

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени академика Е.Н. Мешалкина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Кузнецов Константин Анатольевич

Разработка технологии изготовления проницаемого
мембранного покрытия баллонорасширяемых сосудистых стентов

3.1.15. Сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Карпенко Андрей Анатольевич;

кандидат биологических наук

Лактионов Павел Петрович

Новосибирск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОБЛЕМЕ РЕСТЕНОЗА, ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПОКРЫТИЯ СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ, ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ПОКРЫТИЯ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ...	13
1.1 Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний.....	13
1.2 Рестеноз стентированного участка сосудистого русла	14
1.3 Характеристика основных лекарственных препаратов, используемых для покрытий сосудистых стентов и кинетика их высвобождения.....	19
1.3.1 Паклитаксел	21
1.3.2 Лимусы	22
1.4 Покрытия сосудистых стентов и их недостатки.....	24
1.4.1 Виды стентов	24
1.4.2 Характеристика стентов с паклитакселом.....	26
1.4.3 Стенты с паклитакселом в составе полимерного носителя	27
1.4.4 Стенты с покрытиями, содержащими препараты на основе лимусов.....	28
1.4.5 Сравнительная характеристика цитостатиков (лимусы и паклитаксел)	29
1.5 Стенты с биodeградируемым полимерным покрытием.....	30
1.6 Стенты с неразлагаемым полимерным покрытием	31
1.7 Варианты нанесения покрытий на стенты.....	34
1.7.1 Полимерные покрытия, изготовленные электроспиннингом.....	35
1.8 Недостатки стентов с лекарственным покрытием.....	36
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 Общая структура экспериментов.....	39
2.2 Реактивы.....	41
2.3 Синтез радиоактивно-меченного паклитаксела.....	42
2.3.1 Приготовление 3Д-матриксом методом электроспиннинга.....	43

2.4 Характеристика матрицков.....	44
2.4.1 Определение механических характеристик матрицков.....	44
2.4.2 Исследование микроструктуры поверхности матрицков.....	44
2.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (исследование состава поверхности 3Д-матрицков).....	45
2.6 Определение дополнительных физико-химических характеристик матрицков	45
2.7 Исследование высвобождения паклитаксела из 3Д-матрицков	46
2.8 Клеточные культуры	47
2.9 Оценка цитотоксичности паклитаксела, высвобождаемого лекарственно-наполненным покрытием	48
2.10 Исследование гемосовместимости матрицков	48
2.11 Изготовление стентов с лекарственно-наполненным покрытием, установка их на устройство доставки и стерилизация	49
2.12 Экспериментальная часть <i>in vivo</i>	50
2.12.1 Лабораторные животные, содержание и послеоперационный уход	50
2.12.2 Процедура имплантации экспериментальных и контрольных стентов	51
2.12.3 Оценка проходимости сосудистого стента.....	53
2.12.4 Общий анализ и гистологическое исследование стентированных участков подвздошной артерии	54
2.13 Статистическая обработка данных	55
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
3.1 Условия электроспиннинга 3Д-матрицков, приготовленных из различных смесей поликапролактона человеческим сывороточным альбумином и растворителями	57
3.2 Механические свойства изготовленных 3Д-матрицков	58
3.3 Синтез радиоактивно-меченного паклитаксела	60
3.4 Исследование микроструктуры поверхности матрицков.....	60
3.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (исследование состава поверхности 3Д-матрицков).....	64

3.6 Определение дополнительных физико-химических характеристик матрицсов	68
3.7 Исследование высвобождения паклитаксела из матрицсов	70
3.8 Оценка цитотоксического действия паклитаксела, высвобождаемого из лекарственно-наполненного покрытия, на клетки человека с помощью метилтетразолиевого теста.....	79
3.9 Исследование гемосовместимости матрицсов	80
3.10 Особенности изготовления стента с «непрерывным» лекарственным покрытием и оценка возможностей его дистанционной доставки при помощи стандартных проводников и катетеров	82
3.11 Экспериментальная часть <i>in vivo</i>	84
3.11.1 Интраоперационные показатели.....	84
3.11.2 Технический успех процедуры стентирования.....	85
3.11.3 Проходимость стентов.....	87
3.11.4 Конечный этап исследования <i>in vivo</i> . Макро- и микроскопическая оценка эксплантированных стентов.....	91
3.11.5 Гистологическое исследование эксплантированных стентов.....	95
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	97
ВЫВОДЫ	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Основной проблемой долгосрочной эффективности внутрисосудистых операций при атеросклерозе остаются рестеноз и реокклюзия восстановленного сосудистого просвета [57]. Его развитию способствует вторичная воспалительная реакция в зоне имплантированного устройства, а также локальная активация агрегации тромбоцитов и тромбообразование [42].

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 [41].

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 [104].

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.

Именно на решение этой задачи и направлена представленная диссертационная работа.

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 стента с покрытием PK Papyrus 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 стентируемой 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, исключаящую 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 биодеградации покрытия.

3. Оптимальная концентрация паклитаксела в покрытии составила 0,46 мкг/мм², 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 разволокнутию 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

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 свидетельствуют о высокой достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. 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 матриксов 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. Автор 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.

**ГЛАВА 1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОБЛЕМЕ РЕСТЕНОЗА,
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПОКРЫТИЯ
СОСУДИСТЫХ СТЕНТОВ, ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ПОКРЫТИЯ
И ОСОБЕННОСТИ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ.
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

1.1 Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной смерти, составляя 17,3 миллионов смертей в год в мире, как ожидается к 2030 году эта цифра превысит 23,6 миллиона. Они являются основной причиной смерти в Соединенных Штатах Америки, при этом среди женщин уносят жизни больше, чем все формы рака [57]. Известно, что до 60 % смертности от ССЗ связано с факторами риска, к которым относятся: артериальная гипертония, нарушение углеводного и липидного обмена, ожирение, курение, чрезмерное употребление алкоголя, низкая физическая активность, иными словами – элементы нездорового образа жизни [52]. В России в 2009 году от ССЗ умерло 1136,7 тыс. человек, на их долю приходилось 56,5 % от всех смертей [1, 10]. По данным Покровского А.В. и соавт. (2003) [6], по причине прогрессирования атеросклероза около 10 % населения старше 50 лет страдает поражением периферических артерий и около 90 % от всех ампутаций нижних конечностей приходится на долю этого заболевания [3, 4, 117]. Для профилактики и коррекции течения ССЗ применяются многочисленные методы, которые можно разделить на консервативные и оперативные. Последние, в свою очередь, могут быть открытыми (реконструктивные операции – шунтирование, протезирование) или малоинвазивными (эндоваскулярные операции – баллонная ангиопластика и стентирование).

В настоящее время наблюдается тенденция к использованию малоинвазивных методик, поскольку они позволяют сократить длительность операции и послеоперационного восстановления пациентов, снизить количество послеоперационных осложнений, характерных для открытой хирургии.

В результате широкого внедрения малоинвазивных технологий реваскуляризации количество ампутаций нижних конечностей снизилось более чем на 25 % [82].

Несмотря на очевидные плюсы, при проведении эндоваскулярных процедур наблюдаются и специфические осложнения: пульсирующие и подкожные гематомы, аллергические реакции на контрастное вещество, перфорации и диссекции артерий [81, 104]. Отдельной проблемой является рестеноз стентированного участка сосудистого русла, который индуцируется тромбообразованием, разрастанием поврежденных участков сосудистой стенки и комбинацией этих факторов.

Развитие и усовершенствование эндоваскулярных методов лечения привело к появлению разнообразных стентов (с лекарственным покрытием и без него, биодеградируемых стентов и т.д.), но проблема рестеноза стентированного артериального сегмента остается актуальной в настоящее время.

1.2 Рестеноз стентированного участка сосудистого русла

Рестеноз стентированного сегмента артериальной стенки – ключевая проблема эндоваскулярной хирургии. Ангиографически он определяется, как сужение на 50 % и более диаметра сосуда в отдаленном периоде после имплантации стента. С клинической точки зрения, рестеноз ассоциируется с рецидивом симптомов заболевания, а именно, с развитием ишемии конечности или органов кровоснабжаемых из бассейна стентированного сосуда, что может вызвать необходимость повторного вмешательства. Предикторами развития

рестеноза являются сахарный диабет, курение, малый диаметр сосудов, длинные стенты и их недостаточное расширение в процессе имплантации [79].

Частота рестеноза после баллонной ангиопластики в течение $5,9 \pm 1,3$ месяца составляет 32 %, а при стентировании голометаллическим стентом 18 % [33]. Таким образом, применение голометаллических сосудистых стентов позволило снизить частоту рестеноза почти в два раза по сравнению с баллонной ангиопластикой.

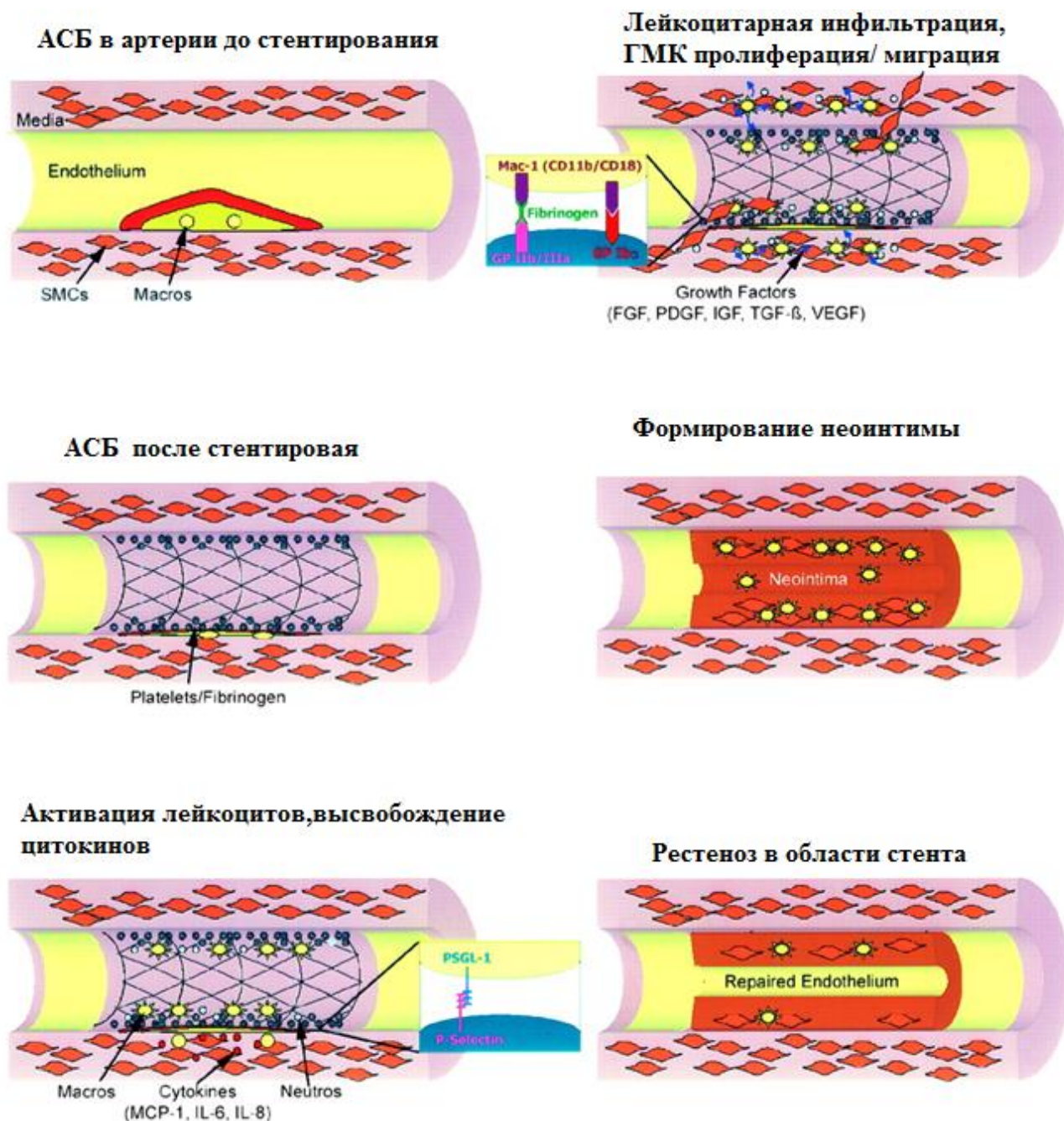
Рестеноз – прогрессирующий процесс, механизмы которого запускаются в первые часы после чрескожной транслюминальной ангиопластики (ЧТА) либо открытой операции, а именно – в процессе ремоделирования просвета сосуда, т.е. механического воздействия с нарушением сложившейся структуры сосудистой стенки.

В основе его развития лежат три основных патогенных механизма: повреждение эластических волокон, сосудистое ремоделирование, неоинтимальная гиперплазия. Первый и второй механизмы типичны для баллонной ангиопластики. С другой стороны, наличие металлических балок стента способствует запуску нового механизма, называемого неоинтимальной гиперплазией. Процедура стентирования вызывает травму сосудистой стенки и тем самым влияет на атеросклеротический процесс, изменяет течение естественной эволюции атеросклеротической бляшки до более агрессивного местного ответа на лечение.

Атеросклероз характеризуется последовательностью процессов, вызывающих вазоконстрикцию и начальную эндотелиальную дисфункцию, приводящую к постепенному стенозу сосуда [41, 50, 90, 106]. Рестеноз – это защитный механизм сосудистой стенки в ответ на инородное тело (стент), вызывающий травму эластических волокон и ремоделирование сосуда, которое усиливается асептическим воспалительным процессом, о чем свидетельствует увеличение С-реактивного белка у пациентов с повышенным риском рестеноза.

В результате возникает очаг воспаления, активируется агрегация форменных элементов крови. Эти процессы стимулируют ремоделирование поврежденного участка ткани, пролиферацию гладкомышечных клеток и образование неоинтимы [7, 99, 115]. Вне зависимости от скорости кровотока,

контакт тромбоцитов с чужеродной поверхностью и возникающие сдвиговые напряжения в областях контакта балок стента с сосудистой стенкой приводят к формированию на поверхности стента тромбоцитарного слоя, что неизбежно стимулирует тромбообразование, которое также вносит свой вклад в формирование неинтимы. Активация тромбоцитов и их последующая агрегация происходят под действием различных медиаторов, наиболее важными из которых являются тромбоксан А2 и аденозиндифосфат (рисунок 1).



АСБ – атеросклеротическая бляшка

ГМК – гладкомышечные клетки

Рисунок 1 – Схема патогенеза, рестеноза в зоне имплантируемого стента [34]

Механизмы возникновения гиперплазии неоинтимы, вызванные особенностями конструкции стентов, могут быть биологическими, механическими и техническими.

К биологическим факторам рестеноза относится устойчивость клеток неоинтимы к цитостатическим препаратам. Недавние данные показывают, что генетические мутации могут влиять на чувствительность к препаратам (паклитаксел и сиролimus), придавая устойчивость гладкомышечных клеток к их действию [34, 93].

Для стентов первого поколения основным материалом платформы была нержавеющая сталь 316L. При этом аллергические реакции на никель и молибден, входящие в состав стали марки 316L, были потенциальными механизмами запуска рестеноза [109]. Материал, используемый во многих новых стентах, представляет собой хром и кобальт, который имеет более низкое содержание никеля, чем нержавеющая сталь 316L, и, по-видимому, не вызывает неблагоприятного пролиферативного ответа и гиперчувствительности, которая сопровождает включение других металлов.

Для предотвращения и ингибирования рестеноза, было предложено покрывать стенты лекарственными препаратами, обладающими цитостатическим, цитотоксическим и/или противовоспалительным действием. Покрытые стенты с одной стороны ремоделируют пораженный участок сосудистого русла, с другой – обеспечивают локальную доставку лекарственных препаратов. Для подавления пролиферации неоинтимы используют препараты, обладающие цитостатическим/цитотоксическим действием, относящиеся к группе лимусов и паклитаксел. Эти препараты наносят на поверхность стентов в различных концентрациях при помощи различных подходов. Клинические испытания таких стентов подтвердили их эффективность [41]. В настоящее время эти лекарственные вещества применяются для изготовления лекарственно-покрытых внутрисосудистых стентов представленных на медицинском рынке, частота рестеноза которых колеблется от 6,7 % до 12 % в период наблюдения 12–15

месяцев [50, 90, 106]. Поскольку покрытые стенты состоят из 3 компонентов (балок стента, цитостатика и полимера, несущего лекарство), реакции гиперчувствительности могут быть вызваны любым из этих компонентов. В исследовании «RADAR» по побочным явлениям лекарственных средств и событий, проанализировано 5783 сообщений после имплантации покрытых стентов. Было обнаружено 261 событие реакции гиперчувствительности, из них выделены 17 случаев аллергических реакций, единственной причиной которых были импрегнированные покрытия стентов [84].

К механическим факторам, способствующим развитию рестеноза, можно отнести недостаточное расширение стента во время имплантации [61]. Во многих случаях оно не может быть определено ангиографически. Однако использование внутрисосудистого ультразвукового исследования может дополнить ангиографическую картину. Согласно выводам De Jaegere P. [66], минимальная площадь просвета в стенте должна быть $\geq 90\%$ площади средней части просвета стентированного сосуда.

К техническим факторам имплантации стента относится травма вне стентированного сегмента, которая может быть инициирована, если баллон существенно длиннее устанавливаемого стента. Анализ рандомизированного клинического исследования «SIRIUS» показал, что открытые края стентов, которые не покрывали всю область повреждения сосудистой стенки во время инсuffляции катетер-баллона, были первичными участками рестеноза [115]. Рестеноз происходил преимущественно на границе проксимального сегмента стента. Также, длина стента более 32 мм при чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластике (ЧТКА) имеет бóльший риск рестеноза, чем стенты меньшей длины.

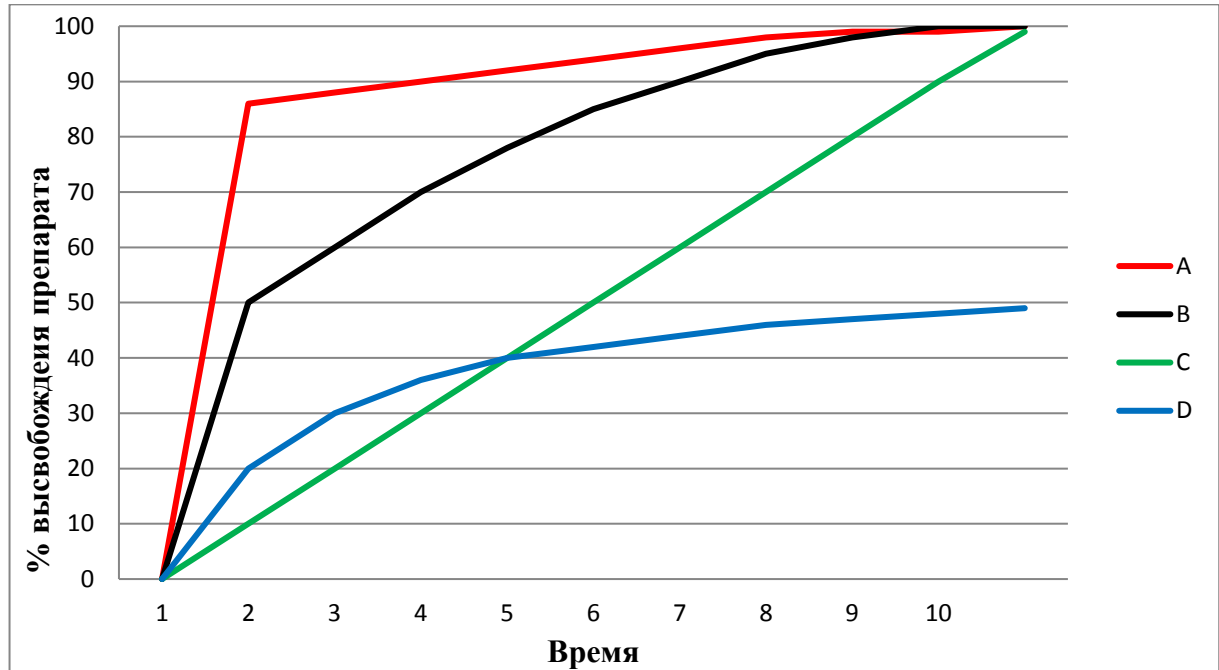
1.3 Характеристика основных лекарственных препаратов, используемых для покрытий сосудистых стентов и кинетика их высвобождения

Основной целью разработки покрытий для стентов является изготовление таких вариантов нанесения лекарственных препаратов, которые бы позволяли поддерживать эффективную концентрацию лекарственного средства в сосудистой стенке максимально длительное время. При этом необходимо, чтобы цитотоксический эффект не был чрезмерным и не вызывал некроза ткани, уменьшения прочности сосудистой стенки с последующим возникновением аневризм [115] или формированием очага неинфекционного воспаления [41]. Сама по себе установка стента в просвет сосуда индуцирует механическое растяжение, с разрывом внутренней эластической мембраны и процесс воспаления с последующей регенерацией повреждения. В процессе регенерации принимают участие эндотелиальные и гладкомышечные клетки, тромбоциты и моноциты крови, которые секретируют факторы роста клеток, хемотаксиса, цитокины [31, 121]. Рестеноз является результатом гиперплазии неоинтимы, степень которого определяется тяжестью травмы стенки сосуда и, в первую очередь, развивается за счет пролиферации и миграции гладкомышечных клеток в течение первого месяца после процедуры стентирования [71, 94].

Эффективность действия лекарственных препаратов, нанесенных на стенты определяется их взаимодействием с внутриклеточными молекулами, процессом высвобождения из покрытия стента, структурой стенки сосуда (плотностью ткани, которая определяет скорость диффузии), локальной концентрацией биополимеров, связывающих эти лекарственные средства, связыванием с липидами (в случае гидрофобных лекарств), взаимодействием с окружающими клетками и транспортом в клетки [31]. Эти факторы, в конечном счете, определяют время жизни лекарственного средства в сосудистой стенке, скорость его диффузии из требуемой зоны и оптимальную лечебную концентрацию препарата. В любом случае, препарат должен доставляться векторно, преимущественно в сторону сосудистой стенки, удерживаться в ней максимально

долго и обладать такой кинетикой высвобождения, которая бы позволяла поддерживать требуемую локальную терапевтическую концентрацию лекарственного средства достаточно длительное время [111].

Высвобождение лекарственного препарата из покрытий стентов может быть описано несколькими вариантами кинетических кривых (рисунок 2).



- A – двухфазное с быстрой первой фазой,
- B – двухфазное с ускоренной второй фазой,
- C – равномерное,
- D – медленное с поддержанием цитотоксической дозы препарата

Рисунок 2 – Зависимость количества высвобождаемого препарата от времени инкубации

Равномерное (C), двухфазное с ускоренной второй фазой (B) (связанное с нарастающей деградацией полимера, связывающего лекарственное средство или с изменением фазового состояния лекарственного средства, повышающего его растворимость), двухфазное с быстрым высвобождением основной части препарата (A) и двухфазное с быстрым высвобождением части препарата и длительным высвобождением оставшегося препарата (D). Очевидно, что первые 2 варианта являются наименее желательными. В этом случае для поддержания действующей концентрации цитостатика необходимы повышенные дозы препарата в составе покрытия. Высвобождение по варианту (A) не позволяет

надеяться на длительный эффект. Оптимальным вариантом для реализации действия лекарства является вариант (D), который подразумевает быстрое достижение действующей концентрации с последующим медленным выходом препарата, компенсирующим его диффузию из рабочей зоны.

Быстрое высвобождение характерно для покрытий, изготовленных путем напыления. Более медленная элиминация происходит из полимерных биodeградируемых или не биodeградируемых композиций. Действительно, использование вспомогательных полимеров может помочь реализовать «программируемое» локальное терапевтическое действие лекарственного средства на ремоделированную сосудистую стенку. Однако многие полимерные покрытия не обладают биологической инертностью и могут усиливать процессы локального воспаления и рестенозирования [73]. Несмотря на многочисленные варианты модификации поверхности при изготовлении покрытых стентов, проблема рестеноза остается актуальной.

1.3.1 Паклитаксел

Паклитаксел (ПТХ) является природным цитостатиком, который получают из коры тихоокеанского тиса. Он представляет собой высоколипофильное соединение, плохо растворимое в воде, ингибирует пролиферацию и миграцию клеток. На молекулярном уровне паклитаксел активирует сборку микротрубочек из тубулиновых димеров и стабилизирует их, индуцируя аномальное расположение в виде пучков на протяжении всего клеточного цикла, предохраняя их от деполимеризации. Вследствие этого ингибирует динамическую реорганизацию микротубулярной сети в интерфазе и в период митоза, вызывая индукцию апоптоза в клетках [115]. При попадании в сосудистое русло 88–98 % паклитаксела связывается сывороточными белками, в основном альбумином, к которому он имеет высокое сродство. Транспортируется ПТХ в печень, где метаболизирует при участии изоферментов CYP2C8 и CYP3A4 и цитохрома P450.

Выводится из организма преимущественно с желчью. Таклитаксел обладает очень низкой растворимостью в воде $<0,03$ мг/мл [70, 107]. Благодаря липофильности происходит его фиксация и накопление в атероматозно измененной сосудистой стенке.

Таклитаксел изначально был одобрен для лечения рака яичников, его начальной токсической концентрацией является доза 135 мг/м² достигаемой путем внутривенной инфузии. Позже было обнаружено, что он ингибирует и пролиферацию неоинтимы. Это послужило поводом для создания стентов с таклитакселем, таких как Taxus Express PES [18, 27]. В современных стентах доза таклитаксела в среднем составляет 3 мкг/мм² (что в пересчете составляет $0,3$ мг/м²) [31]. На стенты наносят как чистый таклитаксел, так и в смеси с дополнительными компонентами, которые «удерживают» его на балках стентов, что обеспечивает локальное пролонгированное высвобождение [94].

1.3.2 Лимусы

Лимусы – это природные макролиды, которые продуцируются актиномицетами разных штаммов (*Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces sukubaensis* и т.д.), обладают иммуносупрессорным действием и ингибируют пролиферацию клеток. По механизму действия могут быть разделены на две подгруппы:

1. Препараты, ингибирующие рецепторы mTOR (мишень сиролимуса (рапамицина)) в клетке, после образования комплекса с FKBP12 (белок человека для связывания с иммунодепрессантами). К ним относятся: сиролимус, эверолимус, золаторимус и биолимус А9.

2. Препараты, ингибирующие кальциневрин в комплексе с FKBP12 такие, как: такролимус и пимекролимус.

Сиролимус образует прочные комплексы с FKBP12, после чего он узнает домен FRB (FKBP12-Rapamycin Binding domain) mTOR комплекса 1 (mTORC1).

FKBP12 с mTORC1 нарушает нормальное функционирование mTORC1, который регулирует транскрипцию и трансляцию генов, связанных с клеточным ростом. В частности, сиролимус индуцирует экспрессию ингибитора циклинзависимой киназы (p27 kip 1) [111], что приводит к блокированию клеточного цикла в фазе G1-S [71]. Блокировка клеточной пролиферации под действием сиролимуса, является обратимой и, после понижения концентрации сиролимуса, пролиферативные функции клеток восстанавливаются. Поскольку клетки остаются жизнеспособными, механизм действия сиролимуса является цитостатическим, а не цитотоксическим. Важно отметить, что сиролимус обладает плохой растворимостью в воде (2,6 мкг/мл) и подвержен гидролизу, с ослаблением своих иммуносупрессорных свойств – время полураспада сиролимуса в фосфатном буфере при pH 7,4 и 37 °C составляет 13 часов [73].

