

На правах рукописи

**Кузнецов Константин Анатольевич**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОГО  
МЕМБРАННОГО ПОКРЫТИЯ БАЛЛОНРАСШИРЯЕМЫХ  
СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ**

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
кандидат биологических наук

**Карпенко Андрей Анатольевич**  
**Лактионов Павел Петрович**

**Официальные оппоненты:**

**Антонова Лариса Валерьевна** – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», лаборатория клеточных технологий отдела экспериментальной медицины, заведующая лабораторией

**Вавилов Валерий Николаевич** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра хирургии факультетской с курсами лапароскопической и сердечно-сосудистой хирургии с клиникой, профессор кафедры

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.027.01, созданного при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России по адресу: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России и на сайте [www.meshalkin.ru](http://www.meshalkin.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

**Ученый секретарь**  
**диссертационного совета,**  
доктор медицинских наук

Альсов Сергей Анатольевич

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Основной проблемой долгосрочной эффективности внутрисосудистых операций при атеросклерозе остаются рестеноз и реокклюзия восстановленного сосудистого просвета [Mozaffarian D. et al., 2015]. Его развитию способствует вторичная воспалительная реакция в зоне имплантированного устройства, а также локальная активация агрегации тромбоцитов и тромбообразование [Bonaa K. H. et al., 2016].

Для уменьшения этих явлений были разработаны стенты с цитостатиками, которые замедляют локальную пролиферацию клеток и развитие воспалительных реакций. Однако большинство известных устройств, содержащих на своей поверхности цитостатики, имеют ограниченный период воздействия на прилегающую сосудистую стенку, так как лекарственные препараты фактически находятся на элементах конструкции стента и быстро высвобождается из зоны внедрения [Di Mario C. et al., 2000].

В некоторых устройствах препарат фиксируется на металлическом каркасе с применением биodeградируемой или биостабильной матрицы. Увеличение периода выделения цитостатика, по мнению авторов, способствует снижению скорости развития рестенозов в отдаленные сроки наблюдения. Однако используемые матрицы, как правило, активируют локальное тромбообразование, приводят к вторичной дистальной эмболизации сосудистого русла фрагментами разрушенного полимера или цитостатиками. Расположенные между балками стента остатки «раздавленных» атеросклеротических масс способствуют вторичной активации пролиферации сосудистой стенки [Güneş H. et al., 2017].

Увеличение эффективности функционирования стентов и удлинение времени их функционирования без рестенозов до сих пор востребовано в современной сердечно-сосудистой хирургии, поэтому исследование и улучшение свойств покрытий стентов остается актуальной научной задачей.

### **Степень разработанности темы исследования**

Клиническая эпоха сосудистого вмешательства в качестве альтернативы «открытому» оперативному вмешательству началась в 1977 г. с введения баллонной ангиопластики Gruntzig A. с последующей первой имплантацией

человеку саморасширяющегося стента в 1986 г. Sigwart U., а в дальнейшем и первой имплантацией баллонно-расширяемого стента Palmaz J. в 1987 году. Использование стентов для эндоваскулярного восстановления кровотока в стенозированных сосудах произвело революцию в сосудистой хирургии, однако, несмотря на множество вариантов стентов, представленных на рынке, нет таких, которые бы полностью решали проблему рестеноза в области установки. Для уменьшения роста неоинтимы в стентированных участках сосудов, были разработаны устройства с наносимыми на их поверхность цитостатическими и цитотоксическими лекарственными препаратами. Для оптимизации скорости высвобождения лекарств было предложено наносить их в смеси с биodeградируемыми или биостабильными полимерами.

Установка лекарственно-покрытых стентов в сочетании с двойной антиагрегантной терапией, позволило снизить случаи развития рестеноза и реокклюзии восстановленного сосудистого просвета у пациентов, однако не решило проблемы развития тромбозов и гиперплазии неоинтимы в отдаленном послеоперационном периоде.

В настоящее время нет идеального сосудистого стента, отвечающего всем современным требованиям в предотвращении рестеноза. Интенсивно изучаемый в последние годы электроспиннинг является методом выбора создания многокомпонентных покрытий для сосудистых стентов, примером может система с покрытием РК Parugus от BIOTRONIK.

### **Цель исследования**

Разработать и оценить эффективность функционирования лекарственно-наполненного покрытия голометаллического баллон-расширяемого сосудистого стента в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

### **Научная гипотеза**

Нанесенное поверх балок голометаллического стента лекарственно-наполненное покрытие, изготовленное методом электроспиннинга, позволит предохранить стенку сосуда от контакта с металлом, обеспечить равномерное высвобождение введенного в его состав лекарства по всей стентированной поверхности, уменьшить воспаление и вторичную пролиферацию прилегающих клеток.

### **Задачи исследования**

1. Разработать лекарственно-наполненное покрытие, которое может растягиваться в 2-2,5 раза, причем, после увеличения диаметра стента и смачивания покрытия не оказывать существенной остаточной нагрузки на стент.

2. Исследовать механические и физико-химические свойства покрытия. Подобрать оптимальный состав покрытия, при котором кинетика высвобождения паклитаксела имеет двухфазный характер с быстрой первой и медленной второй фазой.

3. Определить рабочую концентрацию паклитаксела в покрытии и исследовать гемосовместимость и цитотоксичность покрытия.

4. Разработать технологию нанесения покрытия на голометаллические сосудистые стенты, которая обеспечивала бы его плотную посадку на устройстве доставки, исключая диспозиционирование конструкции в процессе установки стента и не создающее препятствий при продвижении по сосудистому руслу к месту его имплантации (разволоknение концов).

5. Выполнить сравнительное исследование безопасности и эффективности голометаллических стентов и стентов с лекарственным покрытием в экспериментах на лабораторных животных.

### **Научная новизна исследования**

1. Впервые предложен и изготовлен методом электроспиннинга материал, пригодный для покрытий голометаллических стентов и обеспечивающий двухфазную кинетику высвобождения паклитаксела с длительной второй фазой. При помощи радиоактивно-меченного паклитаксела выполнено исследование высвобождения препарата в физиологический раствор и сыворотку крови, оптимизирован состав покрытия.

2. Выполнено исследование механических, физико-химических свойств материала и его взаимодействия с кровью. В экспериментах *in vitro* показано, что такой материал удовлетворяет требованиям, предъявляемым к покрытию металлических стентов.

3. Разработаны: протокол нанесения покрытия с пролонгированным выходом паклитаксела в прилегающую сосудистую стенку, процедура имплантации стентов и протоколы их исследования *in vivo* на лабораторных животных.

4. В эксперименте на лабораторных животных выполнено сравнительное исследование голометаллических стентов и стентов с лекарственно-наполненным покрытием. Обнаружено, что стенты с покрытием обладают высокой гемо- и биосовместимостью, не склонны к индукции обширной неоинтимы, могут быть рекомендованы для дальнейших клинических исследований.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработан и теоретически обоснован протокол многокомпонентного раствора для изготовления электроспиннингом покрытия сосудистого стента с двухфазной кинетикой высвобождения препарата. Разработана технология изготовления и нанесения на голометаллические стенты лекарственно-наполненного покрытия. Разработаны подходы и протоколы, пригодные для характеристики таких покрытий. Получены данные, позволяющие рекомендовать использование покрытых голометаллических стентов в сердечно-сосудистой хирургии.

Результаты исследования могут быть использованы в обучающем процессе, а также в учреждениях медицинского профиля для разработки стентов сосудов нового поколения с улучшенными характеристиками.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой диссертационного исследования послужили труды зарубежных и отечественных авторов по проблеме рестеноза. Для решения поставленных задач использовались методы: аналитические, физико-химические, ультразвуковые, рентгенологические, морфологические, гистологические, статистический анализ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Изготовленное методом электроспиннинга многокомпонентное лекарственно-наполненное покрытие, обладает требуемыми упруго-эластическими свойствами, деформируется без разрывов при ремоделировании голометаллическим стентом, не оказывает существенной остаточной нагрузки на стент после растяжения, не изменяет линейные размеры при смачивании водой или кровью, формирует плотные контакты с поверхностью стента и не требует специальной фиксации на стенте.

2. Кинетика высвобождения паклитаксела из лекарственно-наполненного покрытия имеет двухфазный характер с быстрой первой фазой – за первые 24

часа, высвобождается до 40 % цитостатика, и длительной второй – еще 20 % высвобождается за 27 суток, а оставшиеся 40 % цитостатика высвобождается по мере дальнейшей биодеградация покрытия.

3. Оптимальная концентрация паклитаксела в покрытии составила 0,46 мкг/мм<sup>2</sup>, матрицы состава из ПКЛ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО, цитотоксичны в отношении ГМК, и гемосовместимы; не вызывают гемолиза, и с ними практически не связываются тромбоциты и другие клетки крови.

