поперечных срезов ПС после

эксплантации (микроскоп Stereo Discovery V 12, масштабная линейка = 500 мкм)

По данным обзорной микроскопии поперечных срезов ПС и УЗИ-исследования (Рис. 6 и таб. 3) видно, что в обоих исследуемых группах имеется тенденция к увеличению толщины неоинтимального слоя с течением времени. Для протезов из ПТФЭ эти процессы выражены в большей степени. При этом, при межгрупповом сравнении, статистически значимой разницы толщины неоинтимального слоя в различных протезах, на всех сроках наблюдения, получено не было. Однако при УЗ-исследовании области оперативного вмешательства отмечается статистически значимое увеличение скорости кровотока в группе ПТФЭ, по сравнению с группой Тек-Жл-Бив на 12-й и 24-й неделе (таб. 4). При этом скоростные характеристики в области операции группы Тек-Жл-Бив значимо не отличались от группы животных без оперативного вмешательства, которым дополнительно было выполнено УЗИ. Отдельно можно отметить диффузное пропитывание стенок ПС из ПТФЭ эритроцитами, наблюдаемое уже на 1-й неделе после имплантации. Так же в этой группе отмечается более выраженное нарастание неоадвентициального слоя, особенно спустя 24 недели после имплантации.

Таблица 4. Скорость кровотока в протезе по данным прижизненного УЗИ исследования и толщина неоинтимы эксплантированных протезов по данным обзорной микроскопии на разных сроках наблюдения.

Вид протеза	1 неделя		12 недель		24 недели	
	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с
Тек-Жл-Бив	5,18±2,26	0,93 ± 0,10	31,29±8,32	1,03 ± 0,18	47,71±7,46	1,16 ± 0,09
ПТФЭ	6,29±3,32	1,07 ± 0,11	44,57±14,84	1,72 ± 0,1	59,86±12,22	1,74 ± 0,08
p	0,532	0,401	0,378	0,014	0,128	0,012

Из данных гистологического исследования (рис. 7) видно, что после первой недели имплантации на внутренней поверхности части протезов, как

Тек-Жл-Бив, так и ПТФЭ отмечалось формирование фибринозно-эритроцитарных тромбов. При этом в протезах из ПТФЭ такие тромбы занимают больший объем и характеризуются более рыхлой структурой (это может быть связано с тем, что эти протезы менее податливы).