Комплекс такролимуса и FKBP 12 связывается с кальциневрином (CaN) и ингибирует его серин-треонин фосфатазную активность, что приводит к нарушению фосфорилирования субъединицы уже существующего фактора активированных Т-клеток (NF-AT). Это препятствует активации фосфатазы кальциневрина, что предотвращает возможность проникновения NF-AT в ядро, вызывая ингибирование транскрипции генов. Такролимус также ингибирует транскрипцию цитокинов, в частности ИЛ-(2-5), интерферона- γ , фактора некроза опухоли [111].

Таким образом, механизмы действия препаратов похожи. Как сиролимус, так и такролимус образуют комплекс с доменом белка FKBP 12, далее сиролимус блокирует mTOR, а действие такролимуса дополнительно опосредовано кальциневрином, который запускает каскады реакций, описанных выше.

Сиролимус в настоящее время применяется для изготовления и исследования стентов как в комплексе с полимерами, так и без них [105].

1.4 Покрывтия сосудистых стентов и их недостатки

1.4.1 Виды стентов

В настоящее время для ремоделирования просвета сосудов в основном применяют металлические стенты из нержавеющей стали или нитинола. Внутрисосудистая адаптация стентов из нержавеющей стали осуществляется при помощи расширяемого баллона.

Нитиноловые стенты обладают «памятью формы» и самоустанавливаются после высвобождения из устройства доставки. Они используются, как правило, при поражениях периферических артерий. К числу их преимуществ можно отнести хорошую осевую гибкость, благодаря которой они повторяют естественные изгибы стентированного сосуда. Однако они обладают меньшей радиальной жесткостью, которая необходима при ремоделировании кальцинированных поражений.

Для улучшения проходимости стентированных артерий были предложены биодеградируемые внутрисосудистые стенты. В 2000 году они были впервые имплантированы пациентам [64]. Эти устройства применяются пока только при поражении коронарных артерий, однако по данным многоцентровых рандомизированных исследований, они не показали преимуществ перед лекарственно-покрытыми металлическими стентами [44]. Эти устройства должны решать те же задачи, что и обычные металлические конструкции. После реканализации сосуда и их имплантации обеспечивают «каркасное ремоделирование». По мнению разработчиков, в отдаленные сроки, после полного растворения и элиминации, не будет наблюдаться реакции на инородное тело, а место установки стента, в случае необходимости, может быть стентировано еще раз.

Одним из первых биодеградируемых стентов был стент, изготовленный из полимолочной кислоты молекулярной массы 183 КД, который имел зигзагообразную форму балок и не содержал лекарственных препаратов (Igaki-Tamaistent; Kyoto Medical Planning Co, Ltd, Kyoto, Japan). Полимолочная кислота является биодеградируемым, термопластичным полимером, который гидролизует с образованием моно- и олигомеров молочной кислоты.

Стент имел толщину балок 0,17 мм; диаметры от 3,0-3,5 до 4,0 мм, длину до 12 мм. Балки стента не были рентген-контрастными, однако на их концах имелись рентген позитивные маркеры из коллоидного золота. По мнению разработчиков,

отсутствие постоянной платформы стента позволит уменьшить время приема двойной антитромбоцитарной терапии и после растворения каркаса восстановить вазомоторную функцию [91].

В таблице 1 приведены основные биodeградируемые стенты, предлагаемые на медицинском рынке в настоящее время.

Таблица 1 – Виды биodeградируемых стентов

Название стента	Компания изготовитель	Материал стента	Препарат в стенте
Igaki-Tamaistent®	Kyoto Medical Planning Co., Ltd., Japan	Полимолочная кислота	Нет
Absorb GT1™	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL	Полимолочная кислота	Эверолимус
REVA stent	Reva Medical, Inc., San Diego, CA	Тирозин-поликарбонат	Нет
ReZolve™ stent	RevaMedical, Inc., San Diego, CA	Тирозин-поликарбонат	Сиролимус
ART Pure Resorbable Scaffold stent	ArterialRemodeling Technologies, France	Полимолочная кислота	Нет
DESolve™	Elixir Medical Corporation, Sunnyvale, CA	Полимолочная кислота	Миолимус
DESolve® NOVOLIMUS™	Elixir Medical Corporation, Sunnyvale, CA	Полимолочная кислота	Новолимус
BTI stent	Bioabsorbable Therapeutic Inc., Menlo Park, CA	Салициловая кислота	Сиролимус
AbsorbableMetal Stent-1	Biotronik SE & Co. KG, Germany	Магний и редкие сплавы металлов	Нет
AbsorbableMetal Stent-2	Biotronik SE & Co. KG, Germany	Сплав магния	Нет
AbsorbableMetal Stent-3	Biotronik SE & Co. KG, Germany	Сплав магния	Сиролимус

Несмотря на удачную идею временного каркасного ремоделирования сосудистого просвета и первые успешные клинические результаты, в отдаленные сроки эти конструкции не показали себя более эффективными, по сравнению с металлическими стентами с лекарственными покрытиями. Были получены данные о склонности этих устройств к позднему (более 6 месяцев) и очень позднему

(более 12 месяцев) тромбозу [86]. Клиническое испытание магниевого стента Absorbable Metal Stent фирмы «Biotronik» (Германия), показало, что рестеноз возникает в 38 % случаев через 4 месяца наблюдения, однако осложнений и летальных исходов на госпитальном этапе не было [44].

1.4.2 Характеристика стентов с паклитакселом

В соответствии с данными ряда клинических исследований, при установке стентов с нанесенным на них «чистым» паклитакселом, наблюдается уменьшение гиперплазии неоинтимы, но при этом частота клинически неблагоприятных событий не уменьшается [13, 63]. При сравнении стентов Supra-G покрытых паклитакселом в разных дозах (1,3 и 3,1 мкг/мм²), было обнаружено, что частота рестеноза после 1 года наблюдения составляет 27, 12 и 4 %, а частота повторной реваскуляризации составляет 8,6, 6,9 и 10 %, т.е. практически не отличается у вышеназванных типов стентов.

При сравнении стента Achieve (CookInc) с паклитакселом (3 мкг/мм²) и голометаллического стента (Multi-Link Penta), частота рестеноза составила 14,9 % против 20,6 %; $p = 0,076$, повторная реваскуляризация требовалась через 9 месяцев в 11,9 и 14,5 % случаев, соответственно; $p = 0,12$ [55].

При сравнении стентов с паклитакселом в различной концентрации обнаружено, что частота рестенозов зависит от дозы препарата. Так, при использовании паклитаксела в дозах 0,2, 0,7, 1,4 и 2,7 мкг/мм², частота рестеноза составляет 20, 12, 14 и 3 %, соответственно [13]. В настоящее время паклитаксел наносят на стенты, как правило в дозе 3 мкг/мм² (таблица 2) [13].

В большинстве случаев препарат наносится на поверхность стента методом ультразвукового напыления раствора, содержащего необходимую концентрацию препарата. В частности, с использованием аналогичной технологии изготавливают стент Zilver PTX, который нашел широкое клиническое

применение для реваскуляризации периферических артерий нижних конечностей [85].

Таблица 2 – Эффективная доза паклитаксела для подавления гиперплазии неоинтимы [13]

Показатель	Доза паклитаксела (мкг/мм ²)			p
	3,1	1,3	0	
Длина поражения, мм, М±σ	10,9±3,6	11,2±3,2	10,5±3,1	0,52
Диаметр артерии, см, М±σ	2,94±0,39	2,93±0,38	2,88±0,36	0,69
Стеноз до стентирования, %, М±σ	79,4±9,0	80,1±8,0	80,9±9,9	0,14
Стеноз после стентирования, %, М±σ	1,87±5,38	3,27±5,03	3,77±8,42	0,67
Рестеноз, %	4	12	27	p<0,001

1.4.3 Стенты с паклитакселом в составе полимерного носителя

Первые стенты, на которые был нанесен паклитаксел в смеси с полимерами, отличались высокой частотой формирования тромбозов в стентированной области. Стент Quanam QUADDs-QP2 (Boston Scientific Corporation Inc/Quanam Medical, Santa Clara, CA, USA) содержал паклитаксел в концентрации 4 мкг/мм², в качестве полимера был использован полиакрилат. Полимерное покрытие с паклитакселом покрывало не весь стент, а было расположено кольцевыми сегментами, с непокрытыми участками между ними [87]. В исследовании SCORE, было показано, что у пациентов с этим стентом наблюдается снижение гиперплазии неоинтимы и рестенозов, однако частота тромбозов составляет более 10 % в течение первого года после установки [58].

Современные стенты с лекарственным покрытием в составе полимерной матрицы содержат меньшую дозу цитостатика по сравнению со стентами без полимерного покрытия. Так, коронарный стент Taxus содержит паклитаксел в дозе 1 мкг/мм² в смеси с эластомером на основе углеводов. Он существенно реже инициирует формирование рестеноза и потребность в повторной реваскуляризации по сравнению с голометаллическим стентом [89]. Риск развития тромбозов у пациентов со стентом Taxus уменьшается при сочетанной с антитромбоцитарной терапией аспирином и тиенопиридинами в течение 6 месяцев [14, 103, 121].

Периферический стент Eluvia, который разработан на базе стента Innova компанией «Boston Scientific», состоит из слоев полибутилметакрилата и (винилиденфторид и гексафторпропилен) с паклитакселем в дозе всего 0,167 мкг/мм² [51]. Это покрытие биологически стабильно, а цитостатик высвобождается через поры в базовом полимере.

1.4.4 Стенты с покрытиями, содержащими препараты на основе лимусов

Сиролимус в настоящее время применяется для изготовления коммерческих и опытных стентов как в комплексе с полимерами, так и без них.

Стенты Pro NOVAXR, ISAR Rapra G1 stent, Coroflex® ISAR drug-eluting stent с сиролимусом без полимерного покрытия показывают схожие результаты относительно развития рестеноза (от 6,1 до 14,2 % в период наблюдения 9 месяцев) [11, 49, 61].

На стент Vx-VELOCITY (Cordis; Johnson & Johnson Inc) нанесено полимерное покрытие из недеградируемого оригинального полимера и сиролимуса в дозе 140 мкг/мм². Из этого покрытия 80 % сиролимуса высвобождается в течение 28 дней, что приводит, по данным нескольких рандомизированных исследований, к снижению рестеноза на 27 % в артериях с

лекарственно-покрытыми стентами, по сравнению со стентами без лекарственного покрытия [114, 122].

Стент Cypher (с полимерным покрытием из полиэтиленвинилацетата/полибутилметакрилата и сиролимуса в дозе 140 мкг/мм²) сравнивали со стандартным металлическим стентом. Выявлено, что в группе пациентов с покрытыми стентами не было обнаружено рестенозов, при этом у 26,6 % пациентов с обычными стентами на сроке 12 месяцев были обнаружены рестенозы [16].

Вышеописанные покрытия, содержащие препараты, ингибирующие пролиферацию клеток, призваны ингибировать рост неоинтимы в кратковременной и длительной перспективе. Очевидно, что цитостатический эффект таких покрытий зависит как от дозировки лекарственного препарата, так и от кинетики его высвобождения в окружающие стент ткани.

1.4.5 Сравнительная характеристика цитостатиков (лимусы и паклитаксел)

Стенты с эверолимусом превосходят стенты с паклитакселом второго поколения с точки зрения безопасности и эффективности [109].

В многоцентровом, рандомизированном, контролируемом клиническом исследовании SPIRIT IV, в котором было 3687 пациентов ≥ 18 лет, перенесших ЧТКА, были рандомизированы пациенты 2:1 с эверолимусом (XIENCE V, Abbott Vascular, Санта-Клара, Калифорния) или с паклитакселом (TAXUS Express-2, Boston Scientific, Natick, Massachusetts). Стенты с эверолимусом по сравнению с паклитакселом снижают двухлетние показатели повторной реваскуляризации (6,9 % против 9,9 %, $p = 0,003$), инфаркты миокарда (2,5 % против 3,9 %, $p = 0,02$), тромбозы стента (0,4 % против 1,2 %, $p = 0,008$). Между 1 и 2 годами не было существенных различий в частоте побочных эффектов между двумя типами стентов [101].

1.5 Стенты с биodeградируемым полимерным покрытием

Van der Giessen W. J. [74] изучил различные биodeградируемые полимеры (гомо- и гетерополимеры гидроксиуксусной и молочной кислот, поликапролактон, полигидроксibuтират-валерат, полиортоэфир). Он показал, что все тестируемые соединения индуцируют значительные воспалительные реакции в течение 4 недель после имплантации. Автор предположил, что биodeградируемые полимеры сами по себе не уменьшают пролиферации неоинтимы и не могут самостоятельно применяться для remodelирования сосудистого русла. В связи с этим полимеры наполнили лекарственными препаратами. Химически программируемая постепенная биологическая деградация полимера, по мнению авторов, должна обеспечить длительное локальное высвобождение лекарственного препарата в зоне установки стента.

Наибольшее применение в медицине, среди биodeградируемых носителей лекарственных препаратов, на стентах получили полиэфиры: полигликолевая кислота, полимолочная кислота, их сополимеры, поли-ε-капролактон и др. Применение вышеназванных покрытий стало возможным благодаря:

1. простоте приготовления растворов, хорошим реологическим, эластическим и адгезивным свойствам, которые позволяют легко формировать покрытия с использованием разных подходов;
2. достаточной эффективности включения лекарственных веществ различной физико-химической природы в полимерную матрицу;
3. отсутствию токсичности и быстрому гидролизу/биodeградации в организме.

Стент «Biomatrix» фирмы Biosensors состоит из голометаллического каркаса, покрытого полимолочной кислотой в комплексе с биолимузом А9, который постепенно высвобождается из этого покрытия на протяжении 6–9 месяцев [54]. В клиническом исследовании STEALTH провели сравнительную оценку применения голометаллического стента и биолимус-содержащего стента

«Biomatrix». Исследование включало 120 пациентов с ишемической болезнью сердца, из них 80 больным были имплантированы стенты с покрытием биолимус А9, а 40 – голометаллические стенты. Наблюдение в течение 6 месяцев показали снижение рестеноза в группе «Biomatrix» в сравнении с контрольной группой: пролиферация неоинтимы составила 0,09 мм против 0,45 мм ($p < 0,05$). Однако спустя 2 года клиническая безопасность применения этих стентов была одинакова, поскольку за все время случаев тромбоза не было выявлено [55].

Стент Nobori® (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) состоит из полимолочной кислоты и цитостатика биолимуса А9 в концентрации 15,6 мкг/мм, который абсорбируется из этого покрытия в течение 6–9 месяцев [23]. Исследование NOBORI I показало превосходство стента Nobori® по сравнению со стентами с паклитакселом (Taxus®, Boston Scientific, Maple Grove, MN, США): клинически значимый рестеноз наблюдался в 0 % и 2,9 % случаев, соответственно. Ни в одной из групп за 9 месяцев тромбоза стентов отмечено не было [102].

1.6 Стенты с неразлагаемым полимерным покрытием

На первых стентах с цитостатиками использовались неразлагаемые полимеры. Они были применены в качестве прямого поверхностного покрытия и в качестве носителя биологически активных соединений. При использовании неразлагаемых полимеров, доставка лекарственного препарата достигается за счет диффузии слоя полимера. Не исключено, что биологически нейтральные полимеры приводят к меньшей локальной воспалительной реакции.

Так, стент Cypher (Cordis Johnson & Johnson), появившийся на рынке в 2001 г., содержал сиролимус в составе покрытия из комплексной полимерной композиции: поли-н-бутил метакрилата и сополимера полиэтилен-винила. Дозировка сиролимуса составляла 140 мкг на стент (1,2 мкг/мм²). Благодаря

этому покрытию, после установки таких стентов, удалось значительно снизить частоту рестеноза (до 6–8 %) у больных с сахарным диабетом, с протяженными, сложными, распространенными поражениями коронарных артерий [25, 28].

Стент Xience V (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) состоит из двух слоев. Первый слой полимеры – акриловый и фторполимер и второй слой, содержащий эверолимус толщиной 5-6 микрон с концентрацией 100 мкг/см² [83]. Такая конструкция рассчитана на высвобождение первых 25 % препарата в течение первого дня после имплантации, а остальных 75 % – в течение 1 месяца. В исследование SPIRITIII было включено 1002 пациента со стентами Xience V (n = 669) и Taxus (n = 333), при этом проводилась двойная антиагрегантная терапия на протяжении 6 месяцев. В течение года случаи рестеноза у больных со стентами Xience V и Taxus составили 4,7 и 8,9 %, p = 0,079, соответственно [36].

Стент Rapamycin-coated BX™ VELOCITY stent (Cordis, Warren, USA) с двухфазной кинетикой высвобождения препарата в качестве лекарственного средства содержит сиролимус в дозировке 140 мкг/см², а в качестве полимерного носителя – смесь 1:1 полиэтилен-винилацетата (PEVA) и полибутил-метакрилата (PBMA). Основная часть сиролимуса из такого покрытия высвобождается в стенку артерии в течение первых 5 часов, затем наступает медленная фаза высвобождения, которая занимает следующие 168 часов (7 дней) (рисунок 3) [113].

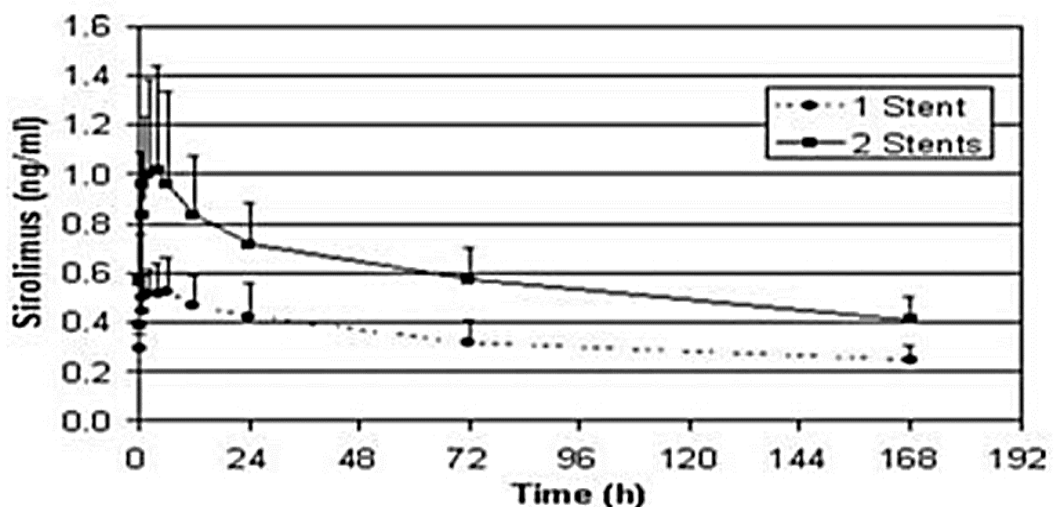


Рисунок 3 – Кинетика высвобождения сиролимуса в стенку артерии, при одинарном и двойном стентировании [113]

Ввиду развития рестеноза через 6 месяцев и более после имплантации стентов были разработаны устройства с более длительной кинетикой высвобождения цитостатиков. Примером стента с таким покрытием является стент Eluvia от компании «Boston Scientific». Благодаря слою из полибутилметакрилата и пористого покрытия из фторопласта, паклитаксел высвобождается дозированно в стенку артерии с максимальным пиком на 27 день. Именно в течение этого времени наблюдается активная фаза воспаления и регенерации сосудистой стенки. Цитотоксический эффект при установке такого стента сохраняется до 270 дней (рисунок 4) [51].

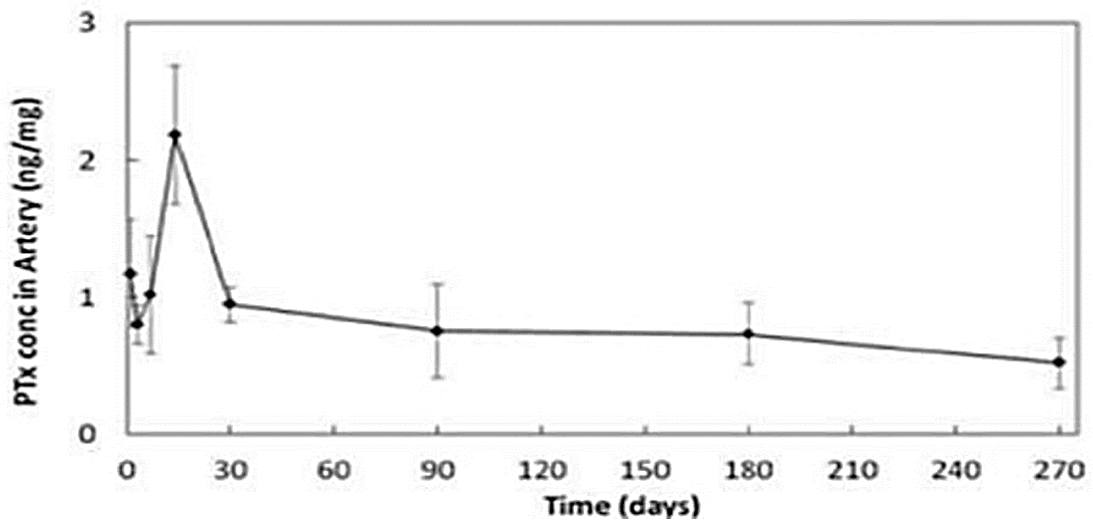


Рисунок 4 – Кинетика высвобождения паклитаксела в стенку артерии из стента Eluvia компании «Boston Scientific» [51]

В последние годы для покрытий стентов было предложено использовать полиуретаны – полимеры, которые в зависимости от строения мягкого сегмента имеют разную скорость биodeградации [21]. Однако исследования на кроликах показали, что стенты, покрытые полиуретаном, приводят к формированию контактного воспалительного инфильтрата, состоящего из клеток лимфоцитарного ряда и гигантских клеток инородных тел. Было высказано предположение, что полиуретановое покрытие не уменьшает степень развития рестеноза и требуется модификация его свойств [21]. Были изготовлены покрытия из смесей полиуретана с полиэтиленгликолем и паклитакселом, нанесенные методом погружения. Такое покрытие имеет пористую структуру, гидрофобный

паклитаксел связывается с полиуретаном, а полиэтиленгликоль растворяется и формирует пористую структуру матрикса, обеспечивая дозированное высвобождение препарата из покрытия. Такой подход, по утверждению авторов, может быть использован для пролонгированной доставки лекарственных препаратов в течение всего активного периода воспаления после ангиопластики [56, 62, 68, 69, 110].

1.7 Варианты нанесения покрытий на стенты

Существует несколько методов для нанесения лекарственных препаратов на стенты: погружение в раствор (dipping), покрытие эмульсией полученной при помощи ультразвука (ultrasonic spray coating), покрытие эмульсией, полученной при помощи сжатого воздуха (airbrush), электроспиннинг. Первые три метода по своим результатам очень схожи и имеют ряд недостатков:

1. Так как расстояния между балками стента, где они соединяются друг с другом, могут составлять менее 50 мкм, окунание в раствор может приводить к образованию мостиков в этих участках, что не допускается, поскольку такое покрытие склонно к разрывам, отслоению, а его фрагменты могут попадать в кровотоки и вызвать дистальную эмболию. Другим недостатком этого метода является повышенный расход раствора полимера и лекарственного средства.

2. Недостаточное распределение цитостатика на 1 мм^2 лечебной поверхности стента (технологически зависимая дозировка).

3. Полимеризация или кристаллизация раствора полимера на поверхности стентов не обеспечивает создание эффективной, равномерной дозировки по всей окружности стента для стентированного сегмента сосуда.

4. Фрагментация и биологическая деградация покрытия приводит к дистальной эмболизации и увеличивает риск локального тромбообразования.

Вышеперечисленные недостатки требуют разработки других вариантов нанесения лекарств на стены, одним из которых является метод электроспиннинга.

1.7.1 Полимерные покрытия, изготовленные электроспиннингом

Электроспиннинг – это способ получения нановолокон из растворов полимеров, их смесей или из расплавов полимеров (и их смесей). Процесс заключается в вытягивании ультратонких волокон из капли полимера под действием электрического поля.

Метод прост в исполнении, позволяет управлять свойствами получаемого волокна, что делает его чрезвычайно привлекательным для использования в медицине [17]. Электроспиннинг позволяет наносить покрытия с образованием как одного слоя, так и создавать многослойные комбинации.

Было предложено использовать этот метод для нанесения покрытий на стенты [80, 120, 22, 88, 119]. На данный момент стенты с покрытием, изготовленные методом электроспиннинга, описаны в научной литературе и исследованы в экспериментах на животных [12, 72].

Примером стента с покрытием, нанесенным методом электроспиннинга, является стент, на который нанесено покрытие, состоящее из поликапролактона и паклитаксела. Этот стент предназначен для стентирования пищевода, а его состоятельность была исследована после установки в пищевод экспериментальным животным (собакам) [12]. Авторами было показано, что такое покрытие приводит к уменьшению пролиферации гладкомышечных клеток и позволяет отсрочить образование рестриктур.

Опубликованы результаты экспериментального исследования покрытий для стентов, изготовленных методом электроспиннинга из полиуретана. В работе Tefft В. J. и соавт. намагниченный стент из нержавеющей стали был покрыт при

помощи электроспиннинга полимерным покрытием из полиуретана. На модели свиной коронарной артерии было показано, что он успешно заселяется эндотелиальными клетками, предварительно помеченными парамагнитными наночастицами оксида железа (SPION). Авторы считают, что магнитные силы совместно со слоем эндотелиальных клеток облегчат эндотелизацию внутренней поверхности стента, тем самым улучшая заживление артерий и снижая риск тромбоза и рестеноза [72].

В клинической практике используется стент РК Papyrus (Biotronik, Berlin, Germany). Полимерное покрытие этого стента толщиной до 90 микрон, изготовленное методом электроспиннинга из полиуретана, выполняет функцию графта для герметизации дефектов коронарной артерии [48].

1.8 Недостатки стентов с лекарственным покрытием

К специфическим недостаткам стентов с полимерными покрытиями относятся: разрушение покрытия и дистальная эмболия его фрагментами, а также локальное тромбообразование.

Полимерное покрытие, с одной стороны, улучшает доставку цитостатика в сосудистую стенку, но, с другой стороны, происходит повреждение полимерного слоя. В момент имплантации стента покрытие разволокняется и растрескивается, так как диаметр стента увеличивается в среднем в два раза от исходного размера. Фрагментация и биологическая деградация покрытия приводит к дистальной эмболизации и увеличивает риск локального тромбообразования.

Есть сообщения о растрескивании и неоднородности полимерного слоя в стентах Taxus (паклитаксел) и Cypher (эверолимус) даже до их имплантации. Это может вызывать дистальную микроэмболию и воспаление, что приводит к микроциркуляторной недостаточности [108].

Частота дистальной эмболии при стентировании и баллонной ангиопластике аутовенозных графтов составляет 31,8 %, если имеется тромбоз, и 7,9 % без тромбоза [98]. При стентировании периферических артерий частота дистальной эмболии от 4-5 % [24].

Несмотря на многочисленные варианты конструкций стентов и покрытий, проблема рестеноза и тромбозов в отдаленном периоде в настоящее время требует решения. Так, в многоцентровом рандомизированном исследовании EXAMINATION, в которое было включено 1498 пациентов, проводилось сравнение стентов с покрытием, содержащим эверолимус и стентов без покрытия. За пятилетний период наблюдения было показано, что покрытые стенты не позволяют решить проблему рестеноза на приемлемом уровне, показывая снижения смертности не более чем на 3 % (12 % в случае непокрытых стентов, 9 % в случае стентов с покрытием) [26].

Близкие данные были получены в исследовании Norwegian Coronary Stent Trial (NORSTENT) с участием 9013 пациентов, период наблюдения составил 6 лет. Показатели повторной реваскуляризации составляли 16,5 % в группе стентов с лекарственным покрытием и 19,8 % в группе непокрытых стентов [42].