4. Покрытие, нанесенное на голометаллический стент не диспозиционируется в процессе установки, его края не склонны к разволокнуению при продвижении через систему доставки и сосудистое русло. Для имплантации не требуется применение специальных интродьюсеров, проводниковых катетеров, так как покрытие остается прочно ассоциированным со стентом и не меняет свой объем при контакте с интродьюсером диаметром до 5 Fr, кровью и стенками артерий.

5. При сравнительном изучении в эксперименте *in vivo* стентов с лекарственно-наполненным покрытием и голометаллических стентов показано, что стенты с лекарственно-наполненным покрытием свободно доставляются к месту имплантации при помощи стандартных проводников и катетеров диаметром до 5 Fr; успех процедуры доставки устройств и их развертывания в зоне интереса в группах сравнения составил 100 %, без потери устройства, отсутствия дополнительных осложнений со стороны артерий доступа, проводящих артерий и места их имплантации. Стенты с предложенным покрытием устанавливаются путем стандартного раздувания, несущего стент баллона и, по данным прижизненного и постэксплантационного исследования, достоверно снижают гиперплазию неоинтимы в период наблюдения до 6 месяцев.

### **Степень достоверности исследования**

Достоверность диссертационного исследования подтверждают достаточное количество экспериментальных наблюдений (36 наблюдений), дизайн исследования, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к научному анализу с применением современных методов статистической обработки и программного компьютерного обеспечения, грамотная интерпретация полученных данных. Данные, представленные в настоящей работе, не получили критических

замечаний и были опубликованы в зарубежных рецензируемых журналах первого и второго квартилей.

### **Апробация результатов исследования**

Материалы и основные положения работы представлены и обсуждены на: Workshop «Prevention of microbial contamination of biomaterials for tissue regeneration and wound healing (Англия, Ланкастер, 2018); 4-ой Международной конференции по биомедицинским полимерам и полимерным биоматериалам (Краков, Польша, 2018); XXXV Международной конференции «Внедрение высоких технологий в сосудистую хирургию и флебологию» (Санкт-Петербург, 2019); IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019); European Chapter Meeting 2019 TERMIS EU (Родос, Греция, 2019).

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты настоящего исследования внедрены в экспериментальные исследования на базе организаций: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, описание используемых материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводы, практические рекомендации, список используемой литературы, содержащий 123 источника, из них 10 отечественных и 118 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 21 рисунком.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 5 печатных работ, из них 4 статьи в журналах из перечня ВАК, получен 1 патент на изобретение.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал личное участие в разработке и изготовлении лекарственно-наполненного покрытия методом электроспиннинга, исследовании его физико-химических и механических свойств, исследовании



кинетики высвобождения паклитаксела из матриц разного состава, исследования токсичности паклитаксела и серии экспериментов *in vitro*.

Автором лично выполнены все операции по имплантации и забору исследуемых стентов, а также мониторинг состояния животных на протяжении всего срока наблюдения с оценкой прижизненной проходимости подвздошных артерий кроликов с помощью ультразвукового доплеровского сканирования.

Автор лично выполнял послеоперационное исследование оперируемой области и эксплантированных стентированных сосудов, подготовил материалы для гистологического исследования и принимал участие в анализе данных гистологического исследования. Выполнял статистическую обработку и анализ полученных данных.

Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, постоянное внимание и организационную помощь в выполнении этого исследования своим научным руководителям: доктору медицинских наук, профессору Карпенко Андрею Анатольевичу; кандидату биологических наук Лактионову Павлу Петровичу. Автор искренне благодарит за дружеское участие Покушалова Е.А., Сергеевича Д.С., Степанову А.О., Черноносову В.С., Харькову М.В., Рассказова Г.А.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Для достижения цели и решения поставленных задач была разработан дизайн экспериментального исследования (рисунок 1).

Разработку протокола изготовления лекарственно-наполненного покрытия (ЛНП), установку для электроспиннинга, процесс электроспиннинга, оценку кинетики высвобождения радиофармпрепаратов из покрытия, обзорную микроскопию выполняли на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Оперативное вмешательство, содержание животных, ультразвуковую доплерографию и гистологические окраски препаратов выполняли на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

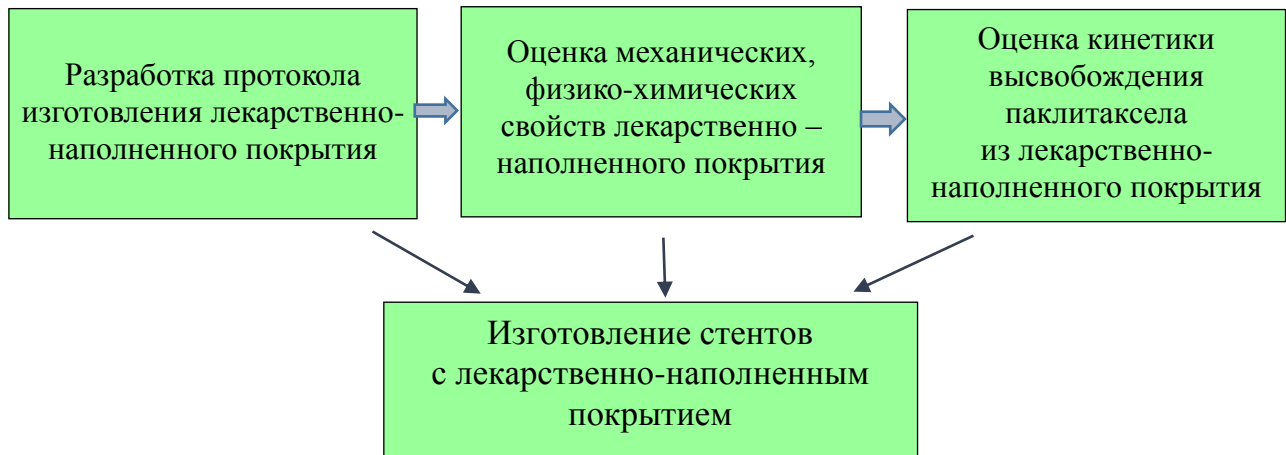
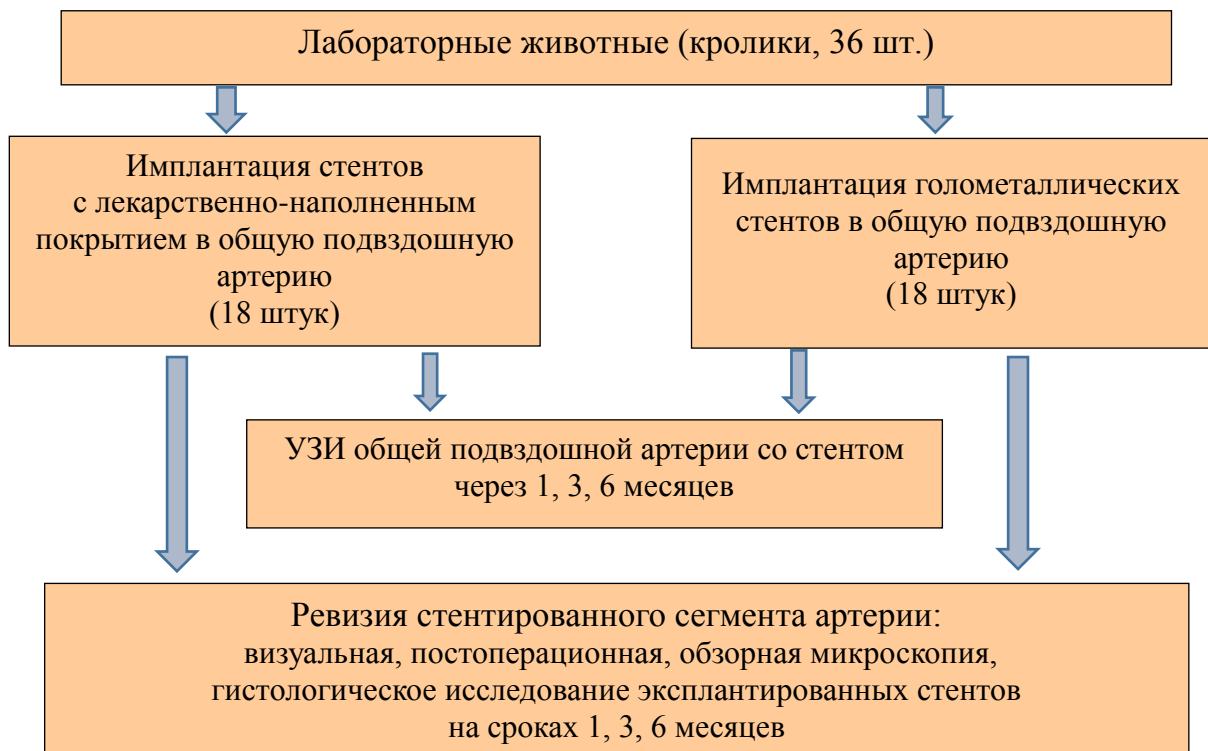
**I ЭТАП in vitro****II ЭТАП in vivo**