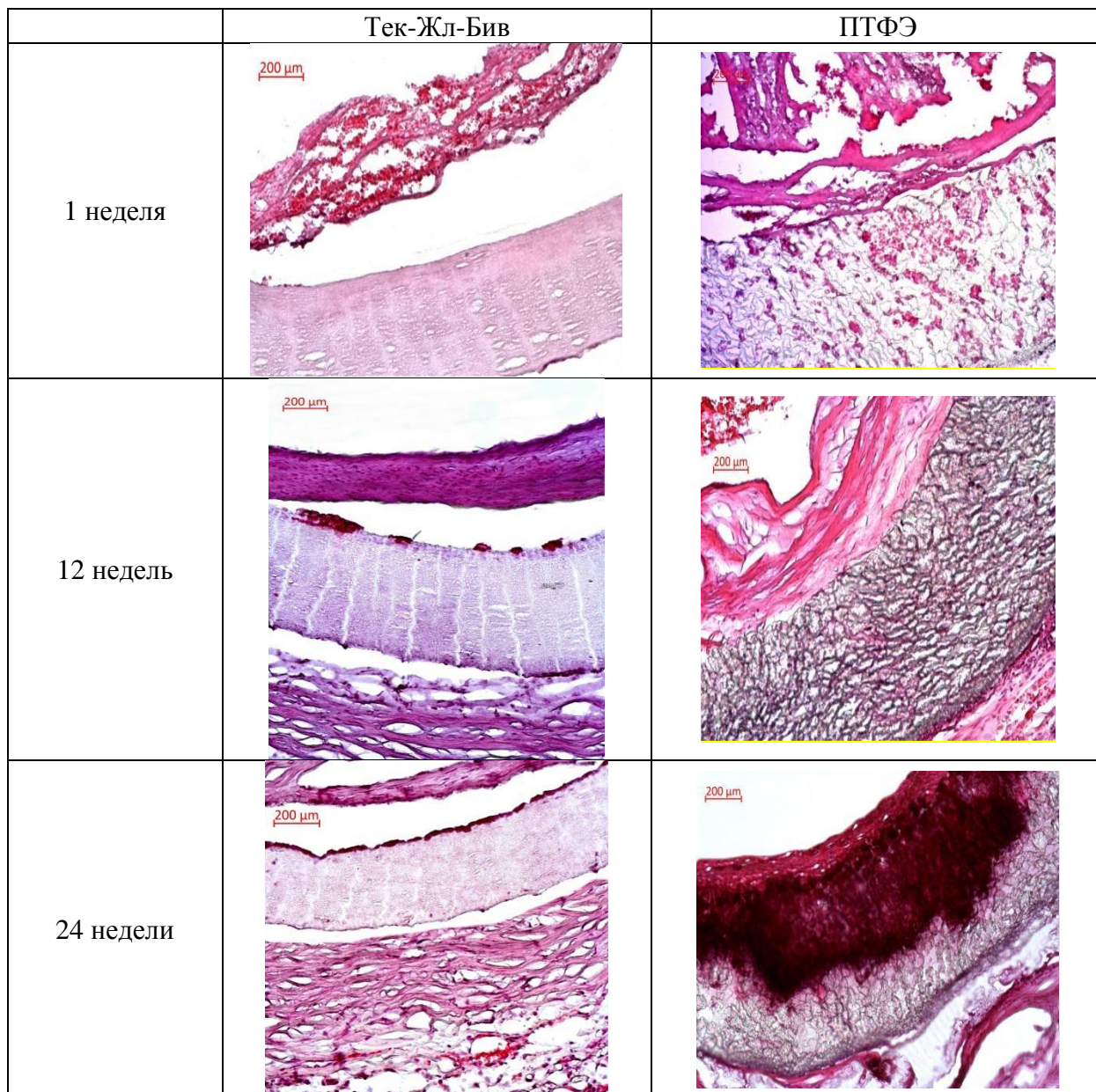
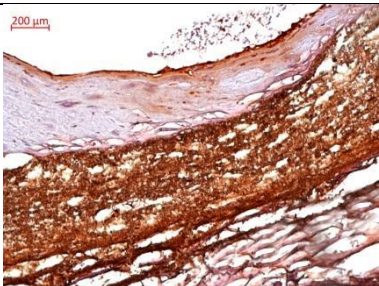

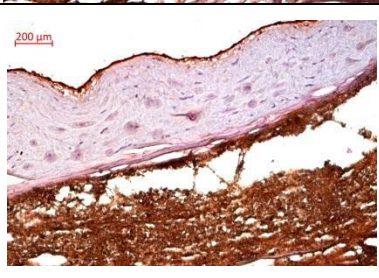
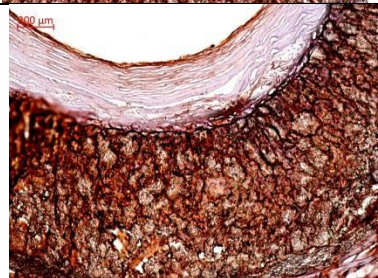
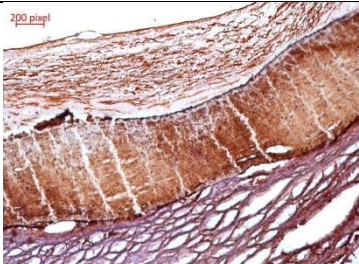
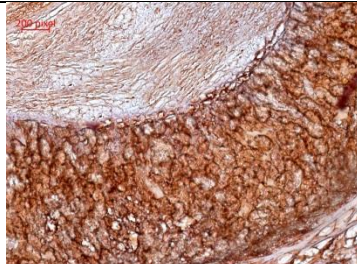
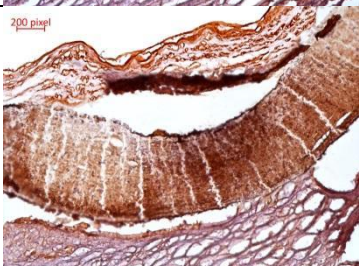
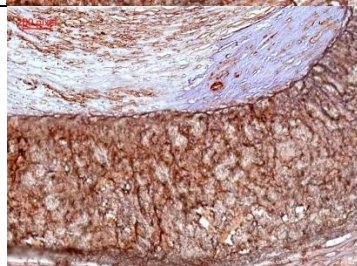