В ряде исследований были продемонстрированы положительные результаты по снижению неблагоприятных клинических исходов в группе покрытых стентов. Сравнительные характеристики голометаллических стентов без покрытия и таких же стентов с покрытием из сиролимуса за период наблюдения 240 дней показали: рестеноз, по меньшей мере, 50 % от диаметра просвета сосуда составил 3,2 % в группе стентов, покрытых сиролимусом, против 35,4 % в группе непокрытых стентов [29].

Резюме

Поскольку голометаллические стенты используются наиболее широко, технология их изготовления прекрасно отработана и их использование экономически целесообразно. Разработка технологий, призванных улучшить свойства таких стентов и их покрытий, направленных на длительное

функционирование в организме без повторной реваскуляризации и антитромбоцитарной терапии, остается актуальной задачей.

Сложность решения этой задачи, обусловлена тем, что используемые методы доставки лекарственных препаратов не обеспечивают их эффективного воздействия на клетки сосудистой стенки в области установки стента. В результате они недостаточно эффективно ингибируют клеточную пролиферацию и локальное тромбообразование в области деформации. Равномерная доставка лекарственных препаратов во всю область установки стента, защита сосудистого русла от контакта с поврежденными участками деформированной стенки (бляшки) не решается простым нанесением лекарственных препаратов на балки стента, толщина которых составляет не более 200 мкм, при расстоянии между балками до нескольких миллиметров. Необходимость уменьшения таких процессов, индуцируемых установкой стента, как индукция воспалительной реакции, тромбообразование и восстановление нормальной эндотелизации ремоделируемого участка сосуда, также необходимо решать при изготовлении стентов нового поколения. Очевидно, что решение таких задач требует использования новых подходов, пригодных для модификации стентов, которые позволили бы приблизиться к решению вышеописанных проблем.

Одним из вариантов решения перечисленных проблем может быть дальнейшее усовершенствование покрытий стентов, использование полного закрытия стентированной зоны, нанесение сеток или пористых пленок на поверхность стентов. Такие покрытия могут быть сформированы методом электроспиннинга на основе синтетических и природных полимеров, причем они могут быть био- и гемосовместимыми, многослойными, содержать слои с разными биологическими и химическими свойствами, могут обеспечить длительную доставку препаратов, стимулировать эндотелизацию и, в конечном счете, решить проблему рестеноза в стентированной зоне.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая структура экспериментов

Для достижения цели и решения поставленных задач была разработана дизайн экспериментального исследования (рисунок 5).

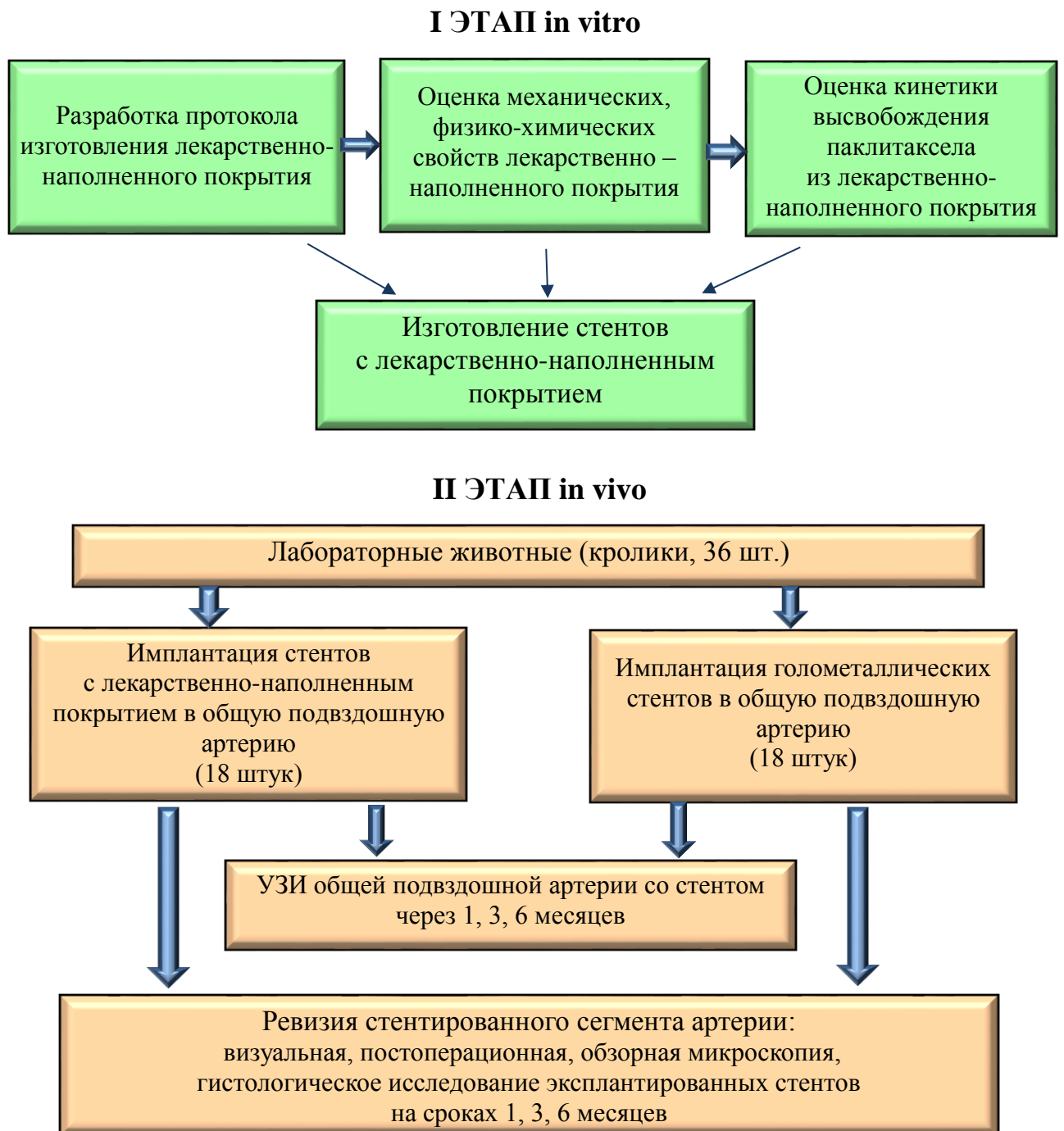


Рисунок 5 – Дизайн исследования

Основную часть работы, а именно, разработку протокола изготовления лекарственно-наполненного покрытия (ЛНП), 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, под руководством кандидата биологических наук Лактионова П.П.

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 в лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии под руководством доктора медицинских наук, профессора Карпенко А.А. и технической поддержке кандидата биологических наук Сергеевича Д.С.

Изготовление лекарственно-наполненного покрытия осуществляли при помощи установки для электроспиннинга, которая была изготовлена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук инженером Рассказовым Г.А. и предназначена для работы с радиоактивно-мечеными соединениями (рисунок 6).



Рисунок 6 – Установка для электроспиннинга

2.2 Реактивы

В текущем исследовании использовались следующие реагенты от Sigma-Aldrich, США: поликапролактон (ПКЛ, Mm 70,000-90,000), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП), паклитаксел, диметилсульфоксид (ДМСО); формалин, фосфатный буферный раствор (PBS), (3-аминопропил) триэтоксисилан, глутаральдегид, поли-L-лизин,

2-метоксиэтилацетат, бензоилпероксид, дициклогексилфталат, гексаметилдисилазан (HMDS).

Атропин (Дальхимфарм, Россия), Ксилавет (Pharmamagist, Венгрия), Золетил-100 (Virbac Sante Animale, Франция), 0,9 % раствор NaCl (Красафарма, Россия), 10 % Бетадин (EGIS Pharmaceuticals PLC, Венгрия), Гепарин (ООО «Синтез», Россия), тиопентал натрия 50 мг/мл (ООО «Синтез», Россия), алюминиевый спрей (NicoVet, Франция; № 018-075), диклофенак 25 мг/мл – 3 мл (Шрея Лайф Саенсиз Пвт. Лтд., Индия), ацетилсалициловая кислота 500 мг (Фармстандарт +, Россия) использовали для экспериментов *in vivo*.

Для гистологического исследования использовали LR White Resin (каталожный номер 14383-UC, London Resin Company, Ltd., Великобритания), гематоксилин, среду Витрогель (Biovitrum, Россия) и эозин (Bio-Optica, Италия).

2.3 Синтез радиоактивно-меченного паклитаксела

Меченый тритием ПТХ получали методом обмена термоактивированного трития [77] (Патент №1823961 А3). ^3H -паклитаксел (^3H -ПТХ) с радиоактивной меткой очищали от побочных продуктов при помощи обращённо-фазовой хроматографии на колонке с C18 (Agilent, США) в системе вода: ацетонитрил (25-100 %). Радиохимическую чистоту полученного препарата оценивали при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) в системе хлороформ (19): метанол (1): вода (0,1), $R_f \sim 0,7$ с последующим нанесением толуольного сцинтиллятора и радиоавтографии. Радиоактивность препаратов определяли жидкостно-сцинтилляционным счетом на β -счетчике «Tri-Carb 2800 TR» (PerkinElmer, США) в сцинтиляторе ScintiVerse Bio – HP SX14 (Fisher Scientific, США). Для определения радиоактивности образцов, аликвоту из образца объемом 100 мкл вносили в 900 мкл сцинтиллятора, тщательно

перемешивали и определяли радиоактивность в течение 1-2 часов после приготовления смеси.

2.3.1 Приготовление 3Д-матриксом методом электроспиннинга

Растворы для получения матриксом методом электроспиннинга приготавливали из стоковых растворов полимеров в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол. В качестве стоковых растворов были использованы 5 % раствор поликапролактона, 10 % раствор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Концентрация ЧСА в матриксах приведена в процентах от их сухого веса. Паклитаксел растворяли в ГФИП (или ДМСО) и добавляли из расчета $\sim 0,46$ мкг/см² матрикса (что соответствовало 0,36 мкг/диск). При необходимости вносил в раствор для электроспиннинга 3 или 6 % ДМСО (объем : объем).

³H-ПТХ добавляли из расчета не менее 26000 срт/см² (что соответствовало не менее чем 20000 срт/диск, диск 3Д-матрикса диаметром 1 см имеет площадь $\sim 0,785$ см²). Для изготовления радиоактивно-меченых матриксом была использована установка для электроспиннинга собственного изготовления, снабженная источником питания Spellman SL 150 (30 кВ, Spellman, США) с принудительной вытяжной вентиляцией, снабженной НЕРА фильтром. 3Д-матриксом толщиной 150–180 мкм получали, используя в качестве электрода-приемника барабан, покрытый слоем алюминиевой фольги, диаметром 2 см и длиной 5,2 см, так что площадь полученного матрикса составляла 32,6 см². Скорость подачи раствора составляла 1,2–1,4 мл/ч, на напряжении 23–25 кВ, скорость вращения барабана-коллектора 300 об/мин, расстояние между барабаном-коллектором и фильерой 19–20 см, температура 23–25 °С, диапазон влажности 25–30 %. После изготовления 3Д-матрикса снимали с коллектора, высушивали не менее 12 часов под вакуумом при остаточном давлении не более 10 Па и хранили запаянными в полиэтилен при 4 °С.

В процессе работы подбирали составы растворов (концентрации, растворители) и условия электроспиннинга путем изменения концентраций компонентов, расстояния между фильерой и электродом-коллектором – 10–25 см; скорости подачи полимера – 1-2 мл/мин; напряжения – 20–28 кВ; скорости вращения электрода-коллектора – 200–300 об/мин. Электроспиннинг проводили при комнатной температуре в термостатируемой комнате (23–25 °С).

В результате, были определены и использованы для изготовления экспериментальных «ЛНП» следующие параметры электроспиннинга: расстояние между фильерой и электродом-коллектором (внешний диаметр коллектора 2 см) – 20 см; скорость подачи полимера – 1,2 мл/мин; напряжение – 28 кВ; скорость вращения электрода-коллектора – 300 об/мин. Общий объем раствора синтетических полимеров на один стент с ЛНП был равен 0,2 мл.

2.4 Характеристика матриц

2.4.1 Определение механических характеристик матриц

Диаграмму растяжения для матриц получали с использованием универсальной разрывной машины для испытания материалов Zwick/Roell Z100 (Германия), как описано в ISO 7198:1998 [67]. Остаточную нагрузку после двукратного удлинения матриц получали также, как и в случае исследования прочности матриц на разрыв, с тем отличием, что после удлинения матриц в 2 раза снимали нагрузку, возвращали зажимы разрывной машины в исходное положение (l₀) и, затем, снимали нагрузку после повторного удлинения матрица в 2 раза.

2.4.2 Исследование микроструктуры поверхности матриц

Микроструктуру поверхности матриц исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) как описано ранее [60]. Диаметр волокон и размер пор определяли из изображений, полученных при помощи СЭМ как описано в ISO 7198:1998 [67].

2.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (исследование состава поверхности 3Д-матриц)

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS) проводилась в электронном спектрометре SPECS, оборудованном полусферическим анализатором PNOIBOS-150 MCD-9 и немонахроматическим источником MgK (SPECS GmbH, Германия). Чтобы избежать термического разложения образца, рентгеновская пушка располагалась на расстоянии 30 мм от образца. Спектры регистрировались с энергией прохода, установленной на 50 эВ и 10 эВ (с высоким разрешением). Перед измерениями шкала энергий была откалибрована с использованием пиков Au4f_{7/2} (84,00 эВ) и Cu2p_{3/2} (932,67 эВ) из золота и медной фольги. Давление остаточного газа во время приема спектров было ниже 3×10^{-7} Па. Образцы были смонтированы с использованием двухкомпонентной клейкой ленты с медной проводкой 3M®. Количественная обработка данных была выполнена с использованием программного обеспечения XPSPEAK версии 4.1 и факторов атомной чувствительности.

2.6 Определение дополнительных физико-химических характеристик матриц

Угол смачивания определяли при помощи прибора для определения краевого угла смачивания Drop Shape Analyzer – DS A25 (Kruss GmbH, Германия), используя воду в качестве растворителя, объем капли 1 мкл и скорость съемки 160 кадров в секунду.

Пористость матриц определяли, исходя из объема матрикса и плотности ПКЛ по формуле: пористость = $1 - \frac{\text{кажущаяся плотность (вес матрикса, деленный на объем матрикса)}}{\text{плотность полимера [95]}}$ и на основе данных СЭМ как описано в ISO 7198:1998, по формуле: пористость = $\frac{\text{площадь пор}}{\text{площадь матрикса} + \text{площадь пор}} \times 100$.

Влагопоглощение и потерю массы матриц определяли, как описано в ISO 7198:1998, исходя из их веса, по следующим формулам:

Влагопоглощение (%) = $\frac{\text{вес после намокания} - \text{вес до намокания}}{\text{вес после намокания и высушивания под вакуумом}} \times 100$.

Потеря массы (%) = $\frac{\text{вес до намокания} - \text{вес после высушивания под вакуумом}}{\text{вес до намокания}} \times 100$.

После вымачивания матриц в воде в течение суток, определяли скорость их высыхания, измеряя вес на микровесах с точностью до 0,1 мг.

2.7 Исследование высвобождения паклитаксела из 3Д-матриц

Все эксперименты по исследованию высвобождения ^3H -ПТХ ставили в дублях. При помощи высеки из полученного 3Д-матрикса высекали диски диаметром 1 см. Диски взвешивали и раскладывали в лунки 48 луночного планшета. В каждую лунку вносили по 250 мкл раствора (физиологический раствор (Sigma, США), или человеческую плазму). Планшет заклеивали герметичной липкой пленкой (Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, Bio-Rad, США) для предотвращения высыхания раствора в лунках и инкубировали на

шейкере Titramax 1000 (Heidolph, Германия) при комнатной температуре 25 °С и скорости вращения платформы 200 об/мин в течение различного времени до 27 суток.

Кинетику высвобождения ^3H -ПТХ из 3Д-матрикса оценивали двумя способами: 1 – матриксы инкубировали с раствором 20 мин, 60 мин, 3 часа, 9 часов, 27 часов, 3 суток, 9 суток и 27 суток; 2 – по истечению 20 мин удаляли супернатант, споласкивали матрикс и инкубировали его со свежим раствором до следующей временной точки, после которой снова убирали супернатант, споласкивали матрикс и вносили свежую порцию раствора и т.д. В качестве растворов был использован физиологический раствор и плазма крови человека, стабилизированная этилендиаминтетрауксусной кислотой. По завершению инкубации матриксы отмывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Радиоактивность супернатантов определяли, как было описано ранее, в дублях (см. п. 2.3). Концентрацию ПТХ в растворе определяли, исходя из удельной радиоактивности препарата.

Для исследования влияния деформации матрикса на высвобождение ^3H -ПТХ, полоску 3Д-матрикса фиксировали в зажимах, измеряли расстояние между зажимами и затем медленно при помощи винта увеличивали расстояние между зажимами вдвое. После снятия нагрузки из деформированного матрикса вырезали диски и исследовали высвобождение ^3H -ПТХ, как описано выше.

2.8 Клеточные культуры

Клетки линии аденокарциномы Hela получены из American Tissue Cell Collection (ATCC, США). Первичные гладкомышечные клетки получены из меди внутренней сонной артерии после операции по иссечению патологической извитости ВСА. Клетки культивировали в среде IMDM (Gibco, США, 42200-014)

в присутствии с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Gibco, США, 10106) в CO₂ инкубаторе при 37 °C, 6 % CO₂.

2.9 Оценка цитотоксичности паклитаксела, высвобождаемого лекарственно-наполненным покрытием

За сутки до начала проведения теста на цитотоксичность, в лунки 48-луночного планшета рассаживали клетки аденокарциномы Hela и гладкомышечные клетки (SMC 3) в концентрациях 6000 и 1000 клеток на лунку соответственно, в 200 мкл среды IMDM с 10 % сывороткой и инкубировали в течение 24 часов в CO₂ инкубаторе при 37 °С, 6 % CO₂. Перед внесением в лунки исследуемой среды, из лунок отбирали культуральную среду и промывали клетки 150 мкл фосфатного буфера. Из исследуемых покрытий высекали диски диаметром 1 см, раскладывали и фиксировали в лунках 48-луночного планшета. В каждую лунку вносили по 250 мкл культуральной среды IMDM с 10 % ЭТС (Sigma, США), после чего начинали отсчет времени инкубации. Планшет оставляли в CO₂ инкубаторе при 37 °С, 6 % CO₂. Через 4 часа среду из части лунок отбирали в стерильные пробирки, и через 24 часа среду из оставшихся лунок и из пробирок переносили в лунки планшета с рассаженными клетками по 200 мкл в лунку. Инкубировали клетки 24, 48, 96 и 120 часов в CO₂ инкубаторе при 37 °С, 6 % CO₂, после чего оценивали цитотоксичность при помощи коммерческого набора Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisherScientific). Интенсивность окраски в лунках измеряли спектрофотометрически на длине волны 570 нм на планшетном ридере Multiscan FC (ThermoScientific). Данные обрабатывали в программе Excel.

2.10 Исследование гемосовместимости матриксов

Испытание было выполнено в соответствии с рекомендациями ISO 10993-4 и как описано ранее [118]. Вкратце, антикоагулированную кровь дважды

разбавляли PBS и инкубировали с 10-миллиметровыми дисками в течение 1 часа. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (1000 об/мин, 10 мин) и измеряли оптическое поглощение супернатанта при 545 нм. Процент гемолиза рассчитывали по формуле $[(OD_{sample} - OD_{neg}) / (OD_{pos} - OD_{neg})] \times 100$. Тесты проводили в трех повторностях для всех типов каркасов.

Тест на адгезию тромбоцитов или клеток крови на материалах проводился, как описано ранее [118], с использованием каркасов, установленных в 48-луночный планшет с богатой тромбоцитами плазмой или цитратной кровью. После инкубации матрицы дважды промывали PBS для удаления неприлипающих тромбоцитов или клеток крови и фиксировали в 2 % формальдегиде в PBS в течение 30 мин. Фиксированные клетки крови обезвоживали, используя серию градуированных этанолов (50, 70, 90 и 100 %), а затем переносили в смеси этанола и HMDS в соотношении 1 : 1, а затем в 100 % HMDS. После сушки и напыления слоем золото/палладий 10 нм матрицы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа EVO 10 (Carl Zeiss AG, Германия). Испытания проводили в трех повторностях для всех типов каркасов.

2.11 Изготовление стентов с лекарственно-наполненным покрытием, установка их на устройство доставки и стерилизация

Лекарственно-наполненное покрытие, которое представляло собой двухслойный 3Д-матрикс, наносили методом электроспиннинга поверх стента с использованием тех же условий электроспиннинга, как описано ранее. Первый (внутренний слой, 5–10 % по толщине) состоял из ПКЛ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО, внешний слой был сформирован из раствора ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО. Для нанесения покрытия стент устанавливали на электрод диаметром 1 мм. Общий объем раствора синтетических полимеров, затраченный на один стент, равен 0,23 мл.

После завершения процесса: стент снимали с электрода, обрезали лишний материал и переносили на стержень диаметром 1,5 мм, с которого сталкивали на баллон-катетер. После установки на баллон стент осаживали на баллоне при помощи равномерного обжимания на специальном устройстве. Аналогичным образом на баллоны-катетеры устанавливали и контрольные металлические стенты без покрытия. Готовые устройства доставки со стентами упаковывали и стерилизовали облучением потоком электронов (15 кГр) на установке ИЛУ-6 в лаборатории промышленных ускорителей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук.

2.12 Экспериментальная часть *in vivo*

2.12.1 Лабораторные животные, содержание и послеоперационный уход

Работа была выполнена на 36 лабораторных кроликах, со средним возрастом $6,8 \pm 0,15$ месяцев и средней массой тела $3,50 \pm 1$ кг.

Все процедуры с животными выполняли в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. №755 и приложения к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977 г.), с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

Животных содержали в стационарных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной лабораторной диете со свободным доступом к воде. Согласно регламента санитарно-эпидемиологического и ветеринарного законодательства, животные находились на карантине не менее 2 недель от момента поступления в виварий до введения в экспериментальное исследование.

Всем животным выполняли хирургическое вмешательство «Имплантация стента с лекарственно наполненным покрытием в общую подвздошную артерию» в стерильных условиях операционной. На каждый срок наблюдения (1, 3, 6 месяцев) были имплантированы по шесть образцов стентов с покрытием и без него. По завершению хирургического вмешательства и после пробуждения животного от наркоза его помещали на 2 дня в отдельную клетку с соответствующим послеоперационным уходом. Первые 7 дней после хирургического вмешательства для профилактики болевого синдрома вводили нестероидные противовоспалительные средства внутримышечно (диклофенак 25 мг/мл – 2 мл), а для профилактики тромбоза стента животным в течение всего периода наблюдения давали «per os» антиагрегант – ацетилсалициловую кислоту 100 мг 1 раз в сутки.

По истечению срока наблюдения выполняли повторную операцию «Забор исследуемого материала» используя наркоз, а также лапаротомию, выделение и иссечение общей подвздошной артерии с исследуемым стентом.

Выведение животных из эксперимента осуществляли сразу после забора экспериментального материала (не дожидаясь пробуждения от наркоза) путем использования двукратной дозы наркозной смеси с последующей стремительной декапитацией.

2.12.2 Процедура имплантации экспериментальных и контрольных стентов

Для имплантации использовали следующие инструменты: баллон-катетер со стентом (3,5 × 2,5) «Синус» RxPTCA № CP08300 (катетер длиной 190 см, диаметром в дюймах 0,014), индифлятор в комплекте с Y-конектором «Клик» и устройством для введения проводника, устройство для вращения проводника № АВ6301, шприц объемом 20 (давление до 30 атм.). Все инструменты производства фирмы ООО Ангиолайн (Россия, Новосибирск).

В качестве премедикации (для уменьшения секреции слюнных и бронхиальных желез) использовали 0,1 % атропин 0,1 мг/кг внутримышечно. Введение в наркоз осуществляли путем внутримышечной инъекции смеси растворов КсилаВет, Золетила и 0,9 % раствор NaCl, из расчета: 15 мг КсилаВет, 15 мг Золетила на кг веса и 0,5 мл физраствора. Затем после утраты болевой чувствительности и наступления сна, животное фиксировали на операционном столе в положении на спине. С помощью электробритвы удаляли шерсть с боковой поверхности шеи справа.

Обработав операционное поле антисептическим средством (10 % Betadine), доступ к общей сонной артерии выполняли через сонный треугольник. Однократно вводили 100 ЕД/кг гепарина во внутреннюю яремную вену.

Далее проводили пункцию общей сонной артерии пункционной иглой. После получения струи крови через просвет иглы в общую сонную артерию вводили проводник и по нему устанавливали интродьюсер 5 F (с проводником и иглой 5 F, 0,035" 8G, № АВ5132 ООО Ангиолайн (Россия, Новосибирск)). На гидрофильном проводнике (Abbott Vascular Guide Wires НТPILOT 200. №1010482-НJ, длиной 190 см диаметром 0,014 дюймов), под рентгенотелевизионном контролем проводили проводниковый катетер 5 F (MeritMedical 4 F PERFORMA® MW2, 65 cm 0,038" 1,17 mm Internal Diameter) до терминального отдела брюшной аорты. Контроль внутреннего конца проводникового катетера осуществляли ангиографией. При помощи последней проводили оценку диаметра и анатомии подвздошных артерий. Далее через просвет проводникового катетера проводили 0,014 коронарный проводник с гидрофильным кончиком до правой или левой бедренной артерии, после чего проводниковый катетер извлекали. Затем, по проводнику в интродьюсер и далее через аорту до общей подвздошной артерии под рентгенотелевизионном контролем проводился стент, фиксированный на катетер-баллоне. После доставки стента в правую или левую общую подвздошную артерию проводили его установку путем раздувания баллона манометрическим шприцем давлением 8–10 атм. После сдувания катетер-баллона и его извлечения из сосудистого просвета

по проводнику повторно к проксимальной границе стента проводился проводниковый катетер, через который выполняли контрольную ангиографию введением 5 мл контрастного препарата «Визипак». Интродьюсер и проводник удаляли. Место пункции общей сонной артерии (ОСА) ушивали нитью 6/0. После послойного ушивания раны швы обрабатывали Алюминиум-спреем (Nicovet, Германия №018-075).

Всего было имплантировано 18 контрольных голометаллических стентов и 18 стентов с покрытием, нанесенным методом электроспиннинга.

2.12.3 Оценка проходимости сосудистого стента

Оценку проходимости стентированной артерии в послеоперационном периоде проводили при помощи динамического ультразвукового обследования на сроках 1, 3, 6 месяцев. Осложнений во время исследования не было. Все обследования выполнялись без наркотизации животных.

Оценку средней линейной скорости кровотока (ЛСК) в стенте выполняли с помощью линейного датчика диагностической ультразвуковой системы Vividi (GE Medical Systems Ultrasound Ltd., Израиль; регистрационное удостоверение ФСЗ 2010/06618 от 13.04.2010). Точками исследования были выбраны: зона перед проксимальным отделом стента – центральный отдел стента, дистальный отдел стента. Оценивали наличие кровотока, процент стеноза и скорость кровотока.

Лабораторных животных выводили из эксперимента после каждой контрольной точки 1, 3, 6 месяцев.

2.12.4 Общий анализ и гистологическое исследование стентированных участков подвздошной артерии

Макроскопический анализ, наличие деформаций стента и изменение окружающей его ткани анализировали интраоперационно в момент забора исследуемого материала. После аутопсии животного проводили лапаротомию тупым и острым путем, выделяли брюшной отдел аорты, общие подвздошные артерии вместе с исследуемым стентом. Далее выполняли забор стентированного сегмента артерии путем пересечения стенки артерии, отступив 1 см от границ стента.