Рисунок 1 – Дизайн исследования

Условия получения матриц из поликапролактона (ПКЛ) с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), паклитакселом (ПТХ) и диметилсульфоксидом (ДМСО) методом электроспиннинга, отработанные в результате предварительных экспериментов, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия электроспиннинга для изготовления исследуемых матриксов

Состав матрикса	Параметры электроспиннинга		
	Напряжение, кВ	Скорость подачи раствора, мл/ч	Расстояние между электродами, см
ПКЛ + ПТХ	23,0	1,2	20
ПКЛ + ПТХ +10 % ЧСА	23,5	1,3	20
ПКЛ + ПТХ +3 % ДМСО	23,0	1,3	20
ПКЛ + ПТХ +6 % ДМСО	24,5	1,3	20
ПКЛ + ПТХ +10 % ЧСА + 3 % ДМСО	24,5	1,4	20
ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 6 % ДМСО	25,0	1,4	20

Прочность матриксов на основе ПКЛ составляла от 3 до 5,1 МПа в зависимости от состава раствора для электроспиннинга. Для матриксов, содержащих ПКЛ с ЧСА область упругой деформации составляла  $8 \pm 1,5$  %, область пластической деформации  $290 \pm 16$  %, что на 2 и 20 % превышает аналогичные характеристики для матриксов из ПКЛ без белка. После удлинения матриксов из ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА и ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО вдвое, остаточная нагрузка составляет от  $1,4 \pm 0,16$  МПа до  $0,35 \pm 0,07$  МПа в сухих матриксах и от  $1,0 \pm 0,11$  до  $0,26 \pm 0,24$  во влажных матриксах, соответственно (таблица 2).

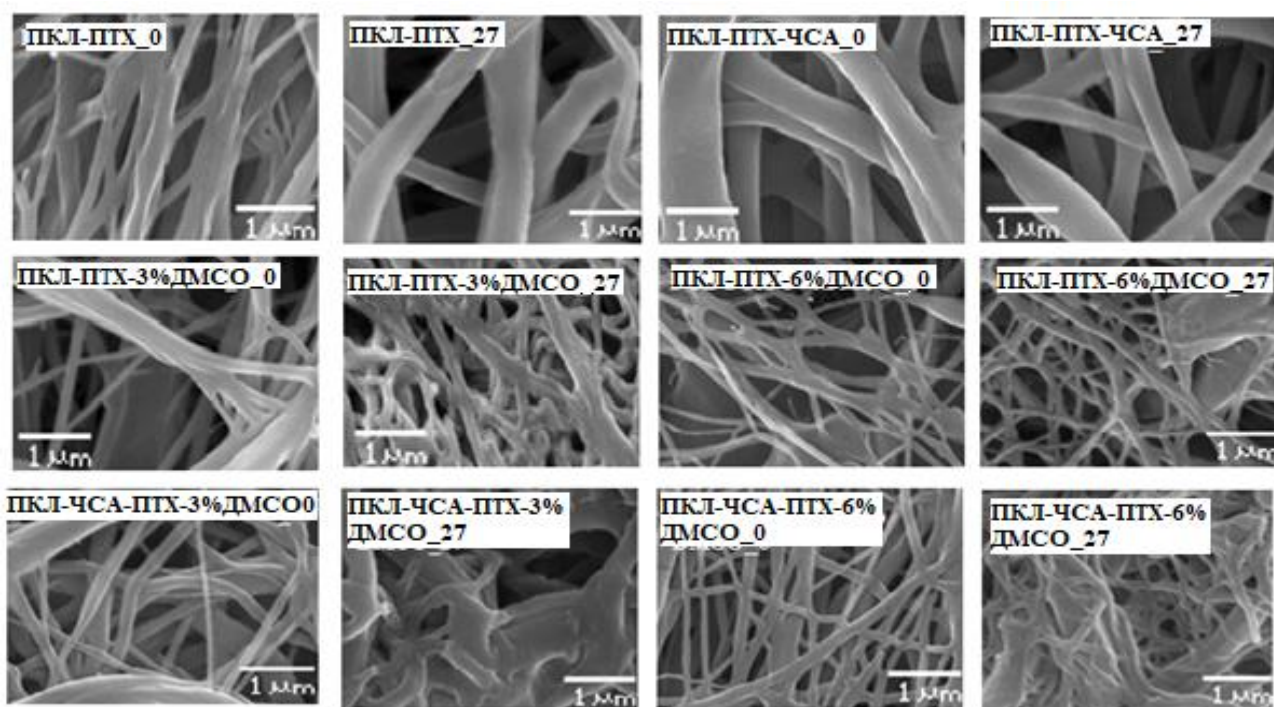
Таблица 2 – Механические свойства экспериментальных матриксов,  $M \pm \sigma$

Показатель	Матрикс из ПКЛ (контроль)	Матрикс из ПКЛ с ЧСА	p
Прочность в области упругой деформации, МПа	$3,55 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$	$p > 0,05$
Относительное удлинение при упругой деформации, %	$34 \pm 2$	$147,5 \pm 2$	$p < 0,05$
Прочность на разрыв в продольном направлении, МПа	$7,1 \pm 0,5$	$6 \pm 0,35$	$p < 0,05$
Относительное удлинение до разрыва, %	$68 \pm 5$	$295 \pm 5$	$p < 0,05$

Меченый тритием ПТХ был получен методом обмена термоактивированного трития. После очистки обращенно-фазовой хроматографией был получен препарат  $^3\text{H}$ -ПТХ с удельной объемной

радиоактивностью 1,5 mCi/ml или  $\sim 0,3$  Ci/mM. Молярную концентрацию ПТХ определяли исходя из суммарной удельной активности препарата ( $^3\text{H}$ -ПТХ+ПТХ), вносимого в матрикс, которая составляла  $\sim 47000$  cpm/nM.

Микроструктура полученных матриксов была исследована с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 2). Все они образованы микроволокнами, однако диаметр волокон зависит от состава раствора для электроспиннинга. Матрикссы из ПКЛ и ПКЛ с ЧСА состоят из волокон со средним диаметром 0,32 и 0,56 мкм. Добавление ДМСО в раствор для электроспиннинга приводит к уменьшению диаметра волокон, однако наблюдается гетерогенность в размере.



0 – свежеизготовленный матрикс,

27 – матрикс, инкубированный с физраствором в течение 27 суток

Рисунок 2 – Микроструктура 3Д матриксов по данным сканирующей электронной микроскопии. Увеличение  $\times 3000$

По данным СЭМ инкубация матриксов в физрастворе в течение 27 суток не влияет на структуру матриксов из чистого ПКЛ, ПКЛ с ЧСА, и ПКЛ с 6 % ДМСО. Матрикссы из ПКЛ с добавлением 3 % ДМСО и матрикссы из ПКЛ с добавлением ЧСА и ДМСО склонны к утолщению волокон, формированию множества контактов между волокнами, усадке, при этом матрикссы с ЧСА больше изменяют свою структуру, чем матрикссы без ЧСА.

Пористость по данным СЭМ составляет от 54 до 76 %, размеры пор в матриксах варьируют от 5,7 до 0,97 мкм. Матрикссы, изготовленные из

растворов с ДМСО менее однородны не только по диаметру волокон, но и по размеру пор (таблица 3).

Таблица 3 – Физико-химические свойства исследуемых матриц,  $M \pm m$

Образец	Диаметр волокон, $\mu\text{m}$	Диаметр пор, мкм	Пористость, %/% *	Угол смачивания, град**	Влагопоглощение, %	Потеря массы, %
5 % ПКЛ + ПТХ	$0,317 \pm 0,043$	$5,72 \pm 2,42$	78/54,1	$127,33 \pm 1,30$	$294 \pm 7$	0
5 % ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА	$0,567 \pm 0,091$	$2,66 \pm 1,21$	77/61,4	$88,89 \pm 3,03$	$589 \pm 16$	0
5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО	$0,194 \pm 0,031$	$2,01 \pm 0,73$	78/65	$128,30 \pm 2,18$	$400 \pm 11$	0
5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО	$0,135 \pm 0,017$	$0,97 \pm 0,32$	80/76,6	$132,35 \pm 3,11$	$238 \pm 9$	0
5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО + ЧСА	$0,372 \pm 0,084$	$1,97 \pm 0,52$	77/71	$124,73 \pm 3,49$	$750 \pm 13$	0
5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО + ЧСА	$0,162 \pm 0,027$	$1,35 \pm 0,40$	79/61,3	$120,52 \pm 2,66$	$883 \pm 15$	0

Примечания: \* верхнее значение – пористость, вычисленная из кажущейся плотности матрикса, нижнее – пористость по данным СЭМ;

\*\* угол смачивание определяли как среднее из, не менее, чем 5 измерений в разных участках матрикса

При высушивании матриц не удалось детектировать потерю массы, хотя известно, что матрицы из ПКЛ с 10 % ЧСА могут высвобождать в раствор белок. Однако такая потеря практически не детектируется гравиметрическими методами в условиях эксперимента (потери составляют 0,2–0,3 % веса матрикса, и при условии, что вес матрикса не более 5 мг, вес высвобожденного ЧСА может составлять не более 10–15 мкг).