Рисунок 7. Микроскопия поперечных срезов протезов сосудов на разных сроках наблюдения. Окраска гематоксилин-эозин. Световой микроскоп AxioCam Erg5s с программным пакетом ZEN 2.3. Увеличение x200.

В протезах ПТФЭ отмечается набухание и диффузная инфильтрация стенки протеза эритроцитами. Стенка протезов Тек-Жл-Бив сохраняла свою целостность и строение. Признаков формирования неоинтимального и

адвентициального слоя в этот период не наблюдается. Во всех протезах на 3-м и 6-м месяце имплантации наблюдается формирование неоинтимального слоя, который соответствует в целом нормальному строению интимы сосуда (рис. 7, 8). Это подтверждалось наличием эндотелиальной выстилки, в которой обнаружена положительная экспрессия фактора 8 (рис. 8А), наличие коллагена 4 типа как в пределах базальной мембраны, так и в толще сформированной интимы (рис. 8Б). При этом экспрессии α -SMA в сформированной неоинтиме обнаружено не было (рис. 8В).

А	Тек-Жл-Бив	ПТФЭ
Фактор VIII		
12 недель		
24 недели		
Б		
Коллаген IV		
12 недель		
24 недели		

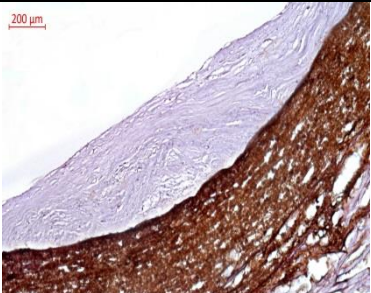

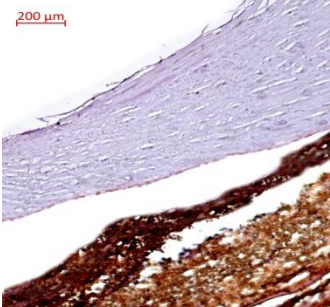
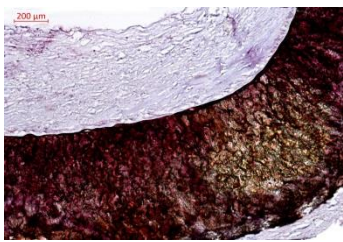
В		
α -SMA		
12 недель		
24 недели		

Рисунок 8. Иммуногистохимическое исследование протезов сосудов на больших сроках наблюдения. ИГХ окраска с антителами к Factor VIII (А), к коллагену IV типа (Б) и к гладкомышечному актину (α -SMA) (В). Световой микроскоп AxioCam Erc5s с программным пакетом ZEN 2.3. Увеличение x200.

В стенках протезов отмечалась преимущественно «пылевидная» кальцификация (рис. 7) различной степени выраженности. Интенсивность накопления кальция отличается как между типами протезов, так и между протезами, имплантированными на разные сроки. Так, в ПС, эксплантированных на 7 сутки, не было обнаружено очагов кальцификации ни в одном из типов протезов. Протезы ПТФЭ, эксплантированные спустя 12 недель, содержат в 10 раз больше кальцификатов, чем протезы из Тек-Жл-Бив, имплантированные на тот же срок (таб. 4). Спустя 24 недели после имплантации протезы из ПТФЭ существенно сильнее кальцифицируются – площадь кальцифицированных участков выше в 4,5 раза, чем в протезах из Тек-Жл-Бив (таблица 4, Рис. 7). Площадь кальцифицированных участков возрастает приблизительно в 4 раза в группе Тек-Жл-Бив, и в 2 раза в группе ПТФЭ в период между 12 и 24 неделями после имплантации ПС.