Эксплантированные стенты промывали при помощи инсулинового шприца небольшим количеством физиологического раствора (5 мл) для удаления форменных элементов крови, после чего фиксировали в 10 % формалине на фосфатном буфере.

Обзорную микроскопию выполняли с помощью стереомикроскопа SteREO Discovery.V12 (Carl Zeiss, Германия). На всех сроках наблюдения оценивали внешний и внутренний диаметр/площадь просвета исследуемых стентов.

Для гистологического анализа эксплантированные стенты с фрагментом артерии обезвоживали путем последовательной проводки через растворы спирта в различных концентрациях (50, 70, 90, 100 %) с интервалом времени 15 минут. Затем фиксировали в «LR White Resin» в соответствии с протоколом, предложенным производителем, с тем отличием, что в смолу на 50 мл добавляли 2 грамма инициатора полимеризации (смеси бензоилпероксида с дициклогексилфталатом) и полимеризацию проводили при 55 °С в течение 48 часов. Срезы толщиной 8 мкм изготавливали при помощи микротомного ножа из карбида вольфрама (cat N UWCDIS «PST» ProSciTech Pty Ltd, Австралия), установленного в микротом Microm HM-550 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). После получения срезы расправляли и фиксировали на стеклах (Biovitrum, Россия), модифицированных 3-аминопропилтриэтоксисиланом (3-Aminopropyl)

triethoxysilane (Aldrich, США, кат. № 440140) по протоколу [20]. Для фиксации срезы инкубировали под давлением в растворе 1 % глутарового альдегида и 0,33 мг/мл раствора поли-L-лизина в течение не менее 24 часов во влажной атмосфере, и затем, не менее 24 часов на открытом воздухе при 42 °С. Срезы депластифицировали в 2-метоксиэтил ацетате как описано ранее [30].

Для определения основных структурных составляющих элементов препаратов зоны имплантации стента, оценки клеточного наполнения и неклеточных структур, пролиферации неоинтимы, а также признаков воспаления, срезы окрашивали гематоксилином (Biovitrum, Санкт-Петербург) и эозином (Bio-Optica, Италия, № кат. 05-11007).

Окрашенные стекла высушивали и заключали под покровное стекло при помощи среды «Витрогель». Для оценки полученных препаратов использовали микроскоп Axio Lab.A1 с программным пакетом Zen 2 Blue Edition (Carl Zeiss GmbH, Германия).

2.13 Статистическая обработка данных

Анализ данных хирургического лечения проводился с помощью программы «Stata 13» для Windows 10 и «Stata 14» для Mac OS (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Проверка гипотезы о нормальности распределения признаков производилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Условие равенства дисперсий распределений признаков проверялось с помощью расчета критерия Левена. При нормальном распределении для описания количественных переменных использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение – $M \pm \sigma$, или среднее арифметическое и ошибку среднего – $M \pm m$. При распределении отличном от нормального, качественные переменные представлены в виде абсолютных значений и частоты встречаемости – n (%), количественные переменные представлены в виде медианы и межквартильного размаха – Me [25;

75]. Для определения достоверности различий парных сравнений применяли в группах номинальных данных – непараметрический критерий МакНемара; в группах порядковых данных – непараметрический критерий знаков Уилкоксона; в группах непрерывных данных – парный t-критерий (при нормальном распределении признака) или непараметрический критерий знаков Уилкоксона (при распределении, отличном от нормального). Для определения достоверности различий межгрупповых (независимых) сравнений применяли в группах номинальных данных – критерий Фишера; в группах порядковых данных – непараметрический U-критерий Манна-Уитни; в группах непрерывных данных – критерий Стьюдента (при нормальном распределении признака) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни (при распределении отличном от нормального).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Условия электроспиннинга 3Д-матрицков, приготовленных из различных смесей поликапролактона с человеческим сывороточным альбумином и растворителями

Известно, что ЧСА является основным белком плазмы (крови человека), который переносит паклитаксел, причем может формировать с ЧСА 2 типа комплексов с общей константой связывания $K = 1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [100]. При этом 3Д-матрицксы, изготовленные из ПКЛ с ЧСА методом электроспиннинга, экспонируют значительное количество прочно связанного с матрицксом ЧСА на поверхности волокон длительное время [60]. Такие матрицксы могут быть эффективно использованы для изготовления покрытий для металлических сосудистых стентов и доставки паклитаксела в сосудистую стенку.

Условия получения матрицков из ПКЛ с ЧСА, ПКЛ и ДМСО методом электроспиннинга, отработанные в результате предварительных экспериментов, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Условия электроспиннинга для изготовления исследуемых матрицков

Состав матрицка	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

3.2 Механические свойства изготовленных 3Д-матрикс

Механические свойства образцов 3Д-матрикс изучали, как описано в ГОСТ 51556-2000 при постоянной скорости приложения силы 10 мм/мин. Показано, что введение 10 % ЧСА в состав полимерных волокон матрикса значительно увеличивает эластичность матрикса по сравнению с чистым поликапролактоном. Показатель удлинения при введении ЧСА в состав покрытия увеличивается с 68 до 295 % (таблица 4, рисунок 7).

Таблица 4 – Механические свойства экспериментальных матрикс, $M \pm \sigma$

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

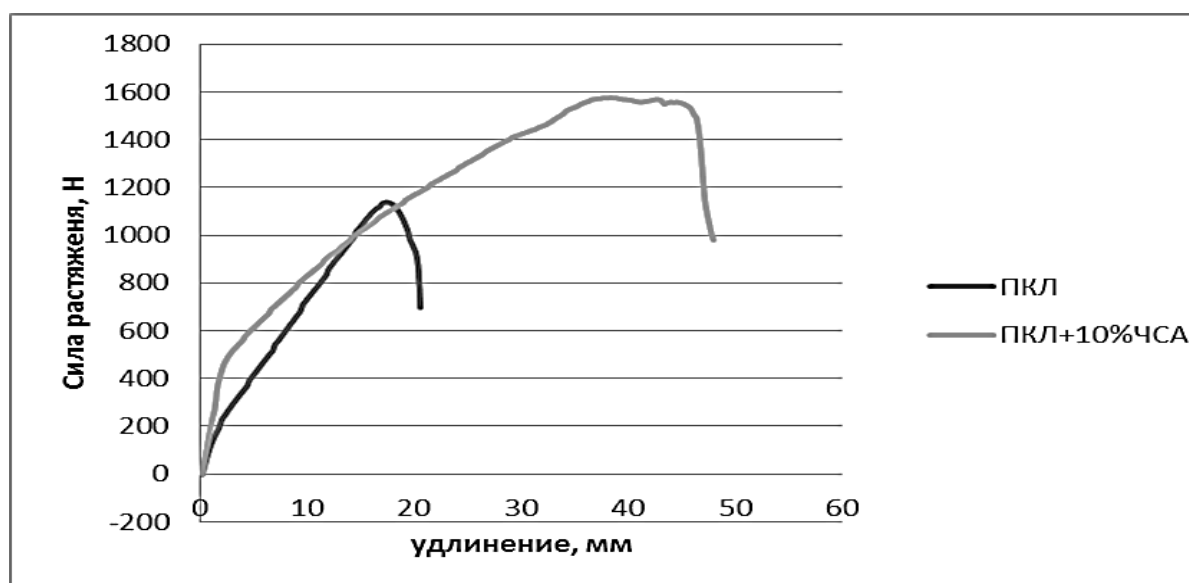


Рисунок 7 – Оценка прочности 3Д-матриц в зависимости от состава волокна

Прочность матриц на основе ПКЛ составляла от 3 до 5,1 МПа в зависимости от состава раствора для электроспиннинга. Для матриц, 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 матриц из ПКЛ без белка. После удлинения матриц с ЧСА вдвое остаточная нагрузка составляет от $1,4 \pm 0,16$ МПа до $0,35 \pm 0,07$ МПа в сухих матрицах и от $1,0 \pm 0,11$ до $0,26 \pm 0,24$ во влажных матрицах из ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА и ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 6 % ДМСО, соответственно. Прочность коронарных артерий составляет 1-2 МПа в зависимости от возраста донора и наличия атеросклеротического поражения [75]. Поскольку толщина стенки коронарных артерий составляет не менее 2-х мм [5], а толщина покрытия стента – 0,1-0,15 мм, то остаточная нагрузка в покрытии стента после его установки может составлять не более 5 % от нагрузки, обеспечиваемой сосудистой стенкой. В случаях, когда для изготовления покрытий металлических стентов используются матрицы, изготовленные из растворов ПКЛ с ЧСА и ДМСО, усилие на балки стента, оказываемое матрицами, будет составлять не более 1,5-2 % от оказываемого стенкой стентированной артерии.

Таким образом, покрытие стента не оказывает на балки стента существенной нагрузки после его установки в артерию и раскрытия балок стента.

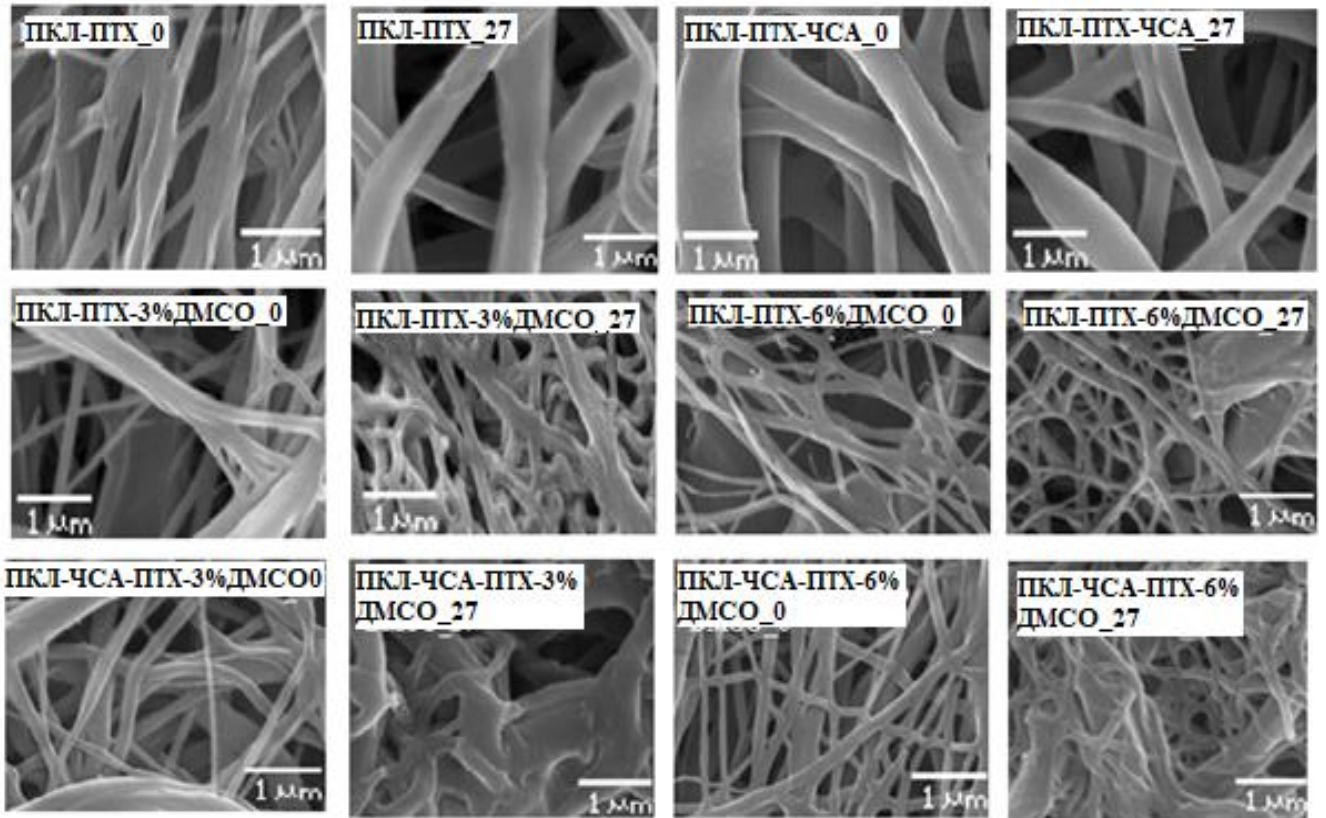
3.3 Синтез радиоактивно-меченного паклитаксела

Меченый тритием ПТХ был получен методом обмена термоактивированного трития, так как это описано ранее [77]. После очистки обращенно-фазовой хроматографией был получен препарат ^3H -ПТХ с удельной объемной радиоактивностью 1,5 mCi/ml или $\sim 0,3$ Ci/mM. По данным тонкослойной хроматографии препарат был гомогенен и давал одно пятно на радиоавтографе. Поскольку планировалось исследовать высвобождение паклитаксела не только в физраствор, но и в растворы с ЧСА, и плазму крови, были подобраны оптимальные условия определения радиоактивности образцов. Было обнаружено, что внесение в сцинтиллятор 1/10 объема образца не приводит к формированию осадка или помутнения раствора, а эффективность счета зависит от объема внесенного образца. В связи с этим радиоактивность проб всегда определяли единообразно, внося 0,1 мл образца в 1 мл раствора сцинтиллятора.

Молярную концентрацию паклитаксела определяли исходя из суммарной удельной активности препарата (^3H -ПТХ+ПТХ), вносимого в матрикс, которая составляла ~ 47000 cpm/nM.

3.4 Исследование микроструктуры поверхности матриксов

Микроструктура полученных матриксов была исследована с помощью СЭМ (рисунок 8).



0 – свежееизготовленный матрикс,

27 – матрикс, инкубированный с физраствором в течение 27 суток

Рисунок 8 – Микроструктура 3Д-матриков по данным сканирующей электронной микроскопии. Увеличение $\times 3000$

По данным СЭМ все полученные матриксы образованы микроволокнами, однако диаметр волокон зависит от состава раствора для электроспиннинга [9]. Матриксы из ПКЛ и ПКЛ с ЧСА состоят из волокон со средним диаметром 0,317 и 0,567 мкм, соответственно (таблица 5). Добавление ДМСО в раствор для электроспиннинга приводит в целом к уменьшению диаметра волокон, однако наблюдается гетерогенность в размере волокон. Диаметр волокон матриков из 5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО + ЧСА составляет $0,372 \pm 0,084$ мкм, что существенно выше, чем в других матриксах с добавлением ДМСО (от 0,135 до 0,194 мкм). Волокна всех матриков имеют гладкую поверхность, при увеличении $\times 3000$, которое позволяет уверенно детектировать структуры размером 20 нм. Не удалось обнаружить поры диаметром более 10-20 нм на поверхности волокон, хотя наблюдается небольшая шероховатость, вероятно обусловленная высыханием растворителя [47].

Таблица 5 – Физико-химические свойства исследуемых матриц, $M \pm m$

№	Образец	Диаметр волокон, μm	Диаметр пор, μm	Пористость, %/% *	Угол смачивания, град**	Влагопоглощение, %	Потеря массы, %
1	5 % ПКЛ + ПТХ	$0,317 \pm 0,043$	$5,72 \pm 2,42$	78/54,1	$127,33 \pm 1,30$	294 ± 7	0
2	5 % ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА	$0,567 \pm 0,091$	$2,66 \pm 1,21$	77/61,4	$88,89 \pm 3,03$	589 ± 16	0
3	5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО	$0,194 \pm 0,031$	$2,01 \pm 0,73$	78/65	$128,30 \pm 2,18$	400 ± 11	0
4	5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО	$0,135 \pm 0,017$	$0,97 \pm 0,32$	80/76,6	$132,35 \pm 3,11$	238 ± 9	0
5	5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО + ЧСА	$0,372 \pm 0,084$	$1,97 \pm 0,52$	77/71	$124,73 \pm 3,49$	750 ± 13	0
6	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 ± 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

Пористость поверхности волокон и размер пор зависит от условий электроспиннинга, таких как: растворитель, полимер, влажность, которые были исследованы в ряде работ [78, 32]. Было показано, что к формированию пор приводит испарение растворителя и охлаждение поверхности вновь

формируемого волокна, что приводит к конденсации паров воды или к термоиндуцированному фазовому распаду раствора полимера (Thermally Induced Phase Separation (TIPS)). Было обнаружено, что поры образуются только на поверхности полимера, в связи с чем был сделан вывод о том, что основным процессом, который приводит к формированию пор, является конденсация паров воды. Очевидно, что диффузия растворителей в полимерах, растворимость полимеров в растворителях, а также процессы фазовых переходов нескольких полимеров в составе одного растворителя могут играть важную роль в формировании структуры волокон и их поверхности. Формирование пор может приводить к значительному увеличению поверхности 3Д-матриков, изготовленных методом электроспиннинга до $\sim 100-1000 \text{ м}^2/\text{г}$ [32], что несомненно будет влиять на скорость и полноту высвобождения введенных в состав волокна лекарственных средств.

Следует отметить, что наличие в структуре волокон длинных и извитых (tortuous rather than straight) нанопор значительной длины часто постулируется [39], а их размер может зависеть, в том числе, и от системы растворителей, концентрации и растворимости белков в этих системах. В отличие от ГФИП, белок в таких системах растворителей как диметилформамид/дихлорметан или диметилформамид/хлороформ может существовать преимущественно в виде суспензии, что может существенно влиять как на структуру волокна, так и на его высвобождение из волокон. В нашем случае в качестве раствора для электроспиннинга используется истинный раствор полимера с белком и к описанию полученных матриков более подходит модель, предложенная в статье Chernonosova V.S. et al. [94]. В соответствии с этой моделью волокна матриков имеют переобогащенный белком поверхностный слой, в котором ЧСА прочно удерживается за счет контактов с нерастворимыми в воде молекулами поликапролактона, сохраняет свою структуру по данным КД-спектроскопии и может принимать участие в связывании низкомолекулярных молекул лекарств.

По данным СЭМ инкубация матриков в физрастворе в течение 27 суток практически не влияет на структуру матриков из чистого ПКЛ, ПКЛ с ЧСА, и

ПКЛ с 6 % ДМСО, что согласуется с данными, полученными ранее, где показано, что матриксы из ПКЛ стабильны в течение от 12 до 24 месяцев [38].

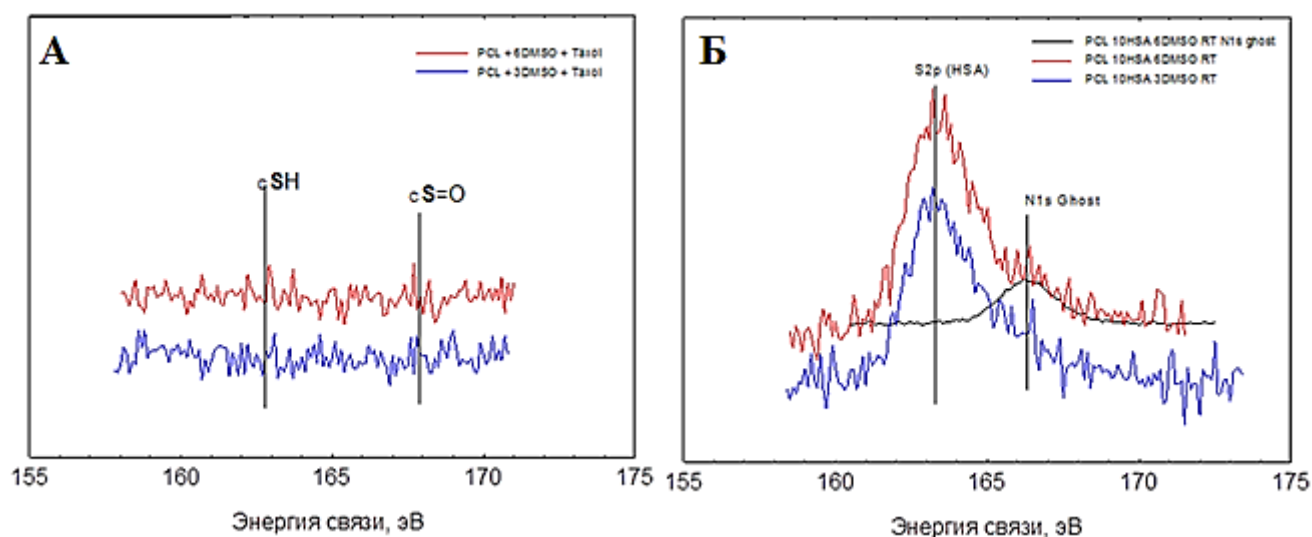
Обнаружено, что матриксы из ПКЛ с добавлением 3 % ДМСО и матриксы из ПКЛ с добавлением ЧСА и ДМСО сильно изменяют структуру в процессе длительной инкубации в растворах. Эти матриксы склонны к утолщению волокон, формированию множества контактов между волокнами, усадке, при этом матриксы с ЧСА больше изменяют свою структуру, чем матриксы без ЧСА. По-видимому, гидратация волокон, в процессе которой принимает участие интегрированный в волокна ЧСА, является причиной наблюдаемых изменений. Иными словами, молекулы ЧСА в составе волокна, даже если и не контактируют друг с другом, формируя внутреннюю сеть, локализованы так, что вода может диффундировать через поры, оставленные в ПКЛ высыхающим растворителем (ГФИП) и гидратировать ЧСА. После инкубации матриксы практически не изменяют вес, т.е. не наблюдается существенной деградации матриксов, однако изменение структуры волокон, их реорганизация и процесс гидратации ЧСА могут вносить существенный вклад в высвобождение ПТХ из матриксов.

3.5 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (исследование состава поверхности 3Д-матриксов)

Определение концентрационного распределения добавленных компонентов на поверхности матриксов было исследовано при помощи рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС).

Чтобы оценить остаточные количества ДМСО, который может влиять на кинетику высвобождения ПТХ, была использована РФЭС. Для оценки возможного содержания DMSO на поверхности образцов, был использован сигнал серы (S2p). Однако оказалось, что при использовании излучения MgK α линия S2p частично перекрывается с так называемой ghost-линией спектрального

района N1s от «паразитного» AlK α излучения мощностью $\sim 1\%$ от MgK α . Как видно из рисунка 9А, ghost-линия азота практически не накладывается на спектр органической (C–S–H) серы, входящей в состав белка, но полностью перекрывает диапазон энергий связи, характерный для сульфоксидных групп (C–S=O). Интенсивность паразитного сигнала пропорциональна содержанию азота на поверхности образцов и при малом относительном содержании азота (ПКЛ + ТХ + ДМСО) (формально, в составе образцов не должно быть азота вообще) вклад ghost-линии N1s азота пренебрежимо мал. В этих матриксах независимо от исходного содержания ДМСО и использованных обработок, на поверхности образцов полностью отсутствуют любые серосодержащие группы.



А – ПКЛ + ПТХ + ДМСО

Б – ПКЛ + ДМСО + ЧСА

Рисунок 9 – Спектры линии S2p для образцов

Для матриксов, содержащих ЧСА, спектроскопическая картина несколько сложнее (рисунок 9 Б). Отчетливо выражены S2p дублеты, соответствующие сере в составе белка, причем интенсивность пика с хорошей точностью совпадает с ожидаемой из стехиометрии ЧСА. Слабый пик с $E_{св} \sim 166$ эВ, судя по его интенсивности, отвечает ghost-линии N1s. Т.е. в этих образцах на поверхности также не наблюдается ДМСО. Таким образом, в процессе изготовления матриксов в их составе не остается ДМСО и высвобождение ПТХ не связано с диффузией ДМСО из матриксов.

Из таблицы 6 видно, что количество ЧСА в поверхностном слое немного уменьшается с ростом концентрации ДМСО, что может свидетельствовать в пользу механизма транспорта ЧСА током ГФИП в процессе высыхания волокна. Также, как и было обнаружено ранее, инкубация матриц в физрастворе приводит к реорганизации поверхностного слоя и увеличению концентрации ЧСА на поверхности матриц [20].

Таблица 6 – 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 [60]

По данным РФЭС концентрация ПТХ в поверхностном слое 3Д-матриц, изготовленных на основе ПКЛ, уменьшается с ростом концентрации ДМСО введенного в раствор для электроспиннинга. В поверхностном слое 3Д-матриц из 5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО детектируется только 3,7 % ПТХ в отличие от матриц из ПКЛ с ЧСА, на поверхности которых концентрация ПТХ составляет 21,1 %. Увеличение концентрации ПТХ на поверхности волокон, изготовленных методом электроспиннинга, было описано для матриц из ПКЛ растворенного в дихлорметане [12]. Авторы связывали этот процесс с высыханием растворителя в

процессе электроспиннинга и «движением» низкомолекулярного компонента к поверхности волокна с током растворителя.

Также, как и в случае с белком, инкубация матриксов с физиологическим раствором приводит к росту концентрации ПТХ в поверхностном слое, что особенно заметно в матриксах из 5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО (концентрация ПТХ увеличивается на 10 %). По-видимому, увлажнение матриксов приводит к реорганизации структуры поверхности волокон, а низкая растворимость ПТХ [38] приводит к его накоплению на поверхности матриксов.

Глубина анализа метода РФЭС составляет порядка 10 нм. При условии, что диаметр волокон в среднем составляет 1000 нм, объем этого слоя составляет 4 % от общего объема. Процентное содержание ПТХ в матриксах составляет не более 0,01 %, т.е. если весь ПТХ сконцентрировать в этом слое, то его концентрация не превысит 0,2 %, в то время как по данным РФЭС она составляет от 3,7 до 21 %. Однако если этот слой имеет толщину 1 нм (т.е. практически монослой ПТХ), то весовой баланс сходится. Т.е., по-видимому, значительная часть ПТХ сконцентрирована в тонком поверхностном слое волокон, который контактирует с внешней средой и высвобождение ПТХ в раствор происходит преимущественно из этого слоя.

Пористость матриксов, рассчитанная из объема матрикса и плотности полимерной композиции, варьирует в диапазоне от 77–80 % и не сильно отличается для матриксов, изготовленных из разных растворов. Пористость по данным СЭМ составляет от 54 до 76 %, размеры пор в матриксах варьируют от 5,7 до 0,97 мкм. Матрикса, изготовленные из растворов с ДМСО менее однородны не только по диаметру волокон, но и по размеру пор (см. таблицу 5, рисунок 8).

При высушивании матриксов не удалось детектировать потерю массы, хотя известно, что матриксы 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).

3.6 Определение дополнительных физико-химических характеристик матриксов

Влагопоглощение матриксов варьирует в диапазоне от 294 % у матриксов из чистого ПКЛ до 883 % у матриксов 5 % ПКЛ + ПТХ + 6 % ДМСО + ЧСА. В соответствии с оценкой, приведенной в статье Srikar R. et al. [39] на основании уравнения Washburn's (equation), время, необходимое для заполнения нанопор, составляет несколько микросекунд, т.е. отличия во влагопоглощении не могут быть связаны с неполной гидратацией матриксов. При этом влагопоглощение тем выше, чем ниже угол смачивания матриксов и чем более мелкими волокнами представлены эти матриксы. Кроме того, матриксы с ЧСА удерживают больше воды, что, вероятно, связано не только с тем, что они более гидрофильны, но и с формированием внутренней пористой структуры матриксов, за счет гидратации содержащегося в волокнах ЧСА.

Действительно, матриксы из поликапролактона без добавления ЧСА имеют гидрофобную поверхность, плохо смачиваются и теряют практически всю воду во время первого периода сушки (рисунок 10) [95].