Влагопоглощение матриц варьирует в диапазоне от 294 % у матриц из чистого ПКЛ до 883 % у матриц 5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО + ЧСА. Матрицы с ЧСА удерживают больше воды, что связано с формированием внутренней пористой их структуры. Матрицы из ПКЛ с ЧСА и ДМСО более гидрофильны по сравнению с таковыми без ЧСА.

Определение концентрационного распределения добавленных компонентов и ДМСО (который может влиять на кинетику высвобождения ПТХ) на поверхности матриц было исследовано при помощи рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Для оценки возможного содержания

ДСМО на поверхности образцов, был использован сигнал серы (S<sub>2p</sub>). В процессе изготовления матриц в их составе не остается ДМСО и высвобождение ПТХ не связано с диффузией ДМСО из матриц (таблица 4).

Таблица 4 – Концентрация ЧСА и паклитаксела на поверхности матриц, изготовленных из растворов ПКЛ + ДМСО + ЧСА в различных модификациях, по данным рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии

№	Образец 3Д матрикса	Исходный матрикс, %	Матрикс после инкубации в PBS, %
Концентрация человеческого сывороточного альбумина			
1	ПКЛ + 10 % ЧСА	20*	24*
2	5 % ПКЛ + 3 % ДМСО + ЧСА	18,9	27,1
3	5 % ПКЛ + 6 % ДМСО + ЧСА	16,3	21,5
Концентрация паклитаксела			
4	5 % ПКЛ + ПТХ	21,1	23,4
5	5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО	15,1	23,9
6	5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО	3,7	13,7

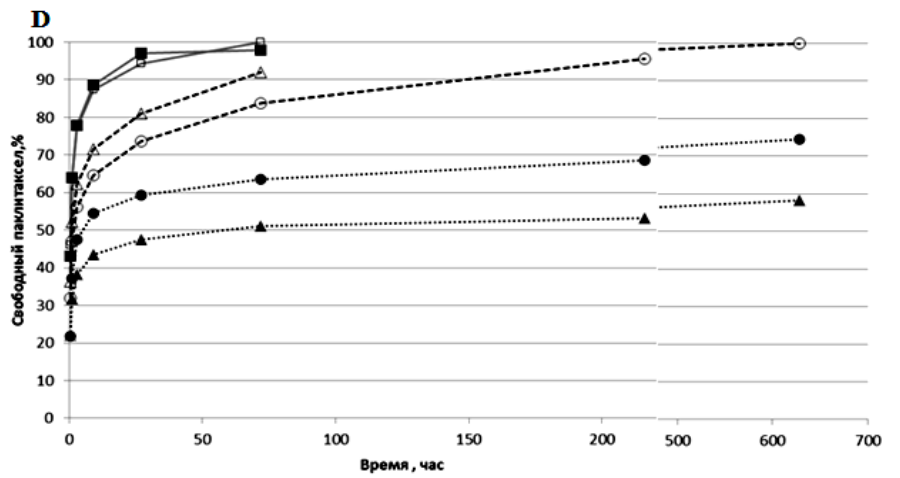
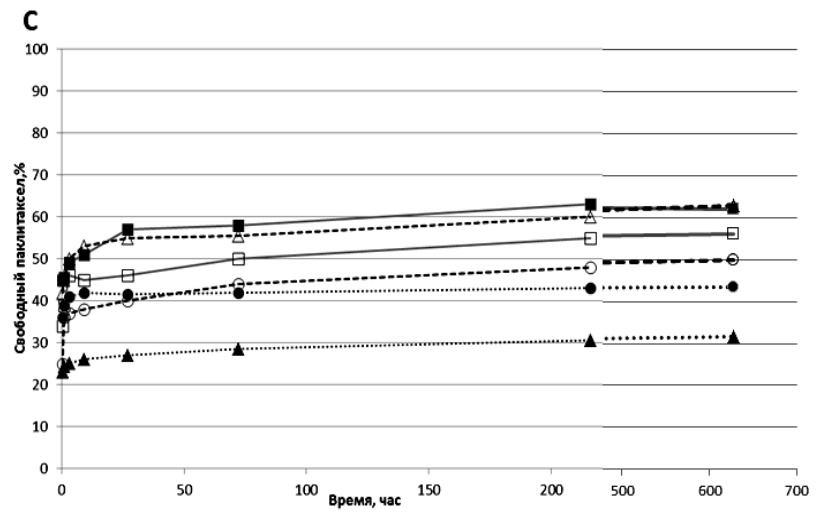
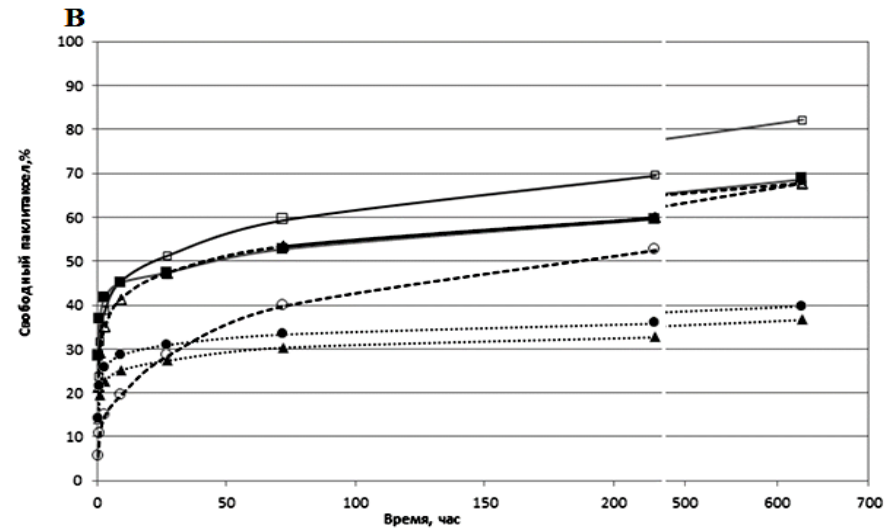
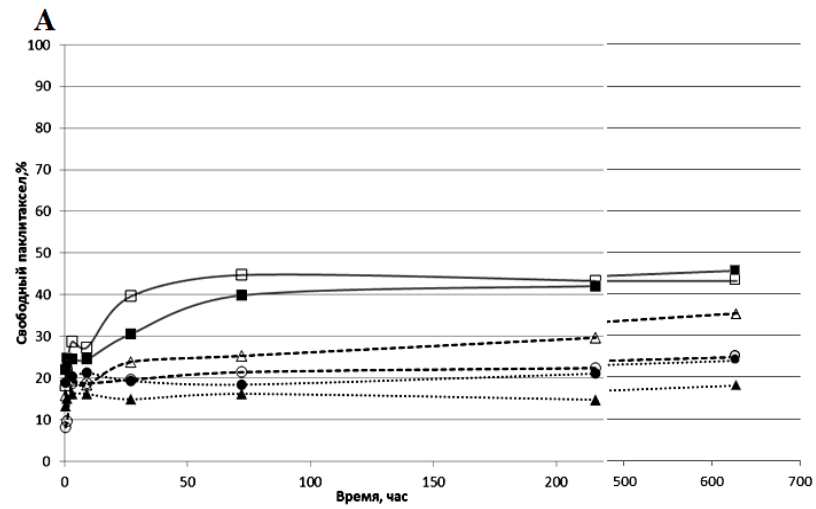
Примечание: \* – по данным исследований Chernonosova V.V. et al., 2017

Кинетические кривые, описывающие высвобождение ПТХ из матриц в зависимости от времени, типа матрикса и условий инкубации приведены на рисунке 3.