Таблица 4. Процент кальциноза стенок ПС

Вид протеза	12 недель	24 недели	P(12, 24)
Тек-Жл-Бив	0,6 [0,30; 1,10]	2,85 [1,10; 5,20]	0,028
ПТФЭ	6,55 [5,80; 6,60]	13,65 [12,20; 15,50]	0,027
P	0,005	0,005	

*Сравнение по горизонтали: p (12, 24) - сравнение показателей внутри одной группы на 12 и 24 неделе наблюдения;

В неоадвентициальном слое всех ПС отмечалось формирование фиброзной ткани различной плотности с наличием сосудов синусоидного (капиллярного) типа и очаговой моноклеарной инфильтрацией (рис. 7).

Анализ клеточного состава стенок эксплантированных ПС выявил статистически достоверную большую клеточную плотность в стенках протезов из ПТФЭ, по сравнению с ПС из Тек-Жл-Бив, как после 12, так и после 24 недель функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс (таб. 5). Наблюдаемые различия могут быть объяснены повышенной проницаемостью протезов ПТФЭ для крови и её форменных элементов, что подтверждается, также, и повышенной их эритроцитарной инфильтрацией на 1 неделе эксплантации (рис. 7).

Морфометрическое исследование новообразованной интимы и стенок исследуемых протезов выявило ряд отличий между контрольными и исследуемыми протезами. На 12 неделях наблюдения плотность клеток в неоинтима протезов сосудов из Тек-Жл-Бив в 1.5 раза выше, чем в протезах из ПТФЭ. На 24 неделях наблюдения эта разница несколько сокращается, однако общая тенденция остается прежней. Клеточный состав интимы ПС представлен как небольшими веретенообразными клетками с различимыми цитоплазматическими отростками, так и клетками с мелкими мономорфными ядрами и слабо выраженной цитоплазмой (рис. 7, табл. 5). Экспрессия эндотелиального маркера Фактор VIII более ярко и плотно выражена на поверхности неоэндотелиального слоя в протезах Тек-Жл-Бив, в то время как

в протезах ПТФЭ отмечается его более «рыхлое», диффузное распределение. Экспрессия коллагена IV типа присутствует во всех типах, исследуемых протезов, но в группе Тек-Жл-Бив сконцентрирована более плотно, сразу под неоэндотелиальным слоем, в отличие от протезов ПТФЭ, где распределение более диффузное по всей толщине неоинтимы. Экспрессия гладкомышечного актина (α -SMA) в неоинтимае обоих типов ПС практически отсутствует.

Таблица 5. Количество клеток в неоинтимальном слое и толщине стенок ПС

Вид протеза	Количество клеток в неоинтимальном слое			Количество клеток в толщине стенок		
	12 недель	24 недели	p (12,24)	12 недель	24 недели	p (12,24)
Тек-Жл-Бив	157.00 [113.00; 180.00]	33.00 [15.00; 41.00]	0.021	1.00 [1.00; 2.00]	2.00 [1.00; 5.00]	0.109
ПТФЭ	100.00 [88.00; 107.00]	26.00 [19.00; 34.00]	0.028	16.00 [12.00; 23.00]	17.00 [4.00; 30.00]	0.916
p	0.05	0.32		0.005	0.031	

*Сравнение по горизонтали: p (12, 24) - сравнение показателей внутри одной группы на 12 и 24 неделе наблюдения;

Исследование биодеградации эксплантированных протезов сосудов

После подготовки образцов была проведена ИК-спектроскопия для анализа окислительной и гидролитической деградации полиуретанов в организме животных. Основные полосы поглощения в ИК-спектре, которые используются для оценки биостабильности полиуретанов -1730 см⁻¹ (nonhydrogen-bonded urethane carbonyl (NH-CO-O-)), 1703 см⁻¹ (nonhydrogen-bonded urethane carbonyl (NH-CO-O-)), 1220 см⁻¹ (urethane C-N, Amide III), 1110 см⁻¹ (ether C-O-C в мягком сегменте), 1075 см⁻¹ (urethane ether C-O-C). Следует отметить, что в ИК-спектрах полиуретанов, эксплантированных из крыс, не было отмечено появление новых полос поглощения по сравнению с контрольными образцами. Для Тек наблюдается уменьшение соотношений интенсивностей поглощения I1110 /I1220 и I1110/I1075 при увеличении продолжительности нахождения в организме крысы. Это говорит о незначительной окислительной деградации полиуретана. На незначительный

гидролиз уретановых связей в Тес-80А указывает изменением соотношений интенсивностей полос поглощения I1075/I1220 ИК-спектрах.