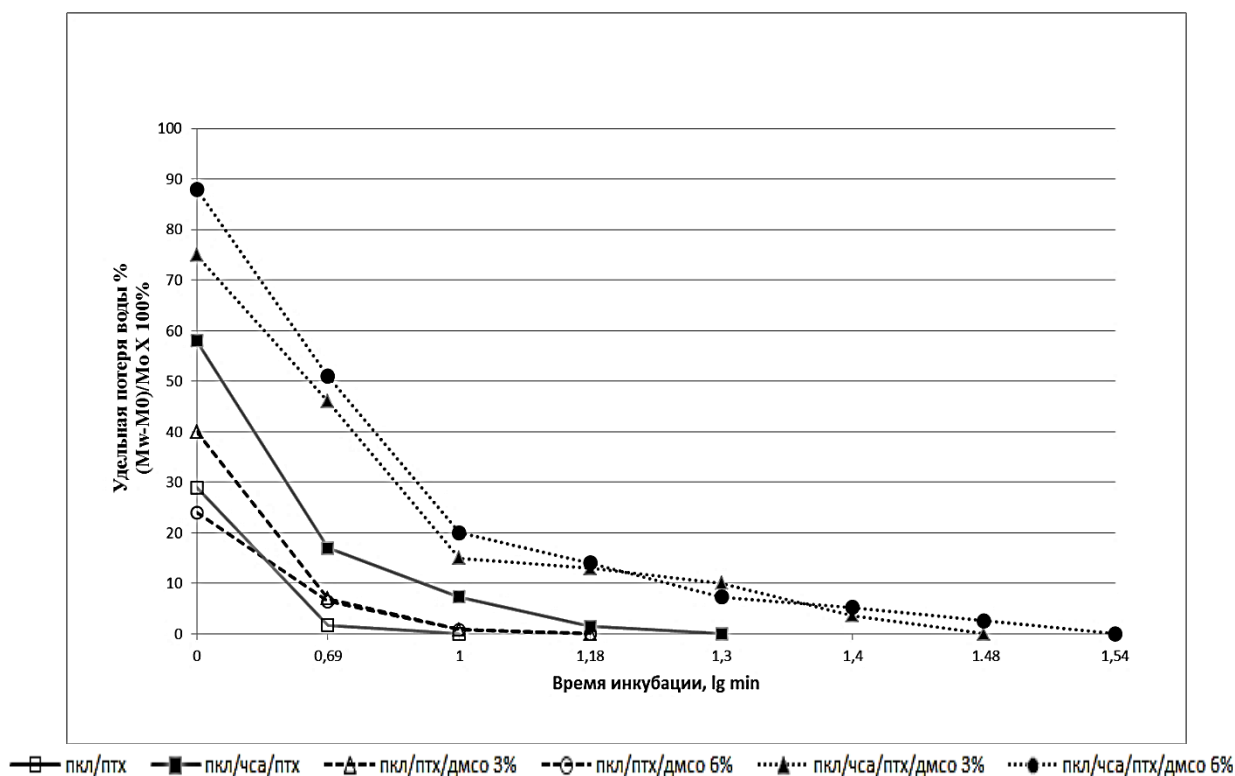


Рисунок 10 – Зависимость скорости высыхания от состава 3Д-матрикса

Второй период сушки у этих матриксов очень короткий, что может свидетельствовать о быстром транспорте воды из внутреннего объема матриксов и отсутствие взаимодействия воды с поверхностью матриксов.

Матрикс из ПКЛ с ЧСА имеет угол смачивания менее 90° , т.е. является гидрофильным. Учитывая то, что плотность ПКЛ $1,021 \text{ г/см}^3$, матрикс адсорбирует не менее 589 весовых процентов воды, однако быстро теряет воду во время первого периода сушки. Гидрофильная поверхность волокон лучше удерживает воду, что, по-видимому, и объясняет более длительный второй период сушки, характерный для таких матриксов.

Матриксы из ПКЛ с ЧСА и ДМСО более гидрофильны по сравнению с таковыми без ЧСА, связывают существенно больше воды. По-видимому, массоперенос воды в таких матриксах связан не только с заполнением пор с разным радиусом кривизны и возникающими при этом, в соответствии с законом Лапласа, перепадами гидростатического давления и перетоку жидкости в порах, но и взаимодействием воды с поверхностью волокон. Действительно, в процессе массопереноса могут принимать участие и поверхностно-диффузионные потоки, формирование пленок и возникновение расклинивающего давления, которое приводит к переносу жидкости в смачивающих пленках при отклонении их толщины от равновесной (т.е. поверхности с нарушениями ультраструктуры будут лучше заполняться) [95].

Матриксы с ЧСА и ДМСО имеют явно выраженный первый и второй периоды сушки, причем второй занимает длительное время и во время второго периода теряется значительное количество воды по сравнению с матриксами без ДМСО. В соответствии с вышеперечисленными соображениями, по-видимому, эти матриксы имеют в целом близкие характеристики микроструктуры, однако матрикс с 6 % ДМСО имеет меньший угол смачивания и может лучше заполняться водой. Действительно, эти матриксы более гетерогенны по диаметру волокон, состоят из более тонких волокон и имеют более разветвленную поверхность.

3.7 Исследование высвобождения паклитаксела из матриц

Известно, что гидрофильные матрицы менее склонны к сорбции белков [112], индукции воспаления и поэтому имеют преимущества перед гидрофобными при изготовлении имплантируемых изделий [65]. Добавление ЧСА в состав матриц уменьшает угол смачивания, гидрофилизуя матрицы и повышая их гемо- и биосовместимость [37, 96]. Добавление 3 или 6 % ДМСО в ПКЛ не приводит к существенному изменению угла смачивания, однако влияет на строение матриц, диаметр волокон, заполнение матриц водой и обеспечивает, таким образом, большую поверхность раздела фаз, что может быть использовано при разработке матриц для доставки лекарственных препаратов. Отличие в характере высушивания и двухфазный характер сушки матриц с ЧСА и ДМСО позволяют надеяться на то, что такие матрицы будут иметь двухфазный характер высвобождения, введенного ПТХ.

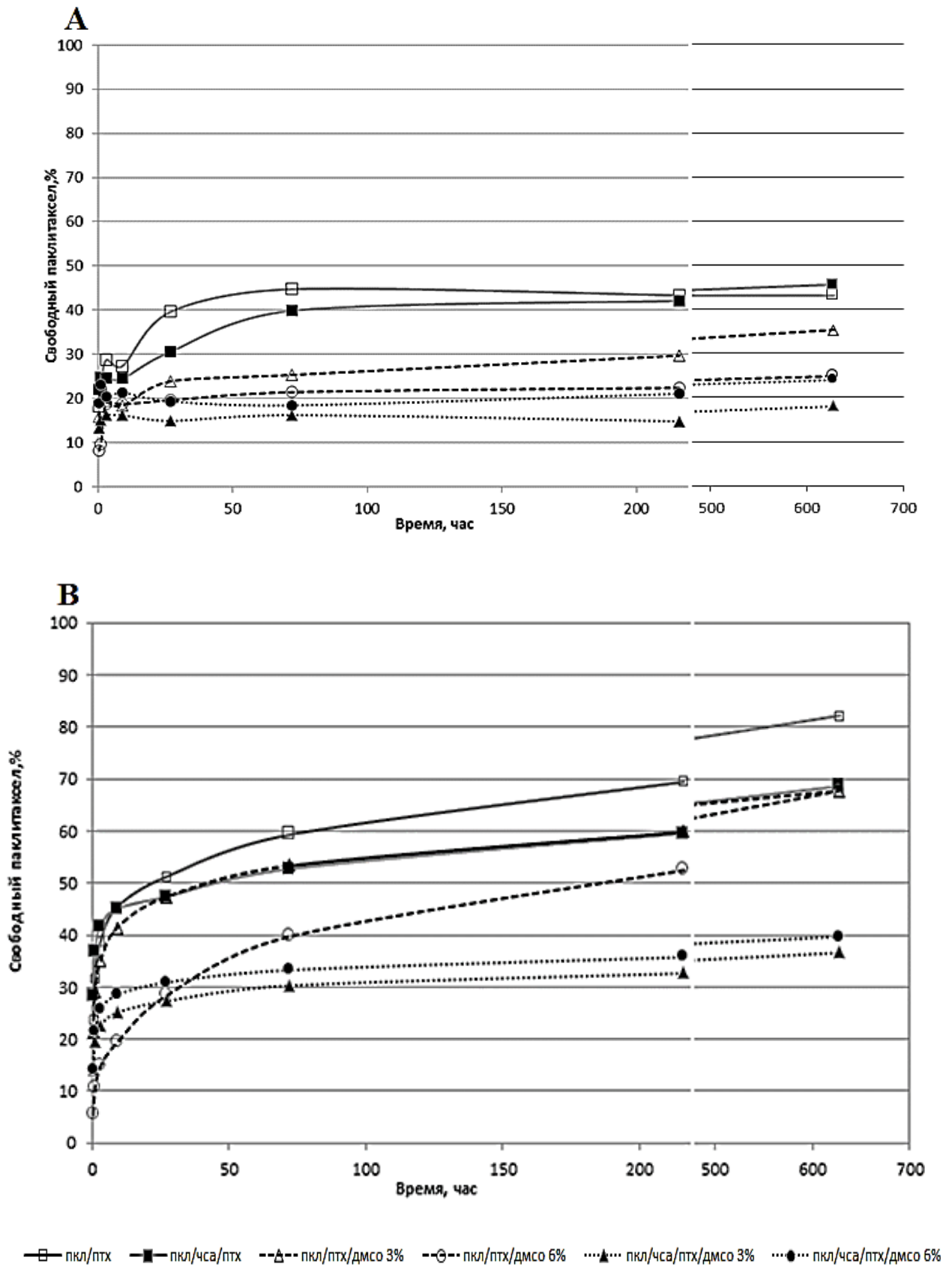
Как уже было отмечено в «материалах и методах», высвобождение ПТХ из матриц исследовали в условиях, когда матрицы инкубировали в одном и том же растворе (условие 1) или в условиях обмена среды, т.е. меняя раствор на свежий после каждой временной точки (условие 2), оценивая кумулятивное высвобождение ПТХ. Таким образом, мы попытались моделировать условия высвобождения ПТХ в кровотоке (обмениваемая среда) и в сосудистую стенку (не обмениваемая или медленно обмениваемая среда). Кинетические кривые, описывающие высвобождение ПТХ из матриц в зависимости от времени, типа матрикса и условий инкубации приведены на рисунках 11 и 12. Механизмы доставки лекарств из матриц – хорошо исследованная тема с разработанными математическими моделями, включающая несколько вариантов, таких как высвобождение, контролируемое диффузией, химическими, осмотическими или процессами набухания/растворения [97]. Высвобождение низкомолекулярных препаратов (Rhodamine 610) из матриц, изготовленных из поликапролактона методом электроспиннинга [39] и бычьего сывороточного альбумина из таких же матриц [76] было исследовано ранее. Было показано, что доставка родамина ограничена (desorbition-limited) диффузией родамина 610 из волокон, разработана

теоретическая модель и определены такие параметры как нанопористость (nanoporosity) и энтальпия десорбции (desorption enthalpy). В экспериментах, описанных другими авторами, было обнаружено, что высвобождение имеет насыщаемый характер и высвобождается часть вносимого компонента, которая зависит в конечном счете от структуры пор волокон. Надо отметить, что способный высвободиться родамин диффундировал из волокон в течение первых 2–4 суток, а матриксы, имеющие такой характер высвобождения лекарств, малопригодны для изготовления покрытий стентов. Кроме того, авторам не надо было решать задачу получения био- и гемосовместимых матриксов, поэтому они исследовали высвобождение родамина и белка исключительно из синтетических полимеров [61, 94, 107].

Характер высвобождения ПТХ из матриксов 5 % ПКЛ + ПТХ и 5 % ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА в физраствор был очень похож на описанный ранее Pisani S. et al. [38] с временем насыщения 3-е суток. Однако, по-видимому, в связи с низкой растворимостью ПТХ (растворимость таксола в воде не более 0,3 микрограмма/мл, или 0,3 мг/литр или $0,35 \times 10^{-5}$ М ($3,5 \times 10^{-6}$ М или 3,5 микромоля) при инкубации с заменой среды ПТХ высвобождался из волокон и после 3-суток инкубации вплоть до 27 суток, причем в сумме высвобождалось в 2 раза больше ПТХ, чем при инкубации матриксов без смены среды (рисунок 11 А).

При формировании матрикса происходит распределение ПТХ как в объеме матрикса, так и на его поверхности: $ПТХ_{общ} = ПТХ_{объем} + ПТХ_{поверхн.}$. Можно предположить, что в условиях без смены среды в течение первых трех суток устанавливается равновесие между ПТХ, сорбированным на поверхности матрикса и ПТХ в растворе. В связи с низкой растворимостью ПТХ в водных растворах скорость установления этого равновесия ограничивается скоростью десорбции ПТХ с поверхности матрикса. В случае смены среды происходит удаление растворенной формы ПТХ, что вызывает дополнительную десорбцию ПТХ с поверхности в раствор, таким образом, увеличивая суммарный выход ПТХ в растворенную форму. Кроме того, в случае матрикса, содержащего ЧСА, к процессам сорбции/десорбции ПТХ на поверхности матрикса добавляется процесс связывания ПТХ с молекулой ЧСА ($K_a = 1,43 \times 10^4$ М⁻¹ [100]), который

приводит к дополнительному удерживанию ПТХ как в матриксе, так и на его поверхности.



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

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

Рисунок 11 – Зависимость высвобождения ПТХ от времени инкубации и состава внешней среды

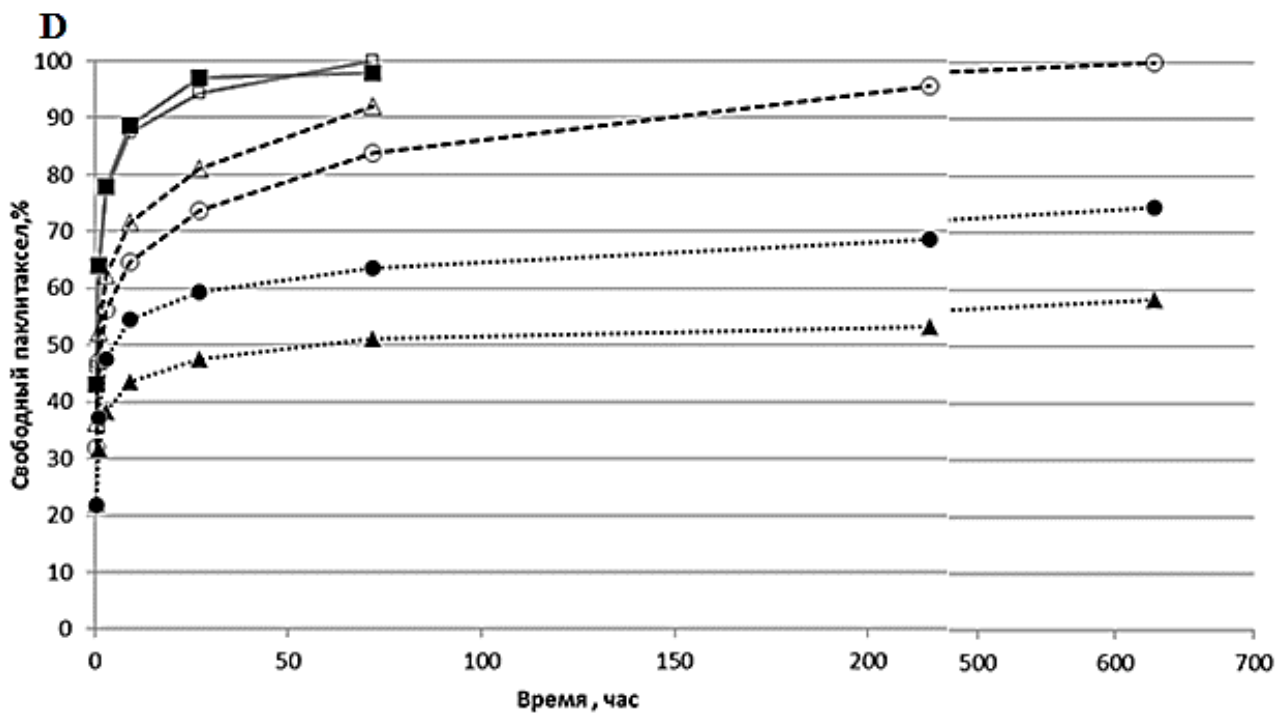
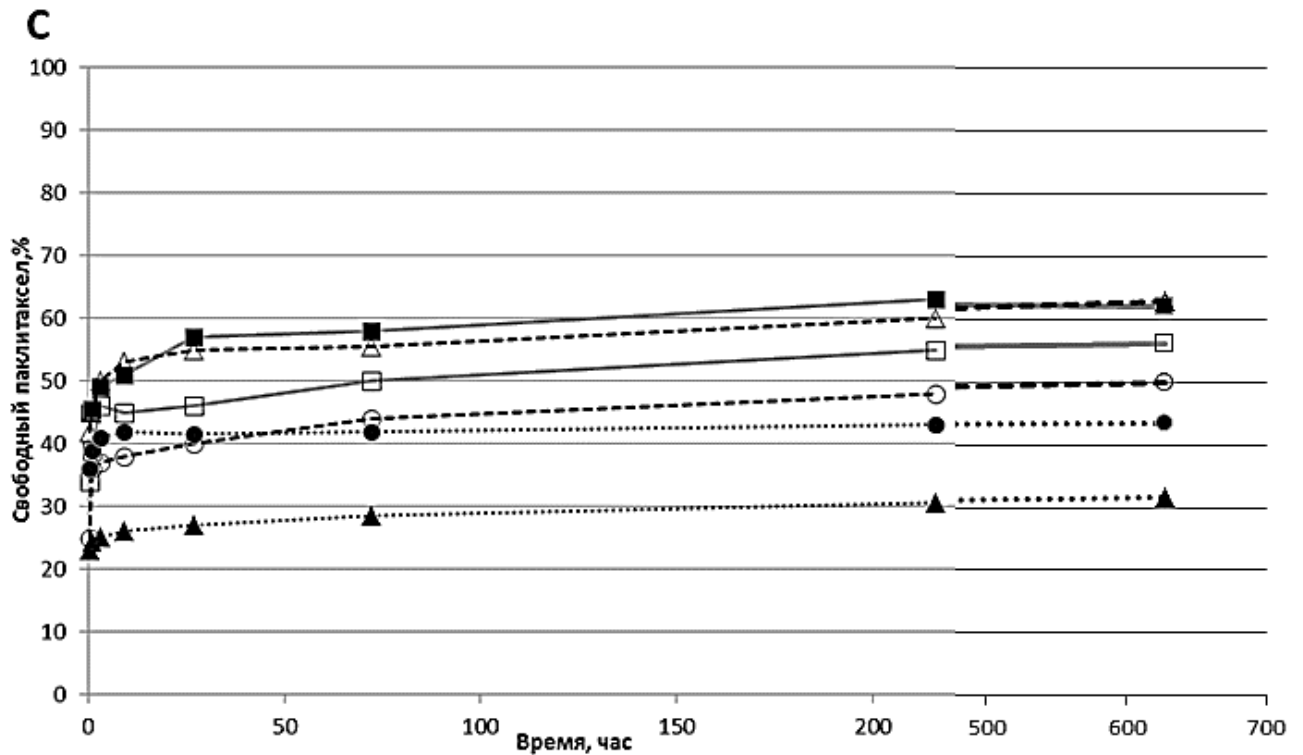
При инкубации этих же матриксов с плазмой характер высвобождения не изменялся, однако насыщение наступало позже (5–7 сутки) (рисунок 12D) и, при этом, высвобождалось не 45 %, а 55–60 % ПТХ. При инкубации с заменой плазмы (условия 2) уже через трое суток из матриксов высвобождался весь ПТХ (рисунок 12С). Очевидно, что ЧСА, концентрация которого в плазме составляет ~1 мМ, связывает ПТХ в растворе, что приводит к блокированию обратной сорбции ПТХ на поверхность матрикса. Концентрацию ПТХ, связанного с ЧСА, можно оценить, принимая во внимание, что концентрация ЧСА в сыворотке ~1 мМ, а концентрация ПТХ, при условии 50 % высвобождения из матрикса примерно равна 0,82 мкМ (молярный вес ПТХ 854, в матриксе 0,36 мкг, объем раствора 250 мкл). С учетом значения константы ассоциации $K_a = 1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и уравнений материального баланса концентрация комплекса ЧСА-ПТХ равна 0,77 мкМ. Таким образом, 94 % освобожденного из матрикса ПТХ в данных условиях находится в растворе в виде комплекса с ЧСА. Вполне вероятно, что в этом процессе могут принимать участие и другие биомолекулы плазмы, такие как липиды, которые могут взаимодействовать с жирорастворимым ПТХ на поверхности, а может быть даже и диффундируя внутрь матрикса. Поскольку инкубация с заменой плазмы приводит к увеличению выхода ПТХ из матрикса практически до 100 % в течение трех суток, полученные данные свидетельствуют о том, что скорость диффузии ПТХ в объеме матрикса не лимитирует скорость выхода ПТХ из матрикса в раствор. Следует отметить, что структура волокон 3Д-матрикса не изменяется при высвобождении ПТХ в раствор (см. рисунок 8).

Исходя из приведенных данных видно, что матриксы 5 % ПКЛ + ПТХ и 5 % ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА не могут быть использованы для пролонгированной доставки препарата, поскольку не имеют двухфазной кинетики высвобождения ПТХ и быстро высвобождают ПТХ при контакте с плазмой.

Для того, чтобы получить 3Д-матриксы, длительно высвобождающие ПТХ необходимо изменить распределение ПТХ в волокнах или структуре волокон. Для того чтобы «удержать» ПТХ в составе волокна в процессе высыхания растворителя и/или 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). Casper Ch. L. et al. [32], теоретически определившие фактор нанопористости матриц, также использовали похожую систему растворителей для электроспиннинга – диметилформамид ($T_{пл} = 153$ °С) в смеси с дихлорметаном ($T_{пл} = 40$ °С). Оказалось, что добавление в раствор для электроспиннинга ДМСО существенно влияет на высвобождение ПТХ в физраствор, а именно: уменьшает общее количество высвобожденного ПТХ (до 25–35 %) в условиях 1 (рисунок 11А), несколько замедляет высвобождение ПТХ из матрикса с 6 % ДМСО и практически не уменьшает суммарное количество высвобожденного в условиях 2 ПТХ (рисунок 11В). Эти данные свидетельствуют об уменьшении концентрации ПТХ, сорбированного на поверхности матрикса, полученного при добавлении ДМСО (см. таблицу 6, строка 4). При этом, как в предыдущих случаях, скорость диффузии ПТХ из объема матрикса к поверхности не лимитирует скорость перехода ПТХ в раствор, что видно и из таблицы 6 (строка 5), так как не изменяется суммарный выход ПТХ в условиях 2.

Что касается высвобождения ПТХ в плазму, то добавление 6 % ДМСО несколько замедляет высвобождение ПТХ в условиях замены плазмы (условия 2) (рисунок 12D), но практически не влияет на высвобождение ПТХ из матриц в условиях 1 (рисунок 12С). Следует отметить, что матрицы, изготовленные из растворов с ДМСО, имеют более тонкие волокна. Матрицы, изготовленные из растворов с 6 % ДМСО, имеют более гидрофобную поверхность, по сравнению с матрицами, изготовленными из растворов с 3 % ДМСО, более низкое влагопоглощение и экспонируют на поверхности изначально меньше ПТХ по данным РФЭС. Матрицы, изготовленные из растворов с ДМСО и ЧСА, отличаются медленным высвобождением ПТХ. Действительно, из матриц, изготовленных из раствора 5 % ПКЛ + ПТХ + 3 % ДМСО + 10% ЧСА за 28 суток в плазму высвобождается ~30 % исходного ПТХ, а в условиях обмениваемой плазмы менее 60 %. При этом количество высвобождаемого в сутки ПТХ из этого матрикса уменьшается от ~45 % в условиях 2 и ~25 % в условиях 1 до ~0,26 % в условиях 2 ~0,05 % условиях 1 (см. таблицу 5). Полученные данные свидетельствуют о суммарном эффекте ДМСО, изменяющего структуру матрикса



□ пкл/птх ■ пкл/чса/птх ▴ пкл/птх/дмсо 3% ○ пкл/птх/дмсо 6% ▲ пкл/чса/птх/дмсо 3% ● пкл/чса/птх/дмсо 6%

и распределение в нем ПТХ и ЧСА (см. таблицы 5 и 6), связывающего ПТХ как в объеме, так и на поверхности матрикса.

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

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

Рисунок 12 – Зависимость высвобождения ПТХ от времени инкубации и состава внешней среды

Таким образом, выбор компонентов матрикса и условий его получения оказывает существенное влияние на скорость выхода ПТХ в раствор. Показано, что скорость-лимитирующей стадией перехода ПТХ в раствор является десорбция с поверхности матрикса. При удалении растворенной формы ПТХ, как за счет смены буфера, так и за счет ЧСА в плазме крови, связывающего ПТХ в растворе и препятствующего его обратной сорбции на поверхности матрикса, происходит быстрая диффузия ПТХ в объеме матрикса, которая приводит к практически 100 % выходу ПТХ из матрикса. Полученные данные показывают, что увеличение гидрофобности матрикса в присутствии ДМСО приводит к замедлению десорбции ПТХ с поверхности. Кроме того, ЧСА в составе такого гидрофобного матрикса оказывает более выраженный удерживающий эффект на процесс выхода ПТХ в раствор. Матрикс, полученные в присутствии ДМСО и ЧСА, имеют выраженную двухфазную кинетику перехода ПТХ в раствор. При этом первая фаза быстрого высвобождения ПТХ обусловлена его десорбцией с поверхности и, в случае гидрофобного матрикса, проходит менее неэффективно. Вторая фаза медленного освобождения ПТХ, по-видимому, связана с его взаимодействием с ЧСА в гидрофобном матриксе [40].

Ранее было показано, что только часть родамина высвобождается в водный раствор из волокон, изготовленных методом электроспиннинга из раствора ПКЛ в диметилформамиде/дихлорметане, а часть родамина, локализованного в составе твердой полимерной фазы, не высвобождается [39]. Полученные нами данные демонстрируют, что весь ПТХ может полностью диффундировать из матриксов (ПКЛ, ПКЛ с ЧСА, ПКЛ с ДМСО), изготовленных из растворов ПКЛ в ГФИП (с или без ДМСО), при инкубации матриксов с человеческой плазмой. Как видно из данных РФЭС на поверхности матриксов экспонировано значительное количество ПТХ, причем инкубация матриксов с водными растворами приводит как к высвобождению ПТХ, так и к реорганизации поверхностного слоя и даже к

повышению концентрации ПТХ на поверхности матриксов (см. таблицу б). По-видимому, строение волокон, полученных из раствора в ГФИП, химические свойства ПТХ позволяют ему перераспределяться в составе таких волокон. Вполне вероятно, что белки и липиды плазмы крови так же вносят свой вклад в высвобождение ПТХ. В любом случае матриксы, из которых ПТХ диффундирует полностью, оптимальны для его доставки [43].