Для того, чтобы получить 3Д-матрицы, длительно высвобождающие ПТХ, необходимо изменить распределение ПТХ в волокнах или структуру волокон. Для того чтобы «удержать» ПТХ в составе волокна в процессе высыхания растворителя и получить пористые волокна, добавили в состав раствора для электроспиннинга ДМСО – нетоксичный растворитель, в котором хорошо растворим ПТХ и который имеет высокую температуру кипения (189 °С).

Добавление в раствор для электроспиннинга ДМСО уменьшает общее количество высвобожденного ПТХ (до 25–35 %) в условии 1 (рисунок 3А). Несколько замедляется высвобождение ПТХ из матрикса с 6 % ДМСО и практически не уменьшается суммарное количество высвобожденного ПТХ в условии 2 (рисунок 3В).

Что касается высвобождения ПТХ в плазму, то добавление 6 % ДМСО несколько замедляет высвобождение ПТХ в условиях замены плазмы (условие 2) (рисунок 3D), но практически не влияет на высвобождение ПТХ из матриц в условии 1 (рисунок 3С).



пкл/птх   
 пкл/чса/птх   
 пкл/птх/дмсо 3%   
 пкл/птх/дмсо 6%   
 пкл/чса/птх/дмсо 3%   
 пкл/чса/птх/дмсо 6%

А – инкубация 3Д-матрикса без замены PBS (условие 1)

В – инкубация 3Д-матрикса с заменой PBS (условие 2)

С – инкубация 3Д-матрикса без смены человеческой плазмы (условие 1)

Д – инкубация 3Д-матрикса с заменой человеческой плазмы (условие 2)

Рисунок 3 – Зависимость высвобождения ПТХ от времени инкубации и состава внешней среды

Матриксy, изготовленные из растворов с ДМСО, имеют более тонкие волокна. Изготовленные из растворов с 6 % ДМСО, имеют более низкое влагопоглощение, экспонируют на поверхность изначально меньше ПТХ по данным РФЭС по сравнению с матриксами, изготовленными из растворов с 3 % ДМСО.

Матриксy, изготовленные из растворов с ДМСО и ЧСА отличаются медленным высвобождением ПТХ (рисунок 3 С, D). Действительно, из матриксов, изготовленных из раствора 5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО + ЧСА за 28 суток в плазму высвобождается ~30 % исходного ПТХ, а в условиях обмениваемой плазмы менее 60 %. Таким образом, выбор компонентов матрикса и условий его получения оказывает существенное влияние на скорость выхода ПТХ в раствор. Увеличение гидрофобности матрикса в присутствии ДМСО приводит к замедлению десорбции ПТХ с поверхности и ЧСА, в составе такого гидрофобного матрикса, оказывает более выраженный удерживающий эффект на процесс выхода ПТХ в раствор.

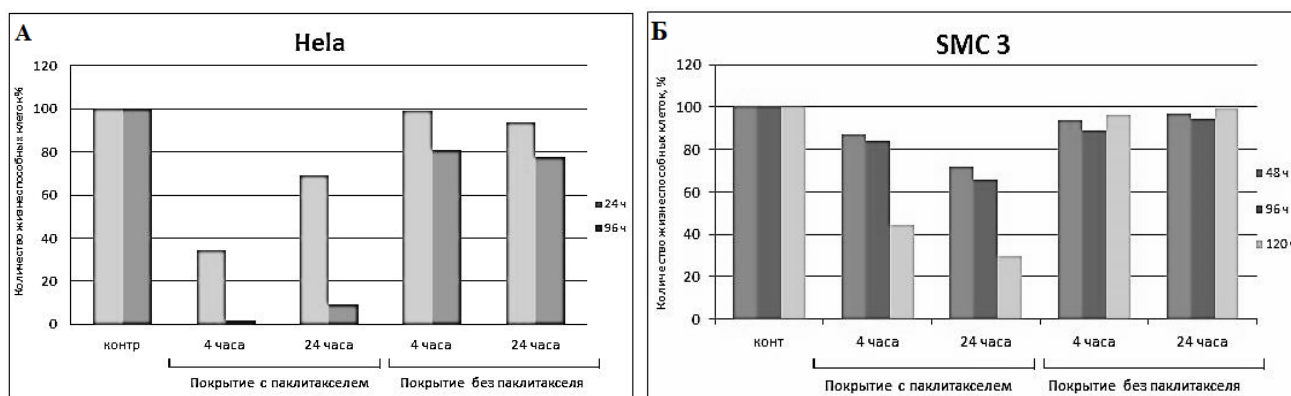
Полученные данные демонстрируют, что весь ПТХ может полностью диффундировать из матриксов изготовленных из растворов ПКЛ в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанолe (с или без ДМСО), при инкубации матриксов с человеческой плазмой (рисунок 3 D). Удлинение матриксов в 2 раза не влияет на высвобождение ПТХ, однако наблюдается пластическая деформация матриксов с увеличением линейных размеров после снятия нагрузки (125-185 %). Поэтому количество ПТХ, высвобожденного из таких матриксов, пропорционально ниже по сравнению с недеформированными матриксами, что необходимо учитывать при планировании дозы цитостатика в покрытии стента.

Токсичная концентрация ПТХ против гладкомышечных клеток (ГМК) ~10 нМ. При эндovasкулярной концентрации ПТХ 1 мкМ время удержания его в стенке должно составлять не менее 10 суток. Т.е. при условии, что матрикс содержит 0,46 мкг/мм<sup>2</sup> и в сутки из матрикса высвобождается 1 % ПТХ его концентрация в стенке будет равна или выше токсичной. Учитывая первоначальное накопление ПТХ в стенке, его низкую растворимость и связывание с компонентами внеклеточного матрикса, покрытие ГМС изготовленное методом электроспиннинга из раствора ПКЛ + ЧСА + ПТХ + ДМСО и содержащее 0,46 мкг/мм<sup>2</sup> ПТХ, может проявлять токсичное действие против ГМК не менее, чем в течение трех месяцев. Доза ПТХ, высвобождаемая в первые дни после установки, позволит эффективно замедлить пролиферацию



активированных клеток, а его высокая концентрация компенсировать диффузию ПТХ через деформированную стенку артерии.

Для исследования цитотоксического эффекта ПТХ, использовали клеточную линию цервикальной аденокарциномы человека Hela и первичные ГМК из стенки артерии. Паклитаксел, высвобождаемый исследуемым покрытием в культуральную среду в течение 4 и 24 часов, оказывает цитотоксический эффект на обе клеточные линии. Причем контрольное покрытие, не содержащее в своем составе ПТХ, практически не влияет на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток (рисунок 4). Количество жизнеспособных клеток аденокарциномы уже через 24 часа инкубации со средой, содержащей ПТХ, в среднем снижается до 50 %, тогда как процент жизнеспособных ГМК через 48 часов уменьшается до 70–80 %, постепенно снижаясь до 30–40 % к 120 часам инкубации. По данным кинетики выхода во временном промежутке от 4 до 24 часов 10–20 % упакованного в матрикс ПТХ высвобождается в среду.



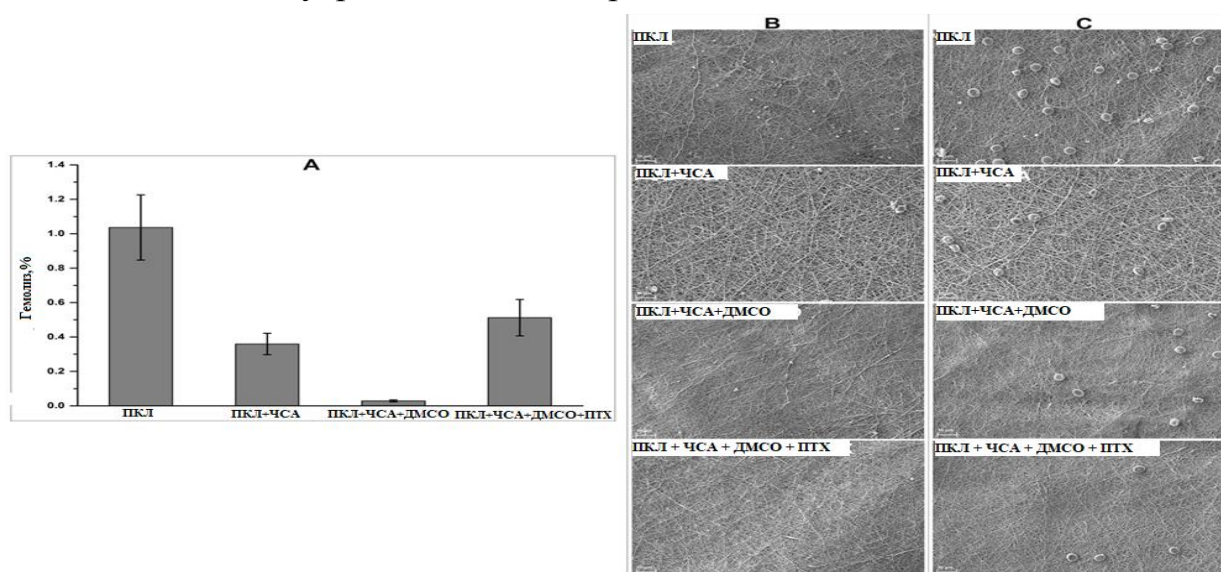
А – клетки линии Hela

Б – первичные гладкомышечные клетки

Рисунок 4 – Цитотоксическое действие паклитакселя на трансформированные и первичные гладкомышечные клетки человека