Молекулярная масса Тек уменьшилась незначительно, что говорит о слабой деградации полиуретана

Для того, чтобы оценить влияние времени имплантации и изменения мол массы Тек на прочность была измерена прочность эксплантированных ПС. Из табл. 6 и рис. 9 следует, что прочность ПС падает приблизительно на 28% после 3-х месяцев функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс. Однако к 6 месяца прочность ПС восстанавливается и даже на 14% превышает прочность исходных протезов. При этом все ПС имеют приблизительно одинаковое относительное удлинение при разрыве, ПС после 3-х мес практически не отличаются по «жесткости/эластичности» от исходных ПС, в то время как после 6 мес ПС становится более жестким и прочным. Вполне вероятно, что на начальном периоде (3 мес) происходит нарушение контактов между волокнами полимера (жесткость – близкая к исходной), а после 6 мес протез прорастает de novo синтезированной тканью, которая уменьшает подвижность волокон относительно друг друга, повышает прочность и жесткость стенки ПС.

Таблица 6. Зависимость прочности ПС на основе Tecoflex-80A™ от времени функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс

	Прочность на разрыв (МПа)	% удлинения до разрыва
Исходный	6.6±0,64	308±9,3
3 месяца	4.76± 0,71	304±10,2
6 месяцев	7.65±0,68	290±12,5

*Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение

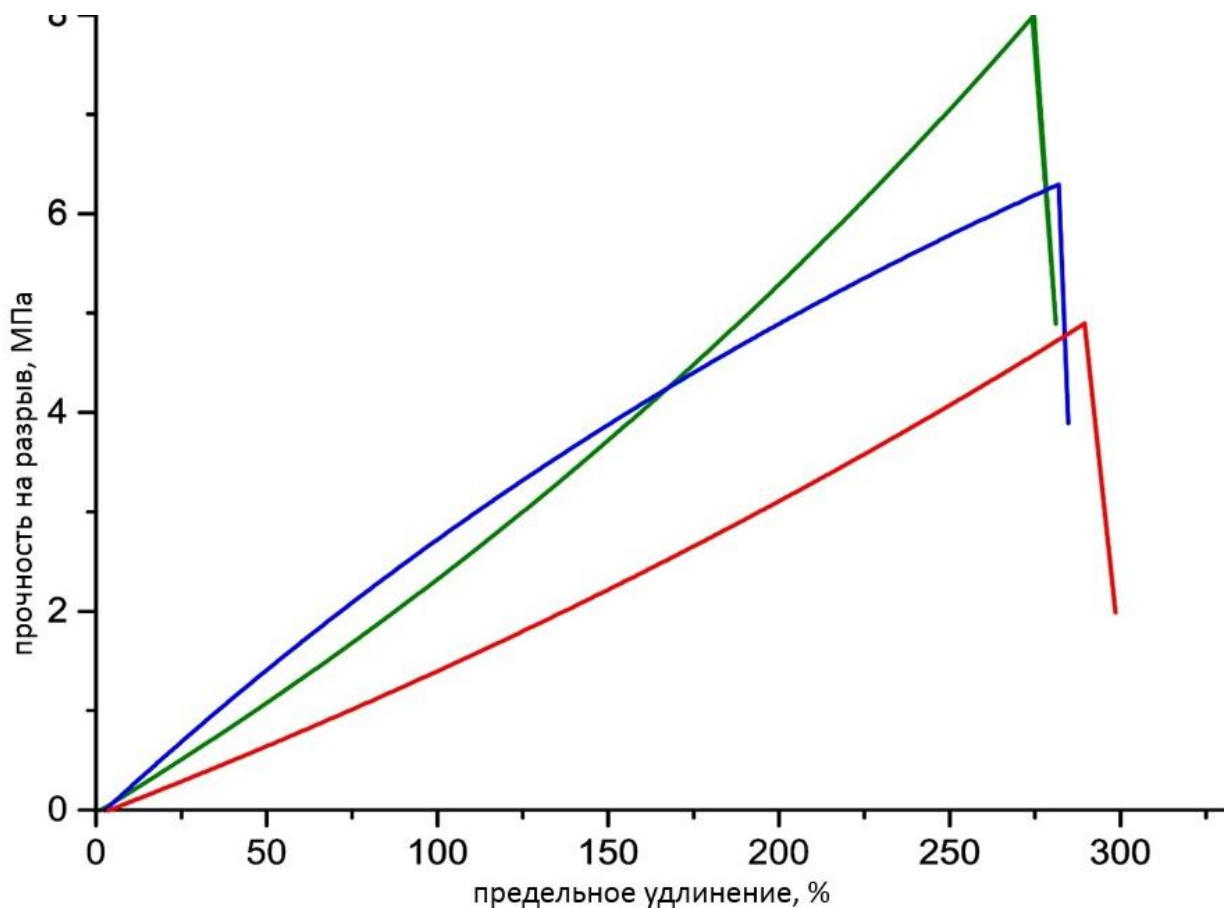


Рисунок 9. Типичные диаграммы растяжения ПС из Тек-Жл-Бив на разных сроках наблюдения. Голубая линия – контроль; Красная линия – 3 месяца; Зеленая линия – 6 месяцев.

Выводы

1. Разработан протокол изготовления двуслойных протезов сосудов методом электроспиннинга из раствора термопластичного полиуретана Tecoflex EG-80A™ в гексафторизопропанол. Для улучшения биосовместимости и механических свойств протезов предложено вводить в состав раствора базового полимера 15% желатин. Для улучшения гемосовместимости контактирующей с кровью поверхности предложено введение в состав волокон внутреннего слоя ПС прямых антикоагулянтов (1,5% бивалирудина).
2. Разработанный протокол изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного полиуретана

Tecoflex EG-80A™, желатина и бивалирудина, позволяет создать протезы сосудов малого диаметра, не уступающие (а по многим характеристикам и превосходящие) по прочности протезам сосудов из ПТФЭ, но, при этом, более эластичные и податливые, чем протезы сосудов из ПТФЭ. Показано, что прочность экспериментальных протезов сосудов на разрыв составляет $15,60 \pm 0,80$ МПа (в группе ПТФЭ – $16,00 \pm 0,90$ МПа, $p=0,37$), прочность на прорыв нитью $470,00 \pm 35,00$ г*силы (в группе ПТФЭ – $170,00 \pm 5,70$ г*силы, $p=0,005$), давление разрыва 14896 ± 304 мм рт. ст. (в группе ПТФЭ - 1327 ± 289 мм рт. ст., $p=0,005$), податливость 18.6 ± 0.11 %/мм рт. ст.⁻¹ $\times 10^{-2}$ (в группе ПТФЭ - 3.26 ± 0.08 %/мм рт. ст.⁻¹ $\times 10^{-2}$, $p=0,005$).

3. Изготовленные протезы сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина методом электроспиннинга, обладают низкой цитотоксичностью для эндотелиоцитов, а также, хорошей гемосовместимостью. Показано, что эндотелиоциты хорошо прикрепляются и пролиферируют на поверхности матриксов. Введение в состав волокон внутреннего слоя ПС 1,5% бивалирудина позволяет добиться его длительного высвобождения (50% в течение 10 суток) и, соответственно, пролонгированно улучшить гемосовместимость контактирующей с кровью поверхности. Агрегация тромбоцитов снижается не менее, чем в 4 раза по сравнению с матриксами из чистого полиуретана, повышая гемосовместимость материала в ближайшей и длительной перспективе. Исследуемые матриксы показывают низкий процент гемолиза - 2,55%.