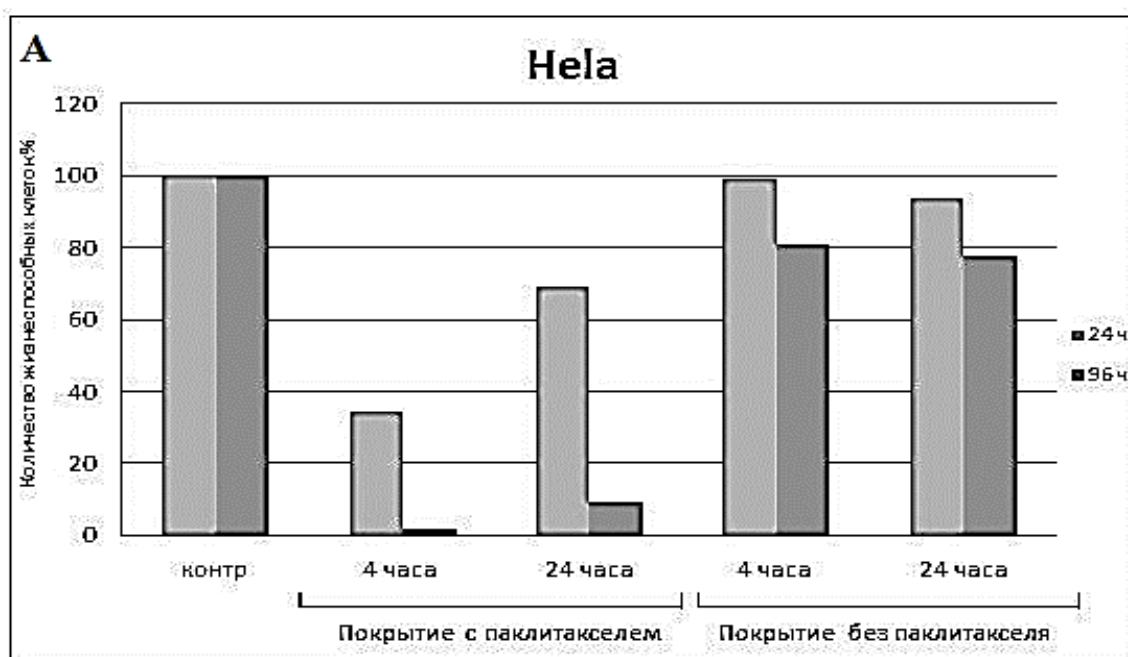
Удлинение матриксов в 2 раза не влияет на высвобождение из его структуры ПТХ, т.е. характер и количество высвобожденного на единицу веса матрикса ПТХ остается неизменным. Однако поскольку область эластической деформации используемых матриксов не превышает 7–10 %, то при их удлинении в 2 раза наблюдается пластическая деформация матриксов с увеличением линейных размеров после снятия нагрузки (125–185 %). Количество ПТХ, высвобожденного из таких матриксов в пересчете на единицу площади, пропорционально ниже по сравнению с недеформированными матриксами, что необходимо учитывать при планировании дозы цитостатика в покрытии стента.

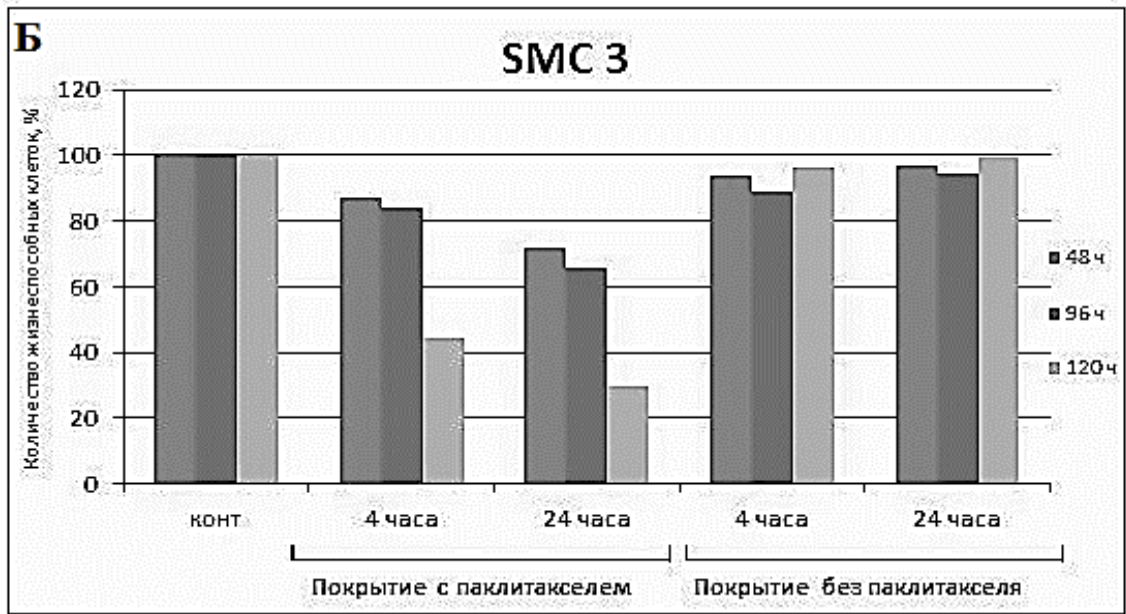
Характер высвобождения ПТХ из матриксов, изготовленных из растворов с ДМСО и ЧСА, позволяет использовать эти конструкции для изготовления покрытий сосудистых стентов с целью предотвращения пролиферации клеток сосудистой стенки. Действительно, при периваскулярной доставке ПТХ в условиях внутреннего давления (и концентрации ПТХ от 20 до 230 мкМ) он эффективно накапливается в стенках артерий, локализуясь преимущественно в области адвентиции [35]. Коэффициент диффузии для ПТХ по данным разных авторов составляет от $1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ до $4,87 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [116]. Интересно отметить, что коэффициент диффузии для ЧСА (который, как мы знаем, является основным транспортером ПТХ) в стенку аорты, определенный без учета потенциального связывания ЧСА в адвентиции составляет $1,06 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ [19, 53] и альбумин задерживается в области локализации эластиновых волокон в гладкомышечном слое адвентиции [45]. Кроме того, было обнаружено, что эластин сам по себе связывает ПТХ и может способствовать его задержке в

артериальной стенке [92]. Накопление ПТХ в этом слое, по-видимому, может быть обусловлено как со связыванием ПТХ с ЧСА, так и его связыванием с эластином. Токсичная концентрация ПТХ против гладкомышечных миоцитов составляет ~ 10 нМ [92]. При эндоваскулярной концентрации ПТХ 1 мкМ время удержания ПТХ в стенке должно составлять не менее 10 суток. Т.е. при условии, что матрикс содержит $0,46$ мкг/мм² 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 голометаллического стента, изготовленное методом электроспиннинга из раствора ПКЛ + ЧСА + ПТХ + ДМСО и содержащее $0,46$ мкг/мм² ПТХ, может проявлять токсичное действие против миоцитов сосудистой стенки не менее, чем в течение 3-х месяцев. При этом 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. Кроме того, данные о полном высвобождении ПТХ из матриксов, изготовленных из растворов ПКЛ в ГФИП, позволяют надеяться на еще более протяженное во времени высвобождение ПТХ из волокон. Необходимо также отметить, что изменение структуры матриксов в процессе инкубации, их усадка, агрегация волокон, т.е. уменьшение поверхности раздела фаз, могут позитивно сказываться на удлинении кинетики высвобождения ПТХ из волокон и пролонгировании цитостатического действия введенных в такие матриксы препаратов.

3.8 Оценка цитотоксического действия паклитаксела, высвобождаемого из лекарственно-наполненного покрытия, на клетки человека с помощью метилтетразолиевого теста

Для исследования цитотоксического эффекта паклитаксела, мы использовали клеточную линию цервикальной аденокарциномы человека Hela и первичные гладкомышечные клетки из стенки аорты. Исследуемые матриксы содержали 0,46 мкг/мм² ПТХ. Тест на цитотоксичность показал, что 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 паклитаксела, практически не влияет на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток (рисунок 13).





А – клетки линии HeLa

Б – первичные гладкомышечные клетки

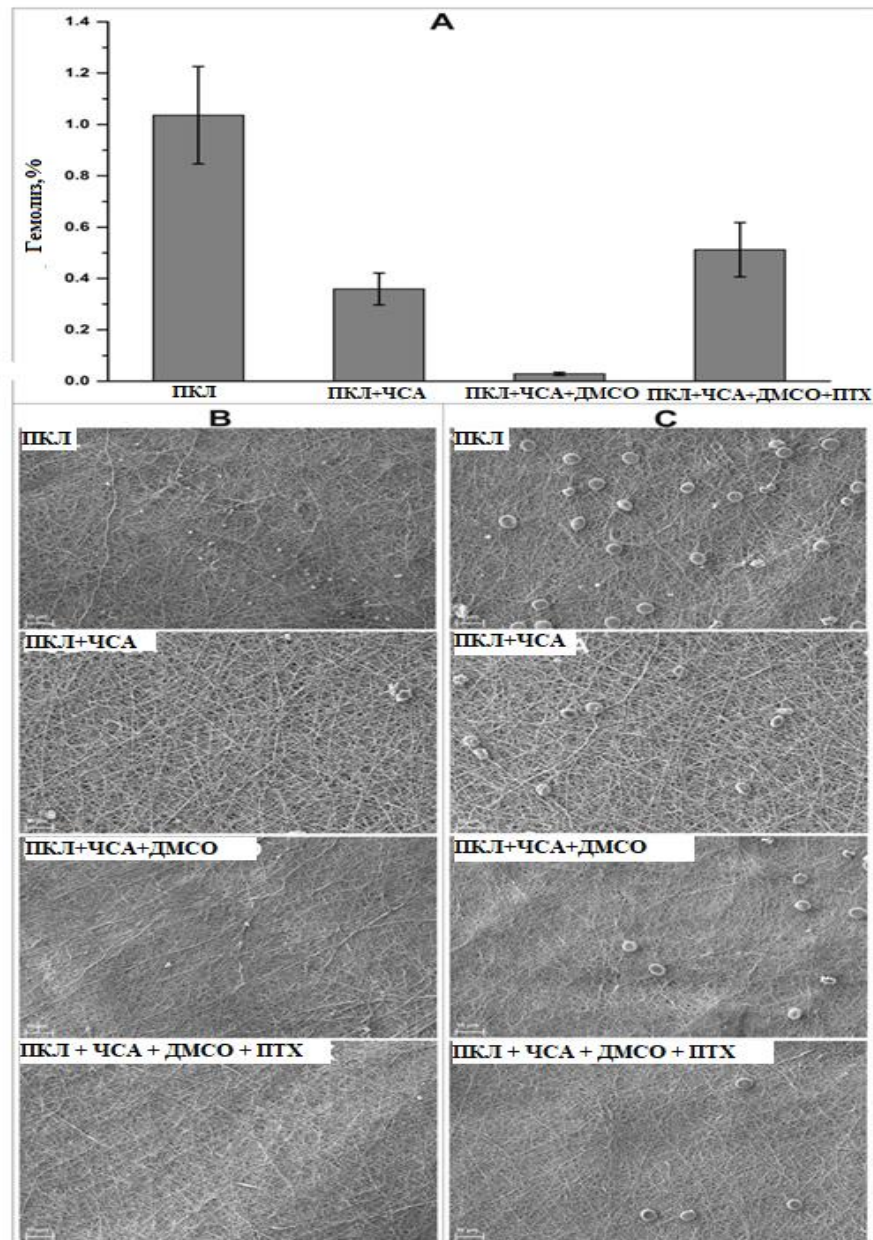
Рисунок 13 – Цитотоксическое действие паклитакселя на трансформированные и первичные гладкомышечные клетки человека

На рисунке показана зависимость количества жизнеспособных клеток от времени их инкубации со средой, прединкубированной с лекарственным покрытием.

Количество жизнеспособных клеток аденокарциномы уже через 24 часа инкубации со средой, содержащей паклитаксел, в среднем снижается до 50 %, тогда как процент жизнеспособных гладкомышечных клеток через 48 часов уменьшается лишь до 70–80 %, постепенно снижаясь до 30–40 % к 120 часам инкубации. Полученные результаты согласуются с разной пролиферативной активностью этих клеточных линий и действие цитостатика на активно делящиеся трансформированные клетки проявляется быстрее. По данным кинетики выхода паклитакселя, упакованного в матрикс, во временном промежутке от 4 до 24 часов порядка 10–20 % высвобождается в среду. Таким образом, в целом токсичность ПТХ против клеток HeLa совпадает с литературными данными. При этом ПТХ менее токсичен в отношении медленно делящихся ГМК.

3.9 Исследование гемосовместимости матриц

Ранее было показано, что 3Д-матрицы, изготовленные методом электроспиннинга из ПКЛ с ЧСА, обладают неплохой гемо- и биосовместимостью [2, 60]. Инкубация матриц с плазмой, богатой тромбоцитами или цитратной кровью, показала, что адгезия клеток зависит от химического состава волокон. Минимальное количество прикрепившихся клеток наблюдалось на 3Д-матрице из ПКЛ + ПТХ + 10 % ЧСА + 6 % ДМСО по сравнению с контрольными матрицами (рисунок 14, В и С).



А – скорость гемолиза, индуцированного различными матрицами;

- В – СЭМ-изображения поверхности матрицков после инкубации с плазмой, богатой тромбоцитами
 С – СЭМ-изображения поверхности матрицков после инкубации с цитратной кровью

Рисунок 14 – Гемосовместимость покрытия стента и контрольных матрицков. Увеличение $\times 2000$

Результаты теста на гемолиз показали, что 3Д-матрикс из ПКЛ + 10 % ЧСА + 3 % ДМСО практически не вызывает гемолиза (рисунок 14А), с его поверхностью практически не связываются тромбоциты и остальные форменные элементы крови, и, поэтому он оптимален для изготовления внутреннего слоя покрытия стента.

3.10 Особенности изготовления стента с «непрерывным» лекарственным покрытием и оценка возможностей его дистанционной доставки при помощи стандартных проводников и катетеров

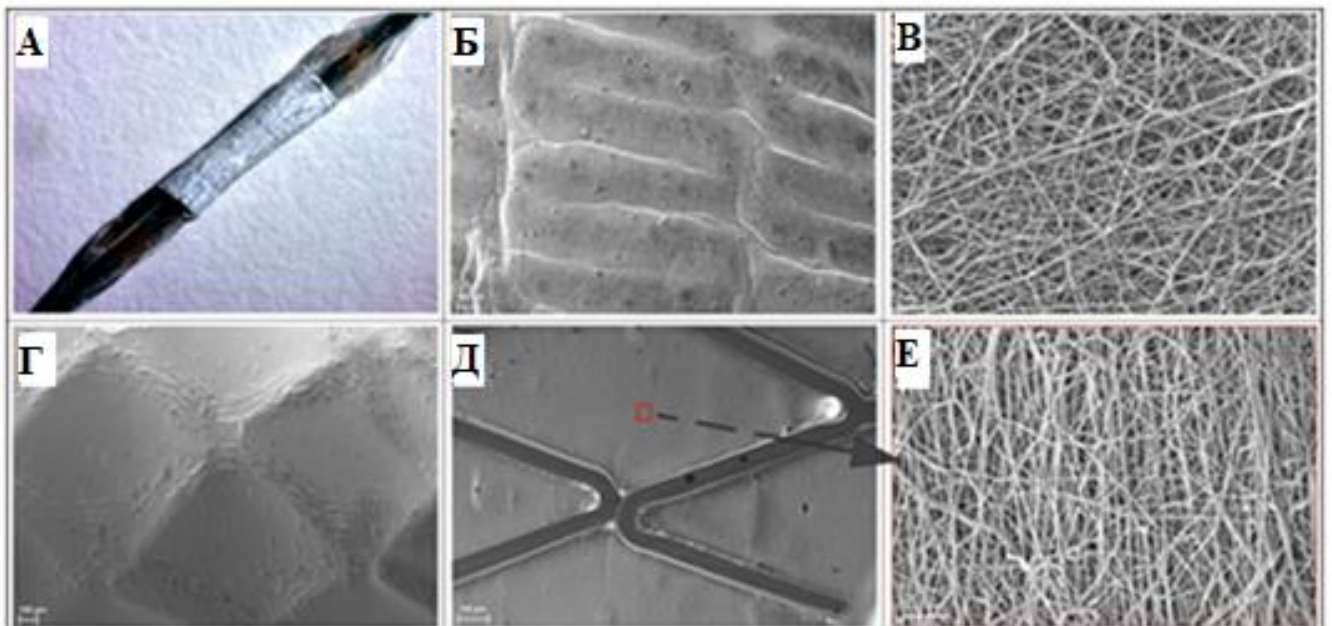
Полностью покрытые стенты, были изготовлены в соответствии с методикой, изложенной в п. 2.11. Макроскопическая оценка качества изготовленных стентов с лекарственно-наполненным покрытием показала плотное и устойчивое прилегание покрытия к «балкам» стента.

Стент с покрытием плотно фиксировали на баллон-катетере после снятия с электрода (рисунок 15А), при этом небольшое увеличение его диаметра (для установки на баллон) и последующее уплотнение на баллоне приводило к незначительным деформациям покрытия, что выражалось в образовании небольших складок на поверхности стента (рисунок 15Б). Специальная обработка краев покрытия и введение в структуру стента белка способствовали «сшиванию» волокон друг с другом и, как следствие, предотвращало разлохмачивание краев и разволокнение структуры матрикса. При контакте изготовленного стента с кровью не отмечалось «набухание» и увеличение диаметра покрытия.

Для оценки возможности проведения стента через стандартные системы доставки нами были проведены ряд исследований.

Прежде всего, после фиксации покрытия на металлической конструкции нами была исследована возможность его проведения через проводниковые катетеры диаметром 5 Fr. При этом при «искусственном» создании пологих внешних и внутренних углов от 90 до 120 градусов эффекта «заклинивания» стента при продвижении на монорельсовой системе доставки не наблюдали. Следующим этапом провели серию из 5 экспериментов после предварительного «замачивания», изготовленного стента в крови экспериментального животного. При аналогичных условиях также не обнаружено «заклинивания» или 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 наблюдали небольшую деформацию, которая не влияла на ориентацию волокон матрикса (рисунок 15 Б, В). Расширение стента привело к деформации покрытия, сопровождающегося выравниванием волокон и небольшим вдавливанием покрытия внутрь между стойками стента (рисунок 15 Г, Д). Следует отметить, что складки материала на поверхности балок, очевидно, были связаны с небольшой «обратной» деформацией стента после его расширения (рисунок 15 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 15 – Стент с покрытием, изготовлен методом электроспиннинга.

Микроскоп SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия)

3.11 Экспериментальная часть *in vivo*

3.11.1 Интраоперационные показатели

Имплантация экспериментальных стентов была выполнена 36 кроликам (все самцы) (таблица 7).

Для двух типов стентов, изготовленных в рамках исследования, были сформированы две группы наблюдения. Первой группе животных имплантировали голометаллические стенты 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.

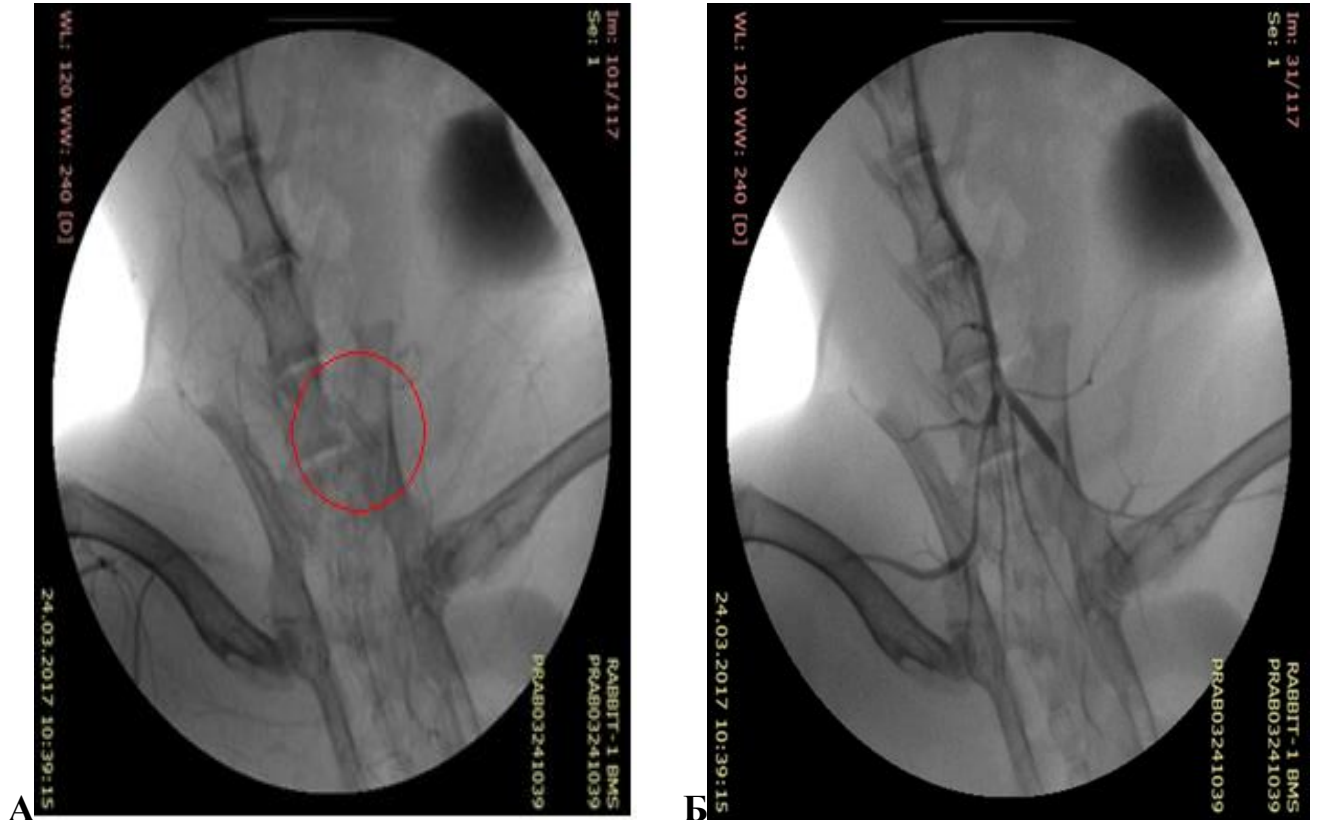
Таблица 7 – Сравнительные характеристики исследуемых животных и стентов, $M \pm \sigma$

Показатель	1 группа (18 кроликов)	2 группа (18 кроликов)	p
Масса животного, кг	$4,5 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,2$	$p > 0,05$
Возраст животного, мес.	$9 \pm 0,2$	$9 \pm 0,2$	$p > 0,05$
Время операции, мин.	64 ± 5	62 ± 5	$p > 0,05$
Время флюороскопии, мин.	12 ± 2	12 ± 1	$p > 0,05$
Время гемостаза п/о раны, мин.	$1 \pm 0,2$	$1 \pm 0,1$	$p > 0,05$
Давление в шприце-манометре, атмосфера	$9 \pm 0,3$	$9 \pm 0,4$	$p > 0,05$
Диаметр стента, мм	$3,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,5$	$p > 0,05$
Длина стента, мм	25 ± 5	25 ± 5	$p > 0,05$

Проведение стента через интродьюсер не сопровождалось подворачиванием краев покрытия или дислокацией стента на баллоне. Не наблюдались изменения

позиции стента на баллоне и в процессе установки стента в стентированный участок сосудистого русла. Все устройства были имплантированы в общую подвздошную артерию, при имплантации никаких трудностей не возникало.

Во всех случаях при контрольной ангиографии было отмечено, что стент плотно прилегает к сосудистой стенке, среднее давление инфузии составило 9,5 МПа. Миграций, поломок стента также не было. На рисунке 16 представлен интраоперационный вид стента.



А – стент имплантирован

Б – ангиографический контроль

Рисунок 16 – Интраоперационный вид стента с лекарственно-наполненным покрытием. С-дуга Philips BV Pulsera

3.11.2 Технический успех процедуры стентирования

В нашем исследовании проводили сравнительную оценку голометаллического стента (фабричного производства) и экспериментального

стента с покрытием, система доставки в обоих случаях осуществлялась на катетер-баллоне (фабричного производства), раздувание стентов штатным шприцом – манометром.

В качестве сосудистого доступа была выбрана правая общая сонная артерия, ввиду анатомических особенностей данной группы животных, а именно, отхождения ветвей дуги аорты (от брахиоцефального ствола отходят обе общие сонные артерии, и левая общая сонная артерия имеет больший угол изгиба).

Технический успех процедуры оценивали по следующим параметрам (таблица 8).

Таблица 8 – Показатели успеха оценки имплантации

Показатели процедуры имплантации	Голометаллический стент (n =18)	Стент с лекарственным покрытием (n =18)
Установка интродьюсера, n (%)	18 (100)	18 (100)
Катетеризации целевой артерий, n (%)	18 (100)	18 (100)
Дислокация стента на системе доставки	0 (0)	0 (0)
Повреждение сонной артерии	0 (0)	0 (0)
Тромбоз артерии доступа	0 (0)	0 (0)
Развертывание стента в целевой артерии, n (%)	18 (100)	18 (100)
Давления в шприц-манометре, Мпа	9,5	9,6
Перфорация зоны установленного стента, n (%)	0 (0)	0 (0)
Диссекция артерии в зоне установленного стента, n (%)	0 (0)	0 (0)
Интраоперационный тромбоз зоны имплантации, n (%)	0 (0)	0 (0)

При анализе данных ангиографии было установлено, что покрытие стента распределено равномерно, края стента плотно прилегают к поверхности катетер-баллона. Ни в одном случае не было отмечено подворачивания краев стента, сползания стента с катетер-баллона при продвижении его через систему доставки (интродьюсер, проводниковый катетер).

При проведении катетер-баллона со стентом в терминальный отдел аорты система доставки проходила через сосуды доступа, образуя при этом значительные углы (выход общей сонной артерии в дугу аорты, а также от дуги аорты до терминального отдела аорты). В процессе установки предложенная конструкция свободно продвигалась по проводнику, без задержек на внешних и внутренних изгибах от 0 до 180 градусов. Покрытые стенты не диспозиционировались на баллоне, края покрытия не разволокнулись, а само покрытие не отслаивалось от стента при продвижении покрытого стента в системе доставки и по сосудистому руслу.

3.11.3 Проходимость стентов

После имплантации стентов, при оценке состояния зоны кровоснабжения, в эксперименте не было выявлено гангрены конечностей и/или признаков их трофических нарушений. Ни у одного из кроликов не наблюдалось перемежающей хромоты, а кожные покровы задних конечностей и хвоста были обычной окраски.

Проходимость трансплантатов за весь период наблюдения составила для стентов из первой и второй группы 100 % (таблица 9).

Таблица 9 – Осложнения хирургического доступа, интраоперационные, постоперационные

Вид осложнения	Группа ГМС	Группа с ЛНП
Инфекция операционной раны	0	0
Диастаз операционной раны	0	0
Нарушения мозгового кровообращения	0	0
Разрыв стентируемой артерии	0	0
Забрюшинная гематома	0	0
Диссекция аорты	0	0
Эндолики в группе стентов с покрытием	0	0
Резидуальный стеноз	0	0
Дислокация покрытия со стента	0	0
Миграция конструкции (стент -покрытие) с поверхности несущего баллон-катетера при проведении имплантации устройства	0	0

В послеоперационном периоде не наблюдалось диастаза, нагноений или других осложнений послеоперационной раны, отдаленные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Отдаленные результаты процедуры стентирования

Показатель	ГМС	Стент с ЛНП	p
Количество выживших животных в группах	18	18	p>0,05
Вес животных, кг, M±σ	3,60 ± 1	3,70 ± 1	p>0,05
Степень ишемии нижних конечностей	0	0	–

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

Скорость кровотока в стентах разных групп представлена в таблице 11.

Таблица 11 – 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		0,0182	0,027	
$P_{0,6 \text{ мес.}}$		0,043	0,043	

Примечание: в скобках – ошибка среднего арифметического

В группе с ГМС через 6 месяцев ЛСК составил $0,69 \pm 0,01$ м/сек, а в группе покрытых стентов составил $0,42 \pm 0,01$ м/сек. Средняя ЛСК (до хирургического вмешательства) была равна $0,3 \pm 0,02$ м/сек.