Изготовленные методом электроспиннинга 3Д-матрикс из ПКЛ с ЧСА, обладают гемо- и биосовместимостью. Инкубация матриксов с плазмой, богатой тромбоцитами или цитратной кровью, показала, что адгезия клеток зависит от химического состава волокон. Минимальное количество прикрепившихся клеток наблюдалось на 3Д-матриксе из ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО по сравнению с контрольными матриксами (рисунок 5 В и С). Матрикс из ПКЛ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО практически не вызывает гемолиза (рисунок 5А), с его поверхностью не связываются

тромбоциты и остальные форменные элементы крови, поэтому он оптимален для изготовления внутреннего слоя покрытия стента.



А – скорость гемолиза, индуцированного различными матриксами;

В – СЭМ-изображения поверхности матриксов после инкубации с плазмой, богатой тромбоцитами

С – СЭМ-изображения поверхности матриксов после инкубации с цитратной кровью

Рисунок 5 – Гемосовместимость покрытия стента и контрольных матриксов. Увеличение  $\times 2000$

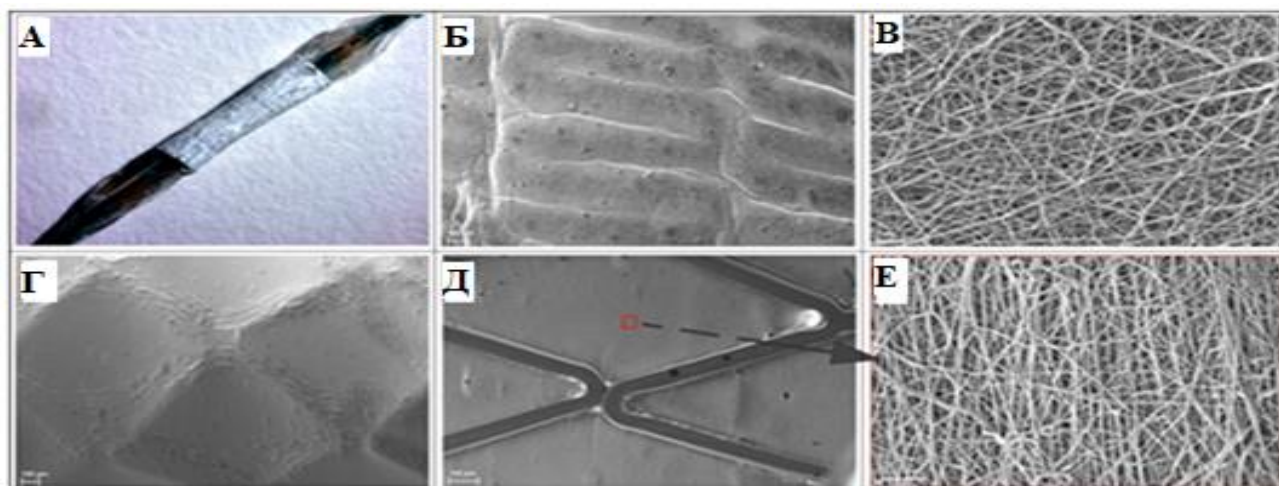
### Изготовление и оценка эффективности покрытого голометаллического стента

Макроскопическая оценка качества изготовленных стентов с ЛНП, показала плотное и устойчивое прилегание покрытия к «балкам» стента.

Стент с покрытием плотно фиксировался на баллон-катетере после снятия с электрода (рисунок 6А), при этом небольшое увеличение его диаметра (для установки на баллон) и последующее уплотнение приводило к незначительным деформациям покрытия, что выражалось в образовании небольших складок на поверхности стента (рисунок 6Б). Специальная обработка краев покрытия и введение в структуру стента белка способствовали «сшиванию» волокон друг с другом, предотвращению разломачивания краев и разволоknения структуры матрикса. При контакте изготовленного стента с кровью, не отмечалось «набухание» и увеличение диаметра покрытия.

Для оценки возможности проведения стента через стандартные системы доставки проведен ряд исследований. После фиксации покрытия на металлической конструкции нами была исследована возможность его проведения через проводниковые катетеры диаметром 5 Fr. При

«искусственном» создании пологих внешних и внутренних углов от 90 до 120 градусов эффекта «заклинивания» стента при продвижении на монорельсовой системе доставки не наблюдалось. После предварительного «замачивания» изготовленного стента в крови экспериментального животного также не обнаружено «заклинивания», сползания устройства с баллона при продвижении в просвете проводникового катетера. Плотная фиксация стента на монорельсовом баллоне обеспечивала возможность точного позиционирования в целевом участке подвздошной артерии. При расправлении покрытия на стенте наблюдалась небольшая деформация, которая не влияла на ориентацию волокон матрикса (рисунок 6 В, Г). Расширение стента привело к деформации покрытия, сопровождающейся выравниванием волокон и небольшим вдавливанием покрытия внутрь между стойками стента (рисунок 6 Д). Складки материала на поверхности балок, были связаны с небольшой «обратной» деформацией стента после его расширения (рисунок 6 Е).



А – стент, установленный на баллон-катетер

Б – внешняя поверхности покрытия после установки стента на баллон-катетер, увеличение  $\times 149$

В – внешняя поверхности покрытия после установки стента на баллон-катетер, увеличение  $\times 5000$

Г – внешняя поверхности покрытия после расширения баллона, увеличение  $\times 149$

Д – внутренняя поверхности покрытия после расширения баллона, увеличение  $\times 149$

Е – внутренняя поверхности покрытия после расширения баллона, увеличение  $\times 5000$

Рисунок 6 – Стент с покрытием, изготовлен методом электроспиннинга.

Микроскоп SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия)

Имплантация экспериментальных стентов была выполнена 36 кроликам (все самцы). Все кролики разделены на две одинаковые, сопоставимые группы. Первой группе животных была выполнена имплантация голометаллического стента из стали 316 L; второй группе – такие же стенты с нанесенным на них

лекарственно-наполненным покрытием. Ни на одном из сроков наблюдения летальности не было.

В качестве сосудистого доступа была выбрана правая общая сонная артерия в виду анатомических особенностей данной группы животных, т.к. от брахиоцефального ствола отходят обе общие сонные артерии и левая имеет бóльший угол изгиба.

Проведение стента через интродьюсер не сопровождалось подворачиванием краев покрытия или дислокацией стента на баллоне. Не наблюдалось изменения позиции стента на баллоне и в процессе установки его в стентированный участок сосудистого русла. Все устройства были имплантированы в общую подвздошную артерию, при имплантации никаких трудностей не возникло. Во всех случаях ангиографически стент плотно прилегал к сосудистой стенке, среднее давление инфузии составило 9,5 МПа. Миграций, поломок стента также не было.

При проведении катетер-баллона со стентом в терминальный отдел аорты, система доставки проходила через сосуды доступа, при этом образуя значительные углы (выход общей сонной артерии в дугу аорты, а также от дуги аорты до терминального отдела аорты). Покрытые стенты при имплантации животным не диспозиционируются на баллоне, края покрытия не разволокняются, само покрытие не отслаивается от стента. После имплантации стентов, при оценке состояния зоны кровоснабжения, в эксперименте не было выявлено гангрены конечностей и признаков их трофических нарушений. Ни у одного из кроликов не наблюдалось перемежающейся хромоты, а кожные покровы задних конечностей и хвоста были обычной окраски. Проходимость трансплантатов за весь период наблюдения составила для стентов из первой и второй групп наблюдения 100 %. В послеоперационном периоде не наблюдалось диастаза, нагноений или других осложнений послеоперационной раны.

Линейную скорость кровотока (ЛСК) у исследуемых животных, в каждом сроке наблюдения измеряли в пяти контрольных точках, и поскольку она отличалась не более, чем на 3–5 % усредняли полученное значение (таблица 5).