4. Интраоперационная оценка качества изготовления протезов показала, что они устойчивы к «разволоknению» при отрезании. Через проколы стандартными атравматическими иглами в исследуемых протезах нет кровопотери, что достоверно снижает время гемостаза анастомозов в момент основного этапа операции с 24,5 мин в группе ПС из ПТФЭ до 18,5 мин в группе ПС из Тек-Жл-Бив. При запуске кровотока по имплантированному сосуду было отмечено, что протезы из ПТФЭ пропитываются кровью, в отличие от ПС из Тек-Жл-Бив.

5. ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое на сроках наблюдения до 24 недель показали более высокую проходимость (94,5%), по сравнению с ПС из ПТФЭ (66,6%), при этом линейные скорости кровотока у экспериментальных протезов на всех сроках наблюдения значимо не отличались от нормальных артерий. Экспериментальные ПС показали высокую биостабильность, невысокую кальцификацию их стенок (в отличие от протезов из ПТФЭ, в которых спустя 24 недели после эксплантации площадь кальцифицированных участков выше в 4,5 раза) и хорошую клеточную заселенность внутренней поверхности, контактирующей с кровотоком. Иммуногистохимическое исследование показало формирование функционально полноценного неоэндотелиального слоя у экспериментальных протезов с наличием необазальной мембраны, что объясняет хорошую проходимость на всех сроках наблюдения.

6. Совокупность всех свойств, а именно: прочность, биостабильность, способность к активному заселению матрикса клетками, формированию полноценного слоя неоинтимы, низкой кальцификации стенок, тканеинженерные ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое может быть рекомендован для дальнейшего исследования.

Практические рекомендации

1. Для улучшения биосовместимости и механических свойств протезов рекомендуется введение в состав раствора базового полимера белка внеклеточного матрикса, например, желатина.

2. Для улучшения гемосовместимости контактирующей с кровью поверхности рекомендуется введение в состав волокон внутреннего слоя ПС прямых антикоагулянтов, например, бивалирудина.

3. Для замены участка поврежденного сосуда рекомендуется использование ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое, так как они обладают хорошей прочностью, биостабильностью, способностью к

активному заселению клетками, формированию полноценного слоя неоинтимы, низкой кальцификацией стенок.

4. Необходимость предварительной обработки кровью сосудистых протезов отсутствует, однако рекомендуется смочить его физиологическим раствором перед имплантацией. Не допускается контакт протеза с органическими растворителями, например, спиртом.

5. Процедура имплантации заявленных в настоящей работе протезов не должна сопровождаться грубыми манипуляциями на трансплантате или нативном сосуде, особенно в зоне анастомоза.

6. Протез не перекручивается и не деформируется во время имплантации, однако необходимо точное соответствие длины и диаметра протеза заменяемому участку сосуда, т.к. его избыток или недостаток может стать причиной деформации зон анастомозов и, следовательно, его дисфункции. Запрещается использование слишком короткого протеза, т.к. его чрезмерное натяжение может приводить к отслолке внутреннего слоя.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ (Публикации в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем перечне ВАК)

- 1) Gostev, A.A. Polyurethanes in cardiovascular prosthetics / A.A. Gostev, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **Polymer Bulletin**. – 2018. – Т. 75. – №. 9. – С. 4311-4325.
- 2) Mechanical properties and biological behavior of 3D matrices produced by electrospinning from protein-enriched polyurethane / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y. Gao, Y.A. Chesalov, A.V. Shutov, E.A. Pokushalov, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **BioMed research international**. – 2018. – Т. 2018. – С. 1-10.
- 3) Study of hemocompatibility and endothelial cell interaction of tecoflex-based electrospun vascular grafts / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y.A. Chesalov,

A.A. Karpenko, A.M. Karaskov, P.P. Laktionov // **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. – 2019. – T. 68. – №. 1-3. – С. 34-43.

4) Electrospun polyurethane-based vascular grafts: physicochemical properties and functioning in vivo / A.A. Gostev, V.S. Chernonosova, I.S. Murashov, D.S. Sergeevichev, A.A. Korobeinikov, A.M. Karaskov, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **Biomedical Materials**. – 2019. – T. 15. – №. 1. – С. 015010.