Таким образом, скорость кровотока в сосудах с ГМС выросла спустя месяц от времени имплантации на 25 %, спустя еще 2 месяца – на 20 %, и 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 с покрытыми стентами спустя 1 месяц от времени установки стента не было обнаружено роста скорости кровотока, 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 (рисунок 17).

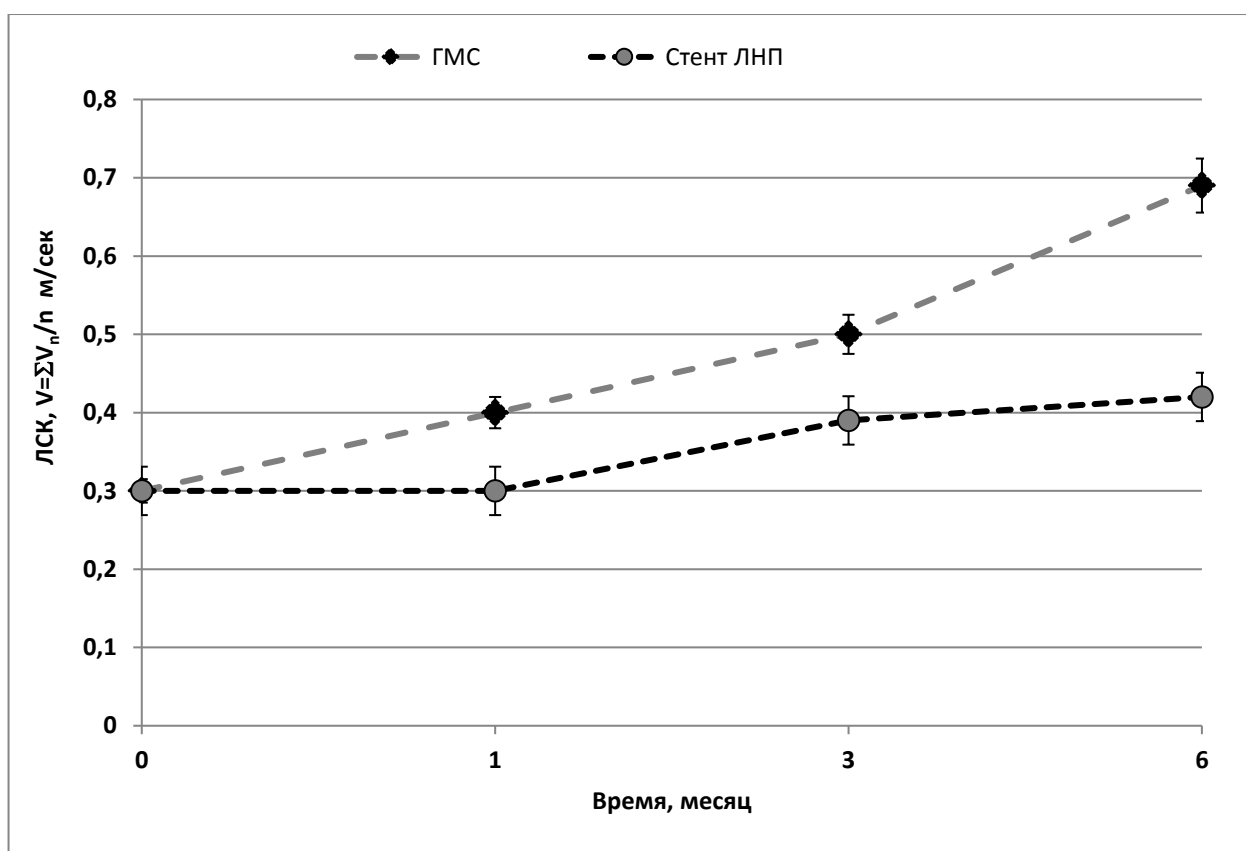


Рисунок 17 – Изменение линейной скорости кровотока в голометаллических стентах и стентах с лекарственно-наполненным покрытием в контрольных точках наблюдения 1, 3, 6 месяцев

При измерении линейной скорости кровотока в пяти контрольных точках с помощью ультразвукового исследования на 3 и 6 месяце наблюдения отмечались более высокие показатели в группе голометаллических стентов.

На рисунке 18 представлены данные с панели прибора на этапе ультразвукового исследования общей подвздошной артерии с голометаллическим стентом (6-й месяц наблюдения после имплантации, линейная скоростью кровотока 0,6 м/сек).



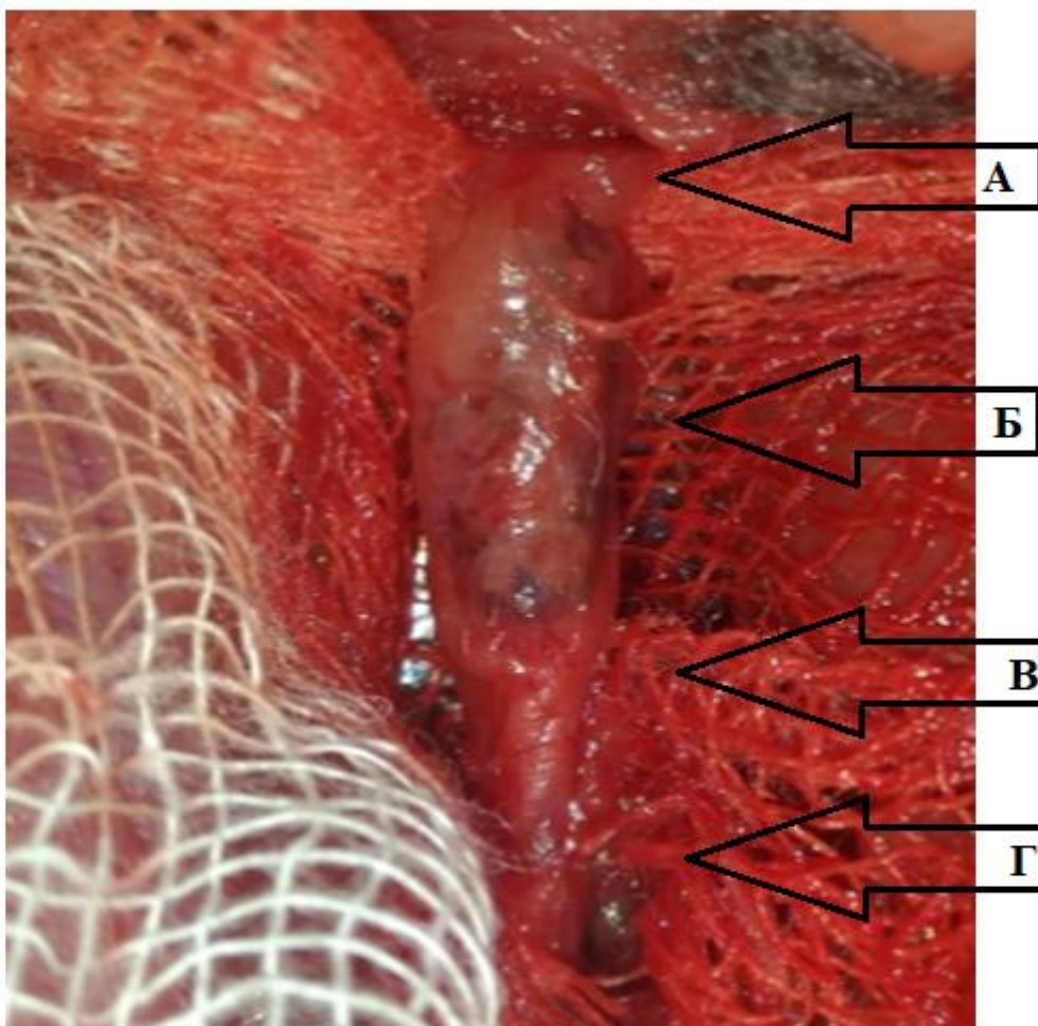
Рисунок 18 – Определение линейной скорости кровотока с помощью ультразвуковой доплерографии на приборе Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Израиль)

3.11.4 Конечный этап исследования *in vivo*. Макро- и микроскопическая оценка эксплантированных стентов

После забоя кроликов в соответствии с протоколом исследования «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755 и приложения к

приказу МЗ СССР от 04.10.1977 № 565), с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

Разрезом по средней линии живота выделялась трансабдоминально инфраренальная аорта и подвздошные артерии. Далее оценивались диаметр интактной и опытной подвздошной артерии, степень развития периваскулярной соединительной ткани, ее рубцовой деформации, внедрение в окружающие структуры (подвздошную вену). Стентированная подвздошная артерия была несколько большего диаметра, чем контрольная. Паравазальные ткани были рыхлыми, без рубцового процесса. Контрольный и экспериментальный стенты не пенетрировали стенку артерии и не внедрялись в близлежащие структуры и сопутствующую вену. Рядом лежащая подвздошная вена была без перипроцесса и внутрипросветных тромботических масс. Не было обнаружено признаков инфицирования/выраженного воспаления, гематом, как в зоне самого стента, так и окружающих его тканей (рисунок 19).



А – проксимальный конец стента;

Б – общая подвздошная артерия со стентом с лекарственно-наполненным покрытием;

В – дистальный конец стента;

Г – нативная наружная подвздошная артерия кролика

Рисунок 19 – Этап эксплантации общей подвздошной артерии вместе со стентом

Стентированные участки артерии были иссечены на 5 мм выше и ниже пальпируемого стента, промыты физиологическим раствором, расфасованы по пробиркам относительно сроков наблюдения и исследуемых групп с последующей инкубацией в водный раствор 10 % формальдегида. Объективно на этапе забора материала определяется нативная адвентиция сосуда без изменений. Визуально в области стентированной зоны общей подвздошной артерии со стороны адвентиции не обнаружено изменения контакта с окружающими тканями, что говорит об отсутствии реакции отторжения, воспаления и перипроцесса.

При макроскопическом исследовании не было выявлено видимых

деформаций стенки и изменения цвета сосудов с экспериментальными стентами (стенты с ЛНП). В отличие от ГМС у стентов с ЛНП не было выявлено четких границ стентированного участка с нативным сосудом. На рисунке 20 представлена обзорная микроскопия стентов, продольный и поперечные виды артерий с исследуемыми стентами. Покрытие стента располагалось на стенте в том же месте, что и на предоперационном этапе. Разрывов и 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 с ЛНП стентами такой тенденции не обнаружено, что, по-видимому, 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 стента).

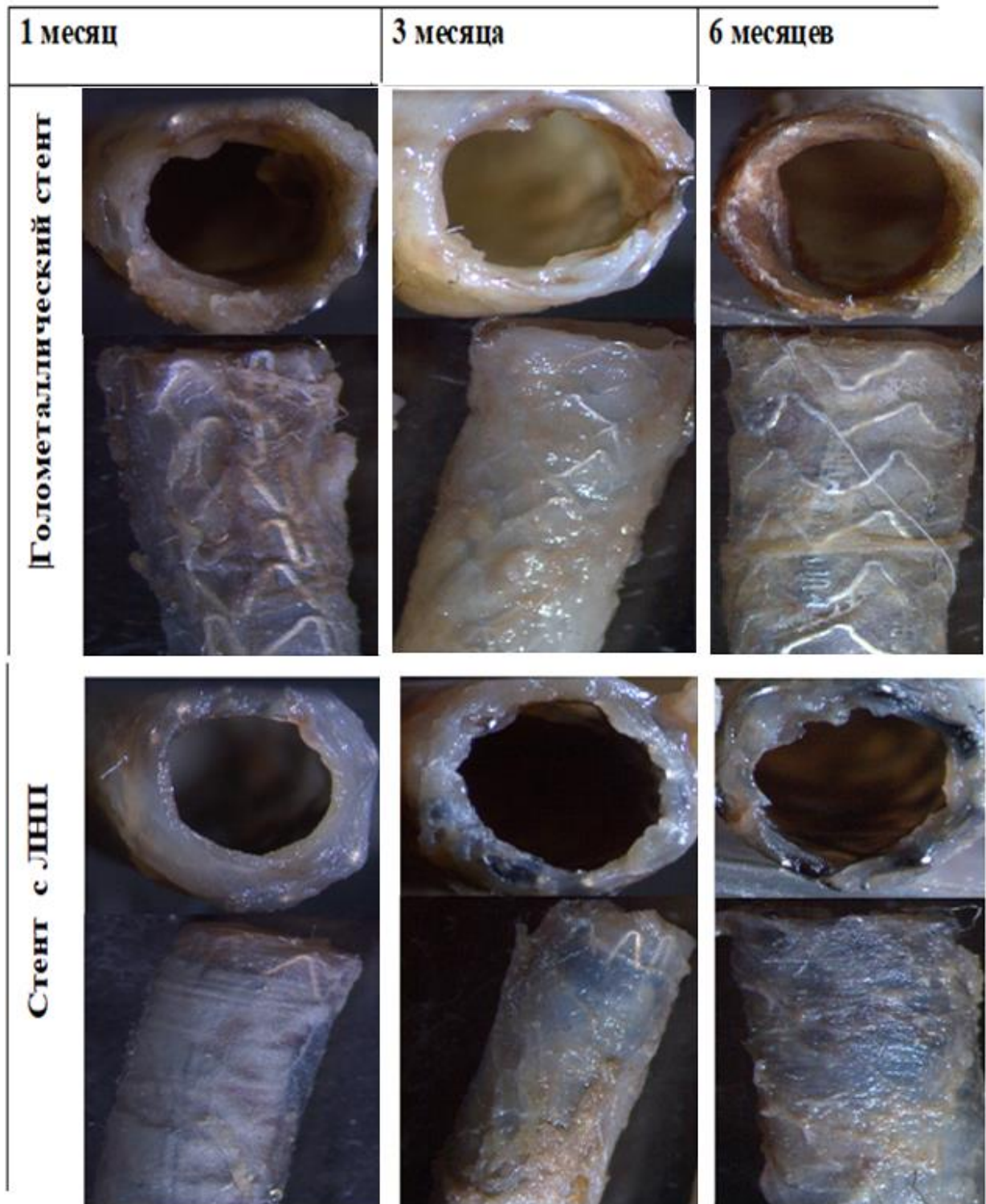
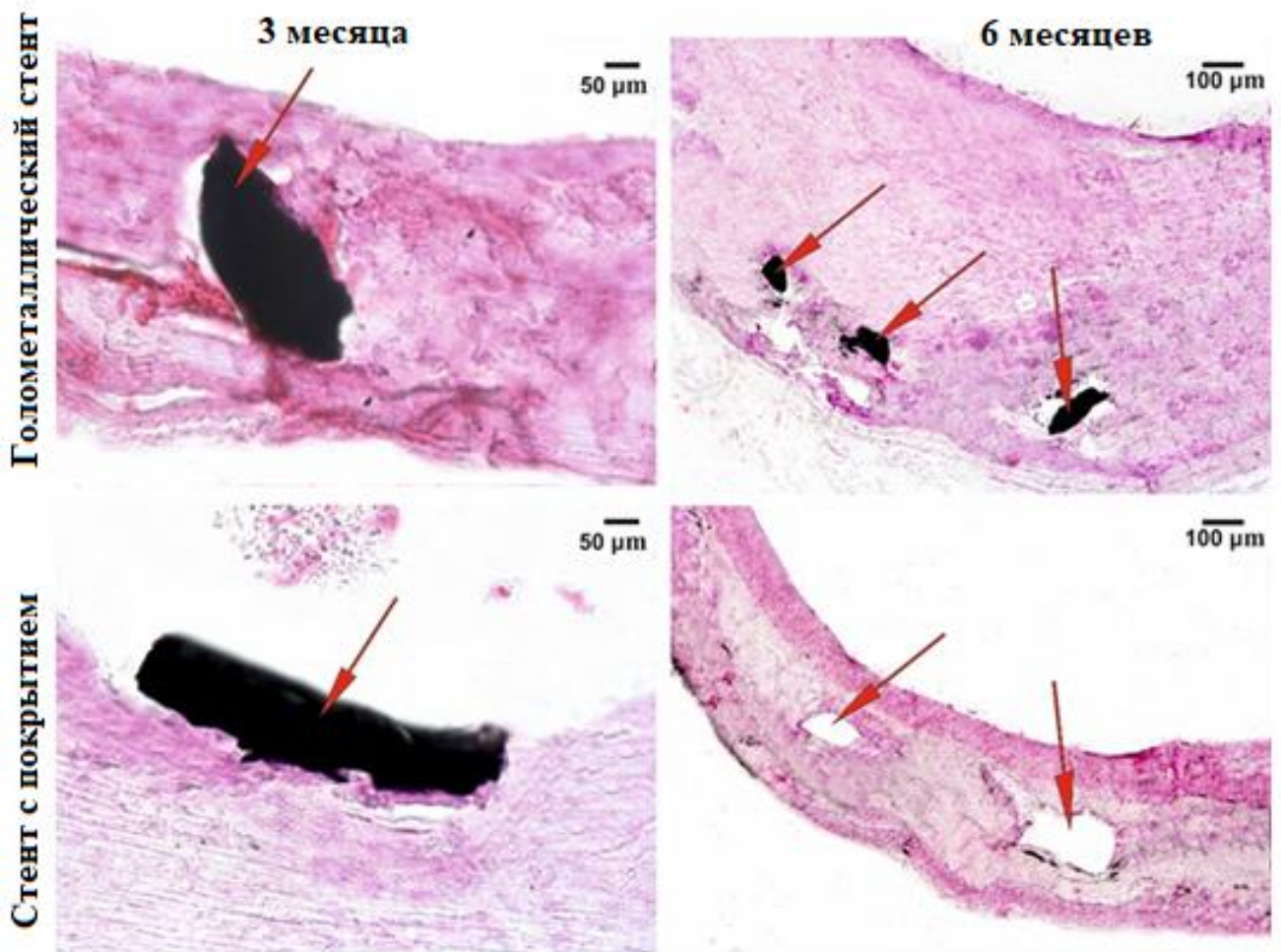


Рисунок 20 – Обзорная микроскопия сосудов с имплантированными стентами на разных сроках наблюдения. Микроскоп SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Germany)

3.11.5 Гистологическое исследование эксплантированных сосудов

В сосудах с ГМС прослеживалась явная тенденция увеличения толщины стенки сосуда в стентированной области, которая была более выражена после шести месяцев работы стента. Однако в сосудах с имплантированным стентом с ЛНП, такая тенденция не наблюдалась. Рост неоинтимы в местах контакта с балками стента может быть предположительно связан с более равномерным распределением нагрузки на стенку сосуда (поскольку покрытие распределяет нагрузку области контакта балок стента со стенкой сосуда на пространство между балками).

Рост фиброзной ткани с разной степенью созревания (неоинтима) наблюдался в сосудах с ГМС уже через три месяца после имплантации, который был еще более выражен через шесть месяцев (рисунок 21). Что касается сосудов со стентами с ЛНП, то 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. Фибробласты и поверхностный слой эндотелиоподобных клеток были идентифицированы с более высоким разрешением. Неоинтима в артериях с ГМС была значительно толще по сравнению с сосудами со стентами с ЛНП и имела структуру, более похожую на склерозированные участки стенки сосуда с почти неразличимыми коллагеновыми волокнами.



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

Рисунок 21 – Микроскопия поперечных срезов стентов в разных точках наблюдения. Окрашивание гематоксилином и эозином. AxioLab A1 Zen 2 Blue Edition (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия)

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эндоваскулярные вмешательства в настоящее время выполняются гораздо чаще, чем операции шунтирования [82]. Несмотря на очевидные плюсы, в связи с проведением эндоваскулярных процедур, наблюдаются и специфические осложнения, такие как пульсирующие и подкожные гематомы, аллергические реакции на контрастное вещество, перфорации и диссекции артерий [104]. Отдельной проблемой является рестеноз стентированного участка сосудистого русла, который индуцируется тромбообразованием, разрастанием поврежденных участков сосудистой стенки и комбинацией этих факторов. Развитие и усовершенствование эндоваскулярных методов лечения привело к появлению разнообразных стентов (с лекарственным покрытием, без него, биодеградируемых стентов и т.д.), но проблема рестеноза стентированного артериального сегмента остается актуальна и по сей день [8].

Обобщенные данные [24] показывают, что в отношении рестеноза нет значимой разницы между ГМС и коммерчески доступными лекарственно-наполненными стентами в долгосрочной перспективе, на сроке более шести лет [42]. Однако если учесть период наблюдения до пяти лет, нежелательные клинические проявления, частота рестеноза и смертность при использовании лекарственно-наполненных стентов ниже по сравнению с ГМС [29]. Концентрация лекарств в покрытии стента и способ нанесения могут влиять на скорость высвобождения лекарств, что является принципиальным вопросом. Чаще всего ПТХ в дозе 3 мкг/мм² наносят на стенты методом ультразвукового распыления [56]. В частности, по этой методике изготавливается широко применяемый в клинической практике стент Zilver ПТХ для периферических артерий нижних конечностей [85]. Использование цитостатика в таких высоких концентрациях вызывает ряд побочных эффектов, таких как: некроз тканей, снижение прочности сосудистой стенки с последующим развитием аневризмы [93], разрушение покрытия и дистальная эмболия, вызванная его фрагментами [66], местный тромбоз и развитие местного неинфекционного воспалительного

очага [41], что привело к появлению рекомендаций против использования таких стентов [94].

В представленной работе использовали для изготовления ЛНП стентов метод электроспиннинга. В качестве раствора для электроспиннинга использованы растворы поликапролактона, человеческого сывороточного альбумина, паклитаксела с диметилсульфоксидом в гексафторизопропанол.

В качестве базового полимера был использован поликапролактон – биodeградируемый полимер со скоростью деградации более 2 лет. Этот полимер обладает протяженной областью пластической деформации с относительным удлинением до 2,5 раз и невысокой остаточной прочностью. В связи с этим, остаточная нагрузка на балки стента после его установки, оказываемая покрытием невысока и не превышает 10 %.

Для подавления гиперплазии неоинтимы был использован цитостатик паклитаксел, для уточнения концентрации которого, были выполнены эксперименты по исследованию его цитотоксичности на гладкомышечные клетки стенки артерии. Оказалось, что цитотоксическая концентрация ПТХ против этих клеток существенно выше, чем против онкотрансформированных клеток, что связано, по-видимому, с более низкой скоростью их пролиферации. Токсическая концентрация ПТХ для гладкомышечных клеток составляет по литературным данным ~ 10 нМ [106], однако по нашим данным, она как минимум составляет 0,04 мкг/мл.

При сравнении стентов с ПТХ, нанесенным на их поверхность в различной дозе, было обнаружено, что частота рестенозов зависит от дозы препарата. Так, при использовании паклитаксела в дозах 0,2, 0,7, 1,4 и 2,7 мкг/мм², частота рестеноза составляет 20, 12, 14 и 3 %, соответственно [121]. В настоящее время паклитаксел наносят на стенты, как правило, в дозе 3 мкг/мм² [121]. Следует отметить, что при пересчете обычно используемой для нанесения на стенты дозы ПТХ с его токсичной концентрацией наблюдается явное превышение необходимого количества ПТХ наносимого на стент. По-видимому, это связано с кинетикой высвобождения ПТХ из покрытия и нанесением покрытия только на балки стента, что требует сильного превышения дозы в силу быстрого

уменьшения концентрации лекарства с увеличением расстояния от балок после установки стента. Концентрация ПТХ в лекарственно-наполненных покрытиях, использованных в данном исследовании для покрытия металлических стентов, составила 0,46 мкг/мм².

Установка стента приводит к серьезным деформациям сосуда, атеросклеротической бляшке, повреждению эндотелия и возникновению очага воспаления с последовательным протеканием всех фаз воспалительной реакции. Очевидно, что на пролиферативной фазе необходимо ингибирование активного размножения клеток, а на хронической (которая вызвана реакцией на чужеродную поверхность) необходимо сдерживать клеточную пролиферацию. В связи с этим необходимо, чтобы высвобождение лекарств и покрытий стентов имело двухфазный характер с активным выбросом цитостатика в высокой концентрации на первой фазе и медленным высвобождением на второй. Именно такой кинетикой высвобождения ПТХ и обладает используемое нами покрытие стентов. Принимая во внимание начальное активное высвобождение ПТХ с последующим ежедневным высвобождением 1 %, его диффузию через артериальную стенку и взаимодействие с белками артериальной стенки, ПТХ присутствует в субоптимальной концентрации в сосудистой стенке в течение как минимум 1–3 месяцев [46].

Дополнительные проблемы при развитии воспаления возникают и в силу плохой гемосовместимости материалов стентов. Действительно, реакция на металл со стороны свертывающей системы крови (адгезия и активация тромбоцитов, адгезия фибриногена и фибрина) дополнительно стимулируют развитие воспаления, в то время как воспаление стимулирует активацию системы свертывания крови. Как было показано в экспериментах *ex vitro*, ЛНП не было склонно к адгезии тромбоцитов и других клеток крови и вызывало гемолиз в гораздо меньшей степени, чем допускается ISO 10993-4, т.е. покрытие имеет высокую гемосовместимость. Поверхность волокон покрытия практически полностью экранирована человеческим сывороточным альбумином, внесенным в состав покрытия, а альбумин часто используется для повышения

биосовместимости поверхности, контактирующих с кровью имплантируемых изделий.

Выполненное *in vivo* исследование носило проспективный характер, данные получены после имплантации в общую подвздошную артерию кроликов, заранее подготовленных двух типов стентов в количестве 36 штук (рандомизация 1:1). В контрольной группе устанавливали голометаллический стент, в опытной – стенты с лекарственно-наполненным покрытием. Контрольными точками были 1, 3 и 6 месяцев, по 6 животных в группе.

В соответствии с ранее полученными данными, частота рестеноза после стентирования голометаллическим стентом составляет 18 % [33]. При сравнении стента Achieve (CookInc.) с паклитакселом (3 мкг/мм²) и голометаллического стента (Multi-Link Penta), частота рестеноза составила 14,9 % против 20,6 %; $p = 0,076$, повторная реваскуляризация требовалась через 9 месяцев в 11,9 и 14,5 % случаев, соответственно; $p = 0,12$ [99]. В нашем исследовании было показано, что на этапе эксплантации все стенты находились строго в позиции общей подвздошной артерии, миграции стентов не было выявлено. При мобилизации общих подвздошных артерий спаечного процесса, перифокального воспаления, нарушения целостности артериальной стенки (перфорации, пролежней, артериовенозных фистул), реакции биологического отторжения ни в одной из групп не обнаружено.

В нашем исследовании не было стенозов более 50 % просвета сосуда, что, вероятно, связано со стентированием здоровых артерий. Тем не менее, в соответствии с нашими данными линейная скорость кровотока в сосудах со стентами с ЛНП значительно отличается от таковой в случае имплантации ГМС. В течение первого месяца увеличение ЛСК не наблюдается, скорее всего, из-за эффективного ингибирования неоинтимообразующих клеток высвобожденным ПТХ из покрытия. В последующие два месяца в стентированном сегменте ЛСК несколько увеличивалась (23 %); в течение следующих трех месяцев ЛСК возрастала всего на 7 %, что свидетельствует о стабилизации образования неоинтимы.

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

Данные обзорной микроскопии демонстрируют целостность покрытия всех исследуемых стентов в группе с ЛНП, также не наблюдалось четкой границы между зоной «стент – нативная артерия» на сроках 3, 6 месяцев, что говорит о равномерном распределении неоинтимы в переходных зонах благодаря наличию циркулярного покрытия. Однако в группе с ГМС определялась четкая разграниченность этих зон по типу «ступеньки» в сроках наблюдения 1, 3, 6 месяцах, что способствовало образованию турбулентного кровотока с последующем прогрессивным развитием неоинтимы (см. рисунок 20).