Таблица 5 – Линейная скорость кровотока (м/сек) в зоне имплантированных стентов на разных сроках наблюдения,  $M \pm \sigma$

Сроки наблюдения	Количество животных в группе	ГМС	Стент с ЛНП	p
Без имплантации	18	$0,3 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,03$	1,00
1 мес.	6	$0,4 \pm 0,03$ (m=0,011)	$0,3 \pm 0,01$ (m=0,005)	0,012
3 мес.	6	$0,5 \pm 0,02$ (m=0,011)	$0,39 \pm 0,02$ (m=0,011)	0,012
6 мес.	6	$0,69 \pm 0,01$ (m=0,011)	$0,42 \pm 0,01$ (m=0,005)	0,012
$P_{0,1,3,6 \text{ мес.}}$ ранговый Кендала		0,01882	0,027	
$P_{0,6 \text{ мес.}}$ Вилкоксона		0,043	0,043	

Примечание: в скобках – ошибка среднего арифметического

Линейная скорость кровотока в сосудах с ГМС выросла спустя месяц от времени имплантации на 25 %, спустя еще 2 месяца – на 20 %, после следующих 3 месяцев еще на 27 %. Интегрально скорость кровотока выросла более чем в 2 раза, причем с явной тенденцией к линейному росту.

В сосудах со стентами ЛНП спустя 1 месяц от времени имплантации не было обнаружено роста ЛСК, за последующие 2 месяца она выросла приблизительно на 23 %, а спустя еще 3 месяца она выросла всего на 7 %. Поскольку скорость кровотока отражает общее эффективное сечение просвета сосуда, данные о ЛСК демонстрируют быстрое уменьшение эффективного сечения просвета после установки ГМС и существенно более медленное (с тенденцией к стабилизации) уменьшение скорости в группе животных с установленным стентом с ЛНП.

После эвтаназии и выделения стентированного участка артерии, подвздошная артерия в месте имплантированного устройства имела бóльший диаметр, чем контрольная. Паравазально ткани были рыхлыми, без рубцового процесса. Рядом лежащая подвздошная вена была без перипроцесса и внутрипросветных тромботических масс. Не было обнаружено признаков инфицирования, воспаления и гематом, как в зоне самого стента, так и окружающих его тканей, что говорит об отсутствии реакции отторжения и перипроцесса. Объективно на этапе забора материала определяется нативная адвентиция сосуда.

При макроскопическом исследовании не было выявлено видимых деформаций стенки и изменения цвета сосудов со стентами с ЛНП. В отличие от ГМС у стентов с ЛНП не было выявлено четких границ стентированного участка с нативным сосудом. Обзорная микроскопия стентов представлена на рисунке 7. Покрытие стента располагалось на стенте в том же месте, что и на предоперационном этапе, разрывов, гофрирования покрытия не наблюдалось.

В сосудах с ГМС наблюдается видимая тенденция к увеличению толщины стенки сосуда в области контакта с балками стента, более заметная после 6 месяцев функционирования стента. В сосудах со стентами с ЛНП такой тенденции не обнаружено, что связано с более равномерным распределением нагрузки на стенку сосуда (нагружаются не только области контакта балок со стенкой, но и межбалочное пространство благодаря механическим свойствам ЛНП).

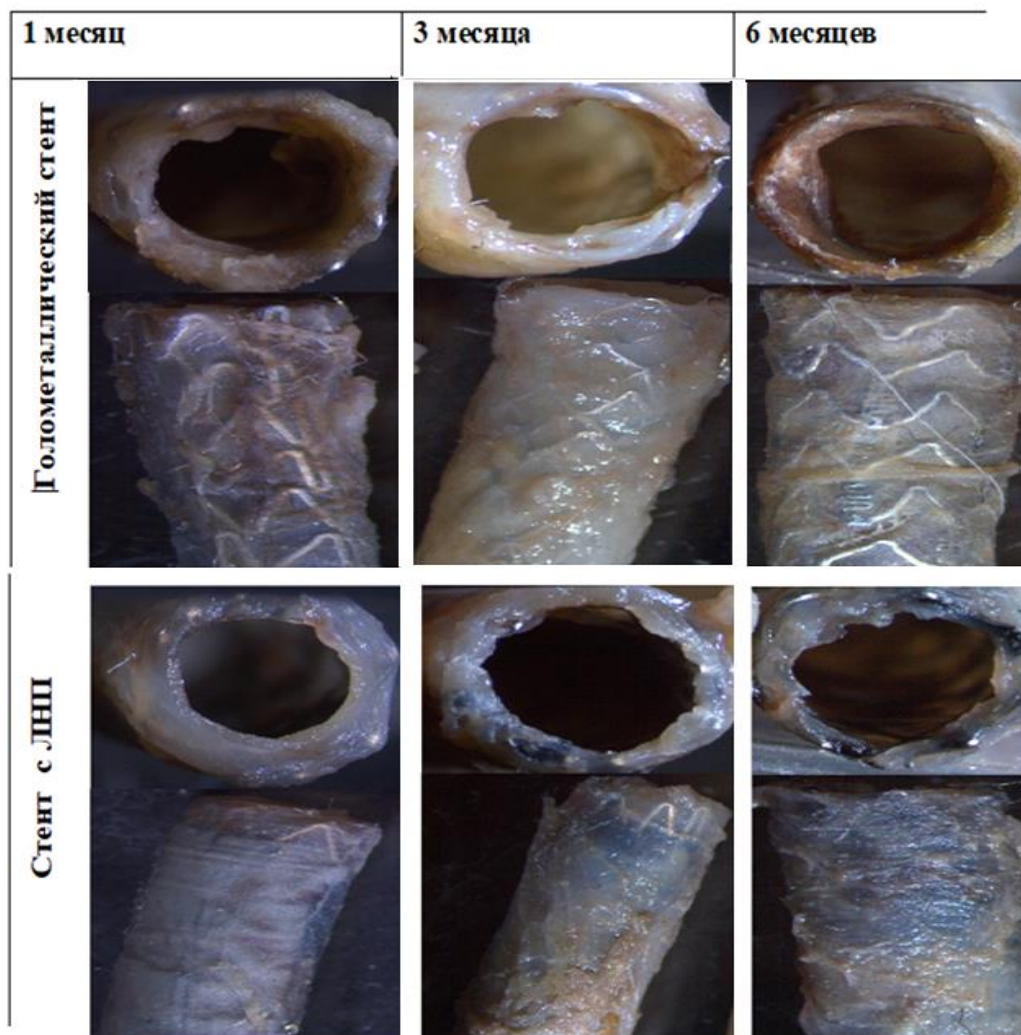
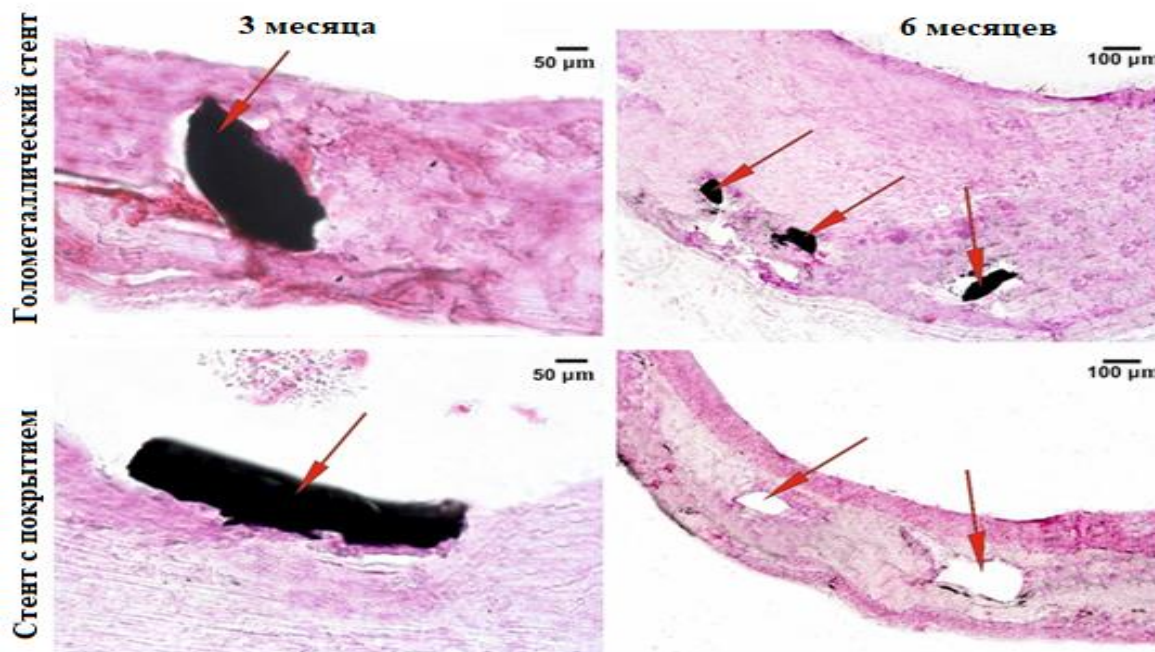


Рисунок 7 – Обзорная микроскопия сосудов с имплантированными стентами на разных сроках наблюдения. Микроскоп SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Germany)

Рост фиброзной ткани с разной степенью созревания (неоинтима) наблюдался в сосудах с ГМС уже через три месяца после имплантации и был еще более выражен через шесть месяцев. В сосудах со стентами с ЛНП через три месяца после имплантации наблюдалось слабое проникновение балок стента в интиму, а через шесть месяцев после операции наблюдалось образование плотного тканевого слоя, контактирующего с кровотоком (рисунок 8).



стрелки указывают на балки стента  
в 3 мес. – увеличение  $\times 100$   
в 6 мес. – увеличения  $\times 400$

Рисунок 8 – Микроскопия поперечных срезов стентов в разных точках наблюдения. Окрашивание гематоксилином и эозином. AxioLab A1 Zen 2 Blue Edition (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия)

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны протоколы и методом электроспиннинга изготовлены 3Д-матрикссы на основе поликапролактона с добавлением ЧСА, ПТХ, ДМСО. При оценке механических и физико-химических свойства матриксов показано, что при двукратном удлинении они соответствуют области пластической деформации, не меняется структура матриксов, а увлажнение не влияет на линейные размеры, однако уменьшает исходную прочность матриксов. Остаточная нагрузка матриксов после двукратного удлинения составляет не более 5 % от нагрузки, которую оказывает сосудистая стенка на балки стента при его установке (и такой же деформации). Таким образом, матрикссы могут

быть использованы для изготовления покрытий металлических стентов.

2. Исследовано высвобождение паклитаксела из матриц разного состава (6 вариантов). Показано, что оптимальное лекарственно-наполненное покрытие должно состоять из базового полимера, содержащего 10 % ЧСА и 3 % ДМСО. Высвобождение ПТХ из такого матрикса имеет двухфазный характер; в течение первых суток высвобождается 40 % введенного в состав волокна паклитаксела, а в течение последующих 26 суток еще ~20 %. Высвобождение препарата не связано с деградацией базового полимера и, с учетом известных взаимодействий ПТХ с белками сосудистой стенки, должно обеспечивать поддержание субцитотоксической концентрации ПТХ на протяжении 3 месяцев. Оставшиеся 40 % цитостатика высвобождается по мере деградации полимера.

3. Оценена цитотоксичность паклитаксела против миоцитов сосудистой стенки. На основании этих и литературных данных предложено вводить паклитаксел в покрытие стентов в дозе 0,46 мкг/мм<sup>2</sup>. В экспериментах *in vitro* показано, что матриксы состава из ПКЛ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО цитотоксичны в отношении ГМК и гемосовместимы, не вызывают гемолиза и с ними практически не связываются тромбоциты и другие клетки крови.

4. Отработана технология нанесения лекарственно-наполненного покрытия на голометаллический стент и далее его фиксация на катетере-баллоне с последующей стерилизацией. Показано, что данная технология позволяет создать устройство, которое свободно продвигается по стандартной системе доставки диаметром 5 Fr без задержек на внешних и внутренних изгибах от 0 до 180 градусов. В процессе продвижения стенты не диспозиционируются на баллоне, края покрытия не разволокняются, а само покрытие не отслаивается от балок стента.

5. В эксперименте на животных проведена сравнительная оценка возможности и безопасности имплантации «стандартного» металлического баллонорасширяемого коронарного стента и аналогичного стента с лекарственно-наполненным покрытием. Успех процедуры доставки устройств и их развертывания в зоне имплантации был 100 % без каких-либо специфических осложнений. Анализ скорости кровотока в области исследуемых устройств показал её возрастание в течении 6 месяцев с  $0,3 \pm 0,04$  до  $0,69 \pm 0,01$  в группе ГМС и с  $0,3 \pm 0,03$  до  $0,42 \pm 0,01$  в группе стентов с ЛНП. При межгрупповом анализе на всех контрольных точках скорость



кровотока была достоверно ниже в группе стентов с ЛНП.

Гистологическое исследование зоны имплантации стентов показало существенный рост фиброзной ткани и интенсивное формирование неоинтимы в сосудах с ГМС, в то время как в сосудах с ЛНП наблюдалась более тонкая и плотная ткань, покрытая слоем эндотелиоцитоподобных клеток.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Матрикс на основе поликапролактона с 10 % ЧСА, 3 % ДМСО, и 0,46 мкг/мм<sup>2</sup> паклитаксела обладает наиболее приемлемой кинетикой высвобождения лекарственного препарата, механическими свойствами, гемосовместимостью и может быть рекомендован для изготовления покрытий для металлических стентов сосудов.

2. Изготовленные покрытые стенты требуется прочно осадить на баллон-катетере, после чего они не меняют положения на устройстве доставки в процессе установки через интродьюсер и приводящее сосудистое русло и могут быть легко доставлены в требуемый участок артерии.

3. Покрытие должно полностью закрывать балки стента с учетом его деформации в процессе установки в сосуд.

4. Необходимость предварительной обработки покрытых стентов отсутствует, однако рекомендуется смочить их физиологическим раствором перед установкой с сосудистое русло. Контакт покрытых стентов с органическими растворителями, например, спиртом, йодсодержащим контрастным препаратом нежелателен, особенно до смачивания, покрытого стента физиологическим раствором в силу пористой структуры покрытия и возможного удержания растворителя.

5. Процедура имплантации заявленных в настоящей работе стентов не должна сопровождаться грубыми манипуляциями на стенте или нативном сосуде, особенно в зонах перегибов сосудов, сосудах малого диаметра.

6. Необходимо тщательно следить за соблюдением номинальных значений шприца манометра в момент установки/раздувания стента с тем, чтобы не допускать чрезмерного перерастяжения сосудистой стенки, сопровождающейся микроразрывами внутренней базальной мембраны и индукцией воспаления. При этом покрытые стенты компенсируют/выравнивают нагрузку, оказываемую балками стента на стенку сосуда, минимизируют неравномерность нагрузки по диаметру, предотвращают

разрастание клеток стенки и, на основании полученных данных, могут быть рекомендованы к дальнейшим исследованиям на крупных животных.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. К. А. Кузнецов Стенты сосудов: подходы, используемые для повышения их клинической эффективности / К. А. Кузнецов, М. В. Харькова, А. А. Карпенко, П. П. Лактионов // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2018. – Т. 24, № 2. – С. 69-79

2. К. А. Kuznetsov Diclofenac release from polycaprolactone 3D matrices produced by electrospinning: influence of fiber structure and composition of the surrounding medium / К. А. Kuznetsov, A. O. Stepanova, V. S. Chernonosova, M. V. Kharkova, A. A. Karpenko, P. P. Laktionov, N. A. Kuznetsov, I. V. Romanova // *International Journal of Polymeric Materials*. – 2019. – Vol. 68 (1-3). – P. 27-33.

3. К. А. Kuznetsov Electrospun Produced 3D Matrices for Covering of Vascular Stents: Paclitaxel Release Depending on Fiber Structure and Composition of the External Environment / К. А. Kuznetsov, A. O. Stepanova, R. I. Kvon, T. E. L. Douglas, N. A. Kuznetsov, V. S. Chernonosova, I. A. Zaporozhchenko, M. V. Kharkova, I. V. Romanova, A. A. Karpenko, P. P. Laktionov // *Materials*. – 2018. – Vol. 11(11). – P. 2176. doi: 10.3390/ma11112176.

4. К. А. Kuznetsov Vascular Stents Coated with Electrospun Drug-Eluting Material: Functioning in Rabbit Iliac Artery / К. А. Kuznetsov, V. S. Chernonosova, B. P. Chelobanov, A. O. Stepanova, P. P. Laktionov, I. S. Murashov, D. S. Sergeevichev, A. A. Karpenko // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12 (8). – P.1741.

### Патент

5. Способ получения микроволокнистого материала, высвобождающего лекарственные средства: пат. 2669344 С1 Рос. Федерация: МПК<sup>51</sup> А 61 L 27/14 / А. О. Степанова, К. А. Кузнецов, О. А. Новикова, Е. А. Покушалов, А. А. Карпенко, П. П. Лактионов; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. – № 2017138348; заявл. 02.11.2017; опубл. 10.10.2018, Бюл. № 28.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГМК – гладкомышечные клетки
- ГМС – голометаллический стент
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЛНП – лекарственно-наполненное покрытие
- ЛСК – линейная скорость кровотока
- ПКЛ – поликапролактон
- ПТХ – паклитаксел
- РФЭС – Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
- PBS – фосфатный буферный раствор