Гистологическое исследование также подтверждает данные относительно линейной скорости кровотока. Определенное изменение эффективного просвета стента с ЛНП через три месяца после имплантации связано, скорее всего, со снижением концентрации цитостатика, который перестает тормозить рост неоинтимообразующих клеток. По нашим о высвобождении ПТХ: цитотоксическая концентрация поддерживалась в стенке сосуда в течение одного месяца (без изменений в стенке); субоптимальная концентрация сохранялась в течение дополнительных 2-3 месяцев (небольшой рост неоинтимы); вновь образованная ткань выросла после завершения высвобождения цитостатика, по-видимому, в связи со стабилизацией процесса [46]. В последующие три месяца в стентированном сегменте сформировался слой неоинтимы, а вокруг него образовалась соединительнотканная капсула. Предположительно, их образование положительно сказалось на стабилизации просвета стентированного артериального сегмента. Следует отметить, что неоинтима в стентах с ЛНП существенно отличается по своему строению от таковой в сосудах с ГМС, скорее всего, это объясняется тем, что образование неоинтимального слоя происходит в разных условиях. В стентах с ЛНП неоинтима формируется уже после острой стадии воспаления, вызванного имплантацией стента.

Покрытие, нанесенное электроспиннингом на стенты, обеспечивает механическую защиту кровотока от проникновения клеток стенки сосудов и выравнивания внутренней поверхности, подобно стентам Inspire MD, покрытым MicroNet [15]. Кроме того, покрытие из электроспиннинга обладает высокими механическими характеристиками, что улучшает распределение нагрузки на стенку артерии.

Покрытие позволяет избежать прямого контакта между клетками стенки сосуда и металлом, тем самым увеличивая биосовместимость стента и уменьшая воспаление на границе раздела стент-ткань, которое неизбежно присутствует, поскольку поверхность металла инородна и имеет другие механические свойства. Слой 3Д-матрикса действует как буфер, может нивелировать нежелательные контакты и механическое несоответствие материала стента и живой ткани.

В литературе, описаны варианты стентов с покрытиями, нанесенными методом электроспиннинга, в том числе стенты для трахеи, дуоденальные стенты, и стенты пищевода, предназначенные для восстановления проходимости пищевода при доброкачественных стриктурах пищевода [12]. В последнем случае использовали покрытие из поликапролактона с ПТХ и соответствующие эксперименты на животных показали, что такие стенты уменьшают пролиферацию гладкомышечных клеток и задерживают формирование рестриктур в пищеводе.

Стенты с ЛНП, изготовленные методом электроспиннинга, покрывают биостабильными и биodeградируемыми полимерами, способными выделять противовоспалительные препараты, цитостатики, антикоагулянты, лиганды для эндотелизации [72, 48]. Авторы всех статей отмечают, что стенты ЛНП являются наиболее перспективными, улучшают эндотелизацию и уменьшают воспаление и свертываемость в зависимости от используемых наполнителей.

В соответствии с нашими данными стенты с ЛНП, нанесенным методом электроспиннинга, демонстрируют значительные преимущества перед ГМС. Об этом свидетельствуют данные сонографии, обзорной микроскопии и гистологические исследования. Влияние механической защиты стенки и просвета сосуда по сравнению с цитостатическим действием электропряденого покрытия

на эффективность стентов с ЛНП необходимо определить в дальнейших исследованиях. Скорее всего, исследование *ex vivo* кинетики меченого тритием ПТХ может дать более глубокое понимание механизма его действия и влияния на рост неоинтимы. Предположительно, что замедленная кинетика высвобождения ПТХ или его повышенная концентрация могут иметь положительный эффект и обеспечивать более эффективное ингибирование роста неоинтимы. Чтобы оценить роль механической поддержки покрытия стента, необходимо тщательное сравнительное исследование стентов, покрытых материалами, элюирующими и не содержащими лекарственные средства.

На данный момент стенты с покрытием, изготовленные методом электроспиннинга, описаны в научной литературе и исследованы в экспериментах на животных [98, 108].

Опубликованы результаты экспериментального исследования покрытий для стентов изготовленных методом электроспиннинга из полиуретана: в работе Tefft В.Ж. и соавторов намагниченный стент из нержавеющей стали был покрыт при помощи электроспиннинга полимерным покрытием из полиуретана. На модели свинной коронарной артерии было показано, что он успешно заселяется эндотелиальными клетками, предварительно помеченными парамагнитными наночастицами оксида железа (SPION). Авторы считают, что магнитные силы совместно со слоем эндотелиальных клеток облегчат эндотелизацию внутренней поверхности стента, тем самым улучшая заживление артерий и снижая риск тромбоза и рестеноза [72].

В клинической практике используется стент РК Papyrus (Biotronik, Berlin, Germany). Полимерное покрытие этого стента толщиной до 90 микрон, изготовленное методом электроспиннинга из полиуретана, выполняет функцию графта для герметизации поражений коронарной артерии [48].

Очевидно, что исследование стентов с ЛНП необходимо проложить и более полно исследовать функции стентированного сегмента артерии при длительном наблюдении для более точной оценки эффективности стентов с ЛНП [123].

ВЫВОДЫ

1. Разработаны протоколы и методом электроспиннинга изготовлены 3Д-матрицы на основе поликапролактона с добавлением ЧСА, ПТХ, ДМСО. При оценке механических и физико-химических свойства матриц показано, что при двукратном удлинении они соответствуют области пластической деформации, не меняется структура матриц, а увлажнение не влияет на линейные размеры, однако уменьшает исходную прочность матриц. Остаточная нагрузка матриц 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, матрицы 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/мм². В экспериментах *in vitro* показано, что 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. Оработана 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/мм² 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 СОКРАЩЕНИЙ

- ГМК – гладкомышечные клетки
- ГМС – голометаллический стент
- ГФИП – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол
- ДМСО – диметилсульфоксид
- КД – круговой дихроизм
- КТ – компьютерная томография
- ЛНП – лекарственно-наполненное покрытие
- ЛСК – линейная скорость кровотока
- ОПА – общая подвздошная артерия
- ОСА – общая сонная артерия
- ПКЛ – поликапролактон
- ПЛГА – полилактид-ко-гликолид
- ПТФЭ – политетрафторэтилен
- ПТХ – паклитаксел
- ПЭТ – полиэтилентерефталат
- РФЭС – рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ССХ – сердечно-сосудистая хирургия
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- УЗДГ – ультразвуковая доплерография
- ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
- ЧТА – чрескожная транслюминальная ангиопластика
- ЧТКА – чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика
- ЭТС – эмбриональной телячьей сыворотки
- CaN – кальциневрин
- HMDS – гексаметилдисилазан
- PBS – фосфатный буферный раствор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шальнова, С. А. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвовавших в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» / С. А. Шальнова, А. О. Конради, А. Ю. Карпов и др. // Рос. кардиолог. журн. – 2012. – № 5. – С. 6–11.
2. Попова, И. В. Изучение проходимости сосудистого протеза, изготовленного методом электроспиннинга / А. О. Степанова, Т. А. Плотникова и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 136–138.
3. Кахель, Т. Поздние результаты трансплантации гомологичных вен в позиции бедренно-подколенного шунта / Т. Кахель, В. Новак // Тезисы докладов объединенной конференции ангиологов. – Тбилиси, 1990. – С. 29–30.
4. Абалмасов, К. Г. Качество жизни больных с хронической ишемией нижних конечностей / К. Г. Абалмасов, Ю. И. Бузиашвили, К. М. Морозов и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 8–12.
5. Голядкина, А. А. Конечно-элементное моделирование ишемической болезни сердца исходя из картины морфофункциональных изменений венечных артерий и сердечной мышцы человека / А. А. Голядкина, И. В. Кириллова, О. А. Щучкина и др. // Рос. журн. биомеханики. – 2011. – Т. 15, № 4. – С. 33–46.
6. Покровский, А. В. Сравнительный анализ отдаленных результатов аутовенозного шунтирования «in situ» и реверсированной аутовеной у пациентов 103 с атеросклеротической окклюзией бедренно-подколенно-тибиального сегмента / А. В. Покровский, Ф. В. Чупин, Д. С. Семененко // Материалы 14 Съезда (XVIII) международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. – Ростов-на-Дону, 2003. – С. 243–245.
7. Бакашвили, Г. Н. Сравнительная оценка стентов с лекарственным покрытием эверолимусом и сиролимусом у больных ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом // Интервенционная кардиология. – 2010. – № 22. – С. 18–22.

8. Кузнецов, К. А. Стенты сосудов: подходы, используемые для повышения их клинической эффективности / К. А. Кузнецов, М. В. Харькова, А. А. Карпенко и др. // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2018. – Т. 24, № 2. – С. 69–79.
9. Степанова, А. О. Способ получения микроволокнистого материала, высвобождающего лекарственные средства : пат. 2669344 С1 Рос. Федерация : МПК51 А 61 L 27/14 / А. О. Степанова, К. А. Кузнецов, О. А. Новикова и др.; заявитель и патентообладатель ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. – № 2017138348 ; заявл. 02.11.2017 ; опубл. 10.10.2018, Бюл. № 28.
10. Щербаков, Д. В. Заболеваемость взрослого населения Сибирского федерального округа болезнями системы кровообращения / Д. В. Щербаков // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10, ч. 9. – С. 1827–1832.
11. Legutko, J. A clinical evaluation of the ProNOVA XR polymer-free sirolimus eluting coronary stent system in the treatment of patient with de novo coronary artery lesions (EURONOVA XR I study) / J. Legutko, W. Zasada, G. L. Kaluza et al. // *Ind. Heart J*. – 2013. – Vol. 65 (4). – P. 388–394.
12. Zhu, Y. A highly flexible paclitaxel-loaded poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibrous-membrane-covered stent for benign cardiac stricture / Y. Zhu, Ch. Hu, B. Li et al. // *Acta Biomater*. – 2013. – Vol. 9. – P. 8328–8336.
13. Park, S.-J. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis / S.-J. Park, W. H. Shim, D. S. Ho et al. // *N. Engl. J. Med*. – 2003. – Vol. 348 (16). – P. 1537–1545.
14. Stone, G. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease / G. Stone, S. Ellis, D. Cox et al. // *N. Engl. J. Med*. – 2004. – Vol. 350 (3). – P. 221–231.
15. Schofer, J. A prospective, multicenter study of a novel mesh-covered carotid stent: the CGuard CARENET trial (Carotid embolic protection using MicroNet) / J. Schofer, P. Musialek, K. Bijuklic et al. // *JACC: Cardiovasc. Interv*. – 2015. – Vol. 8 (9). – P. 1229–1234.

16. Morice, M. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization / M. Morice, P. Serruys, J. Sousa et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346 (23). – P. 1773–1780.
17. Huang, Zh.-M. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites / Zh.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki et al. // *Composites Science and Technology.* – 2003. – Vol. 63 (15). – P. 2223–2253.
18. Mattesini, A. ABSORB biodegradable stents versus second-generation metal stents: a comparison study of 100 complex lesions treated under OCT guidance / A. Mattesini, G. Secco, G. Dall'Ara et al. // *JACC: Cardiovasc. Interv.* – 2014. – Vol. 7 (7). – P. 741–750.
19. Baldwin, A. L. Convection and diffusion of albumin through artery walls: Implications for local drug delivery / A. L. Baldwin, T. W. Secomb, B. R. Simon // *Am. Soc. Mechan. Engin. Bioengin. Div.* – 1997. – Vol. 35. – P. 93–94.
20. Qin, M. Bioactive surface modification of mica and poly(dimethylsiloxane) with hydrophobins for protein immobilization / M. Qin, L. K. Wang, X. Z. Feng et al. // *Langmuir.* – 2007. – Vol. 23 (8). – P. 4465–4471.
21. Rechavia, E. Biocompatibility of polyurethane-coated stents: tissue and vascular aspects / E. Rechavia, F. Litvack, M. C. Fishbien et al. // *Cathet. Cardiovasc. Diagn.* – 1998. – Vol. 45 (2). – P. 202–207.
22. Lee, Ch.-H. Biodegradable cable-tie rapamycin-eluting stents / Ch.-H. Lee, M.-J. Hsieh, Sh.-H. Chang et al. // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7, art. 111. – P. 1–12.
23. Schurtz, G. Biodegradable polymer Biolimus-eluting stent (Nobori®) for the treatment of coronary artery lesions: review of concept and clinical results / G. Schurtz, C. Delhaye, Ch. Hurt et al. // *Medical Devices (Auckl).* – 2014. – Vol. 7. – P. 35–43.
24. Kudo, T. Characteristics of peripheral microembolization during iliac stenting: Doppler ultrasound monitoring / T. Kudo, Y. Inoue, H. Nakamura et al. // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2005. – Vol. 30, Issue 3. – P. 307–310
25. Chieffo, A. Drug eluting stents: focus on Cypher™ sirolimus-eluting coronary stents in the treatment of patients with bifurcation lesions / A. Chieffo,

- T. C. Aranzulla, A. Colombo // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2007. – Vol. 3 (4). – P. 441–451.
26. Sabaté, M. Clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with everolimus-eluting stents versus bare-metal stents (EXAMINATION): 5-year results of a randomised trial / M. Sabaté, S. Brugaletta, A. Cequier et al. // *Lancet.* – 2016. – Vol. 387 (10016). – P. 357–366.
27. Colombo, A. Biodegradable stents «fulfilling the mission and stepping away» / A. Colombo, E. Karvouni // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102 (4). – P. 371–373.
28. Colombo, A. Drug-eluting stent update 2007: part III: technique and unapproved/unsettled indications (left main, bifurcations, chronic total occlusions, small vessels and long lesions, saphenous vein grafts, acute myocardial infarctions, and multivessel disease) / A. Colombo, A. Chieffo // *Circulation.* – 2007. – Vol. 116 (12). – P. 1424–1432.
29. Mangiacapra, F. Comparison among patients ≥ 75 years having percutaneous coronary angioplasty using drug-eluting stents versus bare metal stents / F. Mangiacapra, E. Ricottini, G. Gioia et al. // *Am. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 115 (9). – P. 1179–1184.
30. Rippstein, P. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents / P. Rippstein, M. K. Black, M. Boivin et al. // *J. Histochem. Cytochem.* – 2006. – Vol. 54 (6). – P. 673–681.
31. Bonomi, Ph. Comparison of survival and quality of life in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposide with cisplatin: results of an Eastern cooperative oncology group trial / Ph. Bonomi, K. Kim, D. Fairclough et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2000. – Vol. 18 (3). – P. 623–631.
32. Casper, Ch. L. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process / Ch. L. Casper, J. S. Stephens, N. G. Tassi et al. // *Macromolecules.* – 2004. – Vol. 37 (2). – P. 573–578.

33. Erbel, R. Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty / R. Erbel, M. Haude, H. W. Höpp et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 339. – P. 1672–1678.
34. Costa, M. A. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents / M. A. Costa, D. I. Simon // *Circulation.* – 2005. – Vol. 111 (17). – P. 2257–2273.
35. Creel, Ch. J. Arterial paclitaxel distribution and deposition / Ch. J. Creel, M. A. Lovich, E. R. Edelman // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86 (8). – P. 879–884.
36. Dake, M. Polymer-free paclitaxel-coated Zilver PTX stents – evaluation of pharmacokinetics and comparative safety in porcine arteries / M. Dake, W. Van Alstine, Q. Zhou et al. // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2011. – Vol. 22 (5). – P. 603–610.
37. Denizli, F. K. Competitive adsorption of blood proteins on gamma-irradiated-polycarbonate films / F. K. Denizli, O. Guven // *J. Biomater. Sci. Polymer Edition.* – 2002. – Vol. 13 (3). – P. 127–139.
38. Pisani, S. Design of copolymer PLA-PCL electrospun matrix for biomedical applications / S. Pisani, R. Dorati, B. Conti et al. // *Reactive and Functional Polymers.* – 2018. – Vol. 124. – P. 77–89.
39. Srikar, R. Desorption-limited mechanism of release from polymer nanofibers / R. Srikar, A. L. Yarin, C. M. Megaridis et al. // *Langmuir.* – 2008. – Vol. 24 (3). – P. 965–974.
40. Kuznetsov, K. A. Diclofenac release from polycaprolactone 3D matrices produced by electrospinning: influence of fiber structure and composition of the surrounding medium / K. A. Kuznetsov, A. O. Stepanova, V. S. Chernonosova et al. // *Int. J. Polymeric Materials.* – 2019. – Vol. 68 (1-3). – P. 27–33.
41. Di Mario, C. New recipes for in-stent restenosis: cut, grate, roast, or sandwich the neointima? / C. Di Mario, F. Marsico, M. Adamian // *Heart.* – 2000. – Vol. 84 (5). – P. 471–475.
42. Bona, K. H. Drug-eluting or bare-metal stents for coronary artery disease / K. H. Bona, J. Mannsverk, R. Wiseth et al. // *New Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375 (13). – P. 1242–1252.

43. Papafaklisa, M. I. Drug-eluting stent restenosis: effect of drug type, release kinetics, hemodynamics and coating strategy / M. I. Papafaklisa, Y. S. Chatzizisis, K. K. Naka et al. // *Pharmacol. Ther.* – 2012. – Vol. 134 (1). – P. 43–53.
44. Waksman, R. Early- and long-term intravascular ultrasound and angiographic findings after bioabsorbable magnesium stent implantation in human coronary arteries / R. Waksman, R. Erbel, C. Di Mario et al. // *JACC: Cardiovasc. Interv.* – 2009. – Vol. 2 (4). – P. 312–320.
45. Sirianni, R. W. Effect of extracellular matrix elements on the transport of paclitaxel through an arterial wall tissue mimic / R. W. Sirianni, J. Kremer, I. Guler et al. // *Biomacromolecules.* – 2008. – Vol. 9 (10). – P. 2792–2798.
46. Kuznetsov, K. A. Electrospun produced 3D matrices for covering of vascular stents: paclitaxel release depending on fiber structure and composition of the external environment / K. A. Kuznetsov, A. O. Stepanova, R. I. Kvon et al. // *Materials.* – 2018. – Vol. 11 (11) : 2176.
47. Elamparithi, A. Electrospun polycaprolactone matrices with tensile properties suitable for soft tissue engineering / A. Elamparithi, A. M. Punnoose, S. Kuruvilla et al. // *Artific. Cel. Nanomed. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 44 (3). – P. 878–884.
48. Di Mario, C. Exclusion of a giant aneurysm post-Kawasaki disease with novel polyurethane covered stents / C. Di Mario, I. D. Kilic, J. S. M. Yeh et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 184. – P. 664–666.
49. Farah, S. Crystalline coating of rapamycin onto a stent: process development and characterization / S. Farah, W. Khan, A. J. Domb // *Int. J. Pharm.* – 2013. – Vol. 445 (1/2). – P. 20–28.
50. Farb, A. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans / A. Farb, D. K. Weber, F. D. Kolodgie // *Circulation.* – 2002. – Vol. 105 (25). – P. 2974–2980.
51. Hou, D. Fluorocopolymer-coated nitinol self-expanding paclitaxel-eluting stent: pharmacokinetics and vascular biology responses in a porcine iliofemoral model / D. Hou, B. Huibregtse, M. Eppihimer et al. // *EuroIntervention.* – 2016. – Vol. 12 (6). – P. 790–797.

52. Ford, E. S. Proportion of the decline in cardiovascular mortality disease due to prevention versus treatment: public health versus clinical care / E. S. Ford, S. Capewell // *Ann. Rev. Publ. Health.* – 2011. – Vol. 32. – P. 5–22.
53. Goriely, A. R. Transient diffusion of albumin in aortic walls: effects of binding to medial elastin layers / A. R. Goriely, A. L. Baldwin, T. W. Secom // *Am. J. Physiol. Heart and Circulation Physiol.* – 2007. – Vol. 292 (5). – P. 2195–2201.
54. Grube, E. BioMatrix®Biolimus A9®-eluting coronary stent: a next-generation drug-elut Fing stent for coronary artery disease / E. Grube, L. Buellesfeld // *Exp. Rev. Med. Dev.* – 2006. – Vol. 3 (6). – P. 731–741.
55. Grube, E. STEALTH I: safety and performance evaluation of biosensors Biolimus A9™ international drugeluting stent (Bio-Matrix™): a 4-year safety follow-up [Electronic resource] // TCT 2008: Transcatheter Cardiovascular Therapeutics 20th Annual Scientific Symposium (12-17 Oct, 2008). – URL: <https://www.medscape.com/viewcollection/17472> (accessed 02.10.2021).
56. Harvey, L. Berger Sono-Tek Corporation Milton. NY 12547 USA Coating Drug-eluting Arterial Stents Using Ultrasonic Spray Nozzles / L. Harvey // ILASS Americas, 19th Annual Conference on Liquid Atomization and Spray Systems. – Toronto, Canada, 2006.
57. Mozaffarian, D. Heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American Heart Association / D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A. S. Go et al. // *Circulation.* – 2015. – Vol. 131 (4). – E29–E322.
58. Grube, E. High-dose 7-hexanoyltaxol-eluting stent with polymer sleeves for coronary revascularization: one-year results from the SCORE randomized trial / E. Grube, A. Lansky, K. Hauptmann et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2004. – Vol. 44 (7). – P. 1368–1372.
59. Huang, S. Mechanisms of resistance to rapamycins / S. Huang, P. J. Houghton // *Drug Resistance Updates.* – 2001. – Vol. 4 (6). – P. 378–391.
60. Chernonosova, V. S. Human serum albumin in electrospun PCL fibers: structure, release, and exposure on fiber surface / V. S. Chernonosova, R. I. Kvon, A. O. Stepanova et al. // *Polym. Adv. Technol.* – 2017. – Vol. 28 (7). – P. 819–827.

61. Nebeker, J. R. Hypersensitivity cases associated with drug-eluting coronary stents: a review of available cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project / J. R. Nebeker, R. Virmani, C. L. Bennett et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2006. – Vol. 47. – P. 175–181.
62. Indolfi, L. Coating process and early stage adhesion evaluation of poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) hydrogel coating of 316L steel surface for stent applications / L. Indolfi, F. Causa, P. A. Netti // *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine.* – 2009. – Vol. 20 (7). – P. 1541–1551.
63. Gershlick, A. Inhibition of restenosis with a paclitaxel-eluting, polymer-free coronary stent: the European evaluation of paclitaxel eluting stent (ELUTES) trial / A. Gershlick, I. De Scheerder, B. Chevalier et al. // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109 (4). – P. 487–493.
64. Tamai, H. Initial and 6-Month Results of Biodegradable Poly-L-Lactic Acid Coronary Stents in Humans / H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo et al. // *Circulation.* – 2000. – Vol. 102. – P. 399–404.
65. Yasukawa, T. Intraocular sustained drug delivery using implantable polymeric devices / T. Yasukawa, Y. Ogura, E. Sakurai et al. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2005. – Vol. 57 (14). – P. 2033–2046.
66. De Jaegere, P. Intravascular ultrasound-guided optimized stent deployment. Immediate and 6 months clinical and angiographic results from the Multicenter ultrasound stenting in coronaries study (MUSIC study) / P. De Jaegere, H. Mudra, H. Figulla et al. // *Eur. Heart J.* – 1998. – Vol. 19 (8). – P. 1214–1223.
67. ISO 7198:1998. Cardiovascular implants – tubular vascular prostheses [Electronic resource] // International Standard Organization. – URL: <https://www.iso.org/ru/standard/25374.html> (accessed: 01.10.2021).
68. Khan, I. A. The intra-vascular stent as a site-specific local drug delivery system / I. A. Khan, V. Patravale // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2005. – Vol. 31 (1). – P. 59–78.

69. Lamichhane, S. A polymer-free paclitaxel eluting coronary stent: effects of solvents, drug concentrations and coating methods / S. Lamichhane, A. Gallo, G. Mani // *Ann. Biomed. Engineer.* – 2014. – Vol. 42 (6). – P. 1170–1184.
70. Leung, D. Y. Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis / D. Y. Leung, N. A. Soter // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2001. – Vol. 44, Suppl. 1. – S1–S12.
71. Virmani, R. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent should we be cautious? / R. Virmani, G. Guagliumi, A. Farb et al. // *Circulation.* – 2004. – Vol. 109 (6). – P. 701–705.
72. Tefft, B. J. Magnetizable stent-grafts enable endothelial cell capture / B. J. Tefft, S. Uthamaraj, J. J. Harburn et al. // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2017. – Vol. 427. – P. 100–104.
73. Nelson, F. C. Manipulation of the C(22)–C(27) region of rapamycin: stability issues and biological implications / F. C. Nelson, S. J. Stachel, C. P. Eng et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1999. – Vol. 9 (2). – P. 295–300.
74. Van der Giessen, W. J. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine arteries / W. J. Van der Giessen, A. M. Lincoff, R. S. Schwartz et al. // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94 (7). – P. 1690–1697.
75. Karimi, A. Measurement of the uniaxial mechanical properties of healthy and atherosclerotic human coronary arteries / A. Karimi, M. Navid, A. Shojaeic et al. // *Materials Science and Engineering. Part C: Materials for Biological Applications.* – 2013. – Vol. 33 (5). – P. 2550–2554.
76. Gandhi, M. Mechanistic examination of protein release from polymer nanofibers / M. Gandhi, R. Srikar, A. L. Yarin et al. // *Mol. Pharm.* – 2009. – Vol. 6 (2). – P. 641–647.
77. Sidorov, V. N. Method of production of tritium labeled organic compounds and the device for its implementation. Patent SU 1823961 A3 / V. N. Sidorov, Yu. V. Polak, P. P. Laktionov, V. V. Roshcke, A. G. Kist. – Priority from 18. 01.1991.

78. Megelski, S. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers / S. Megelski, J. S. Stephens, D. B. Chase et al. // *Macromolecules*. –2002. – Vol. 35 (22). – P. 8456–8466.
79. Mintz, G. S. Features and parameters of drug-eluting stent deployment discoverable by intravascular ultrasound / G. S. Mintz // *Am. J. Cardiol.* –2007. – Vol. 100 (8), Suppl. 2. – S26–S35.
80. Son, Y. J. Multilayered electrospun fibrous meshes for restenosis-suppressing metallic stents / Y. J. Son, H. S. Kim, D. H. Choi et al. // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials*. – 2015. – Vol. 105 (3). – P. 628–634.
81. Locker, Ch. Multiple arterial grafts improve survival with coronary artery bypass graft surgery versus conventional coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary interventions / Ch. Locker, H. V. Schaff, R. C. Daly et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2016. – Vol. 152 (2). – P. 369–379.
82. Goodney, Ph. P. National trends in lower extremity bypass surgery, endovascular interventions, and major amputations / Ph. P. Goodney, A. W. Beck, J. Nagle et al. // *J. Vasc. Surg.* –2009. –Vol. 50 (1). – P. 54–60.
83. Sheiban, I. Next-generation drug-eluting stents in coronary artery disease: focus on everolimus-eluting stent (Xience V®) / I. Sheiban, G. Villata, M. Bollati et al. // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2008. – Vol. 4 (1). – P. 31–38.
84. Koster, R. Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent restenosis / R. Koster, D. Vieluf, M. Kiehn et al. // *Lancet*. – 2000. – Vol. 356 (9245). –P. 1895–1897.
85. Dake, M. Nitinol stents with polymer-free paclitaxel coating for lesions in the superficial femoral and popliteal arteries above the knee: twelve-month safety and effectiveness results from the Zilver PTX single-arm clinical study / M. Dake, D. Scheinert, G. Tepe et al. // *J. Endovasc. Ther.* – 2011. – Vol. 18 (5). – P. 613–623.
86. Lansky, A. J. Non-polymer-based paclitaxel-coated coronary stents for the treatment of patients with de novo coronary lesions: angiographic follow-up of the

- DELIVER clinical trial / A. J. Lansky, R. A. Costa, G. S. Mintz et al. // *Circulation*. –2004. –Vol. 109 (16). –P. 1948–1954.
87. Honda, Y. Novel drug delivery stent: intravascular ultrasound observations from the first human experience with the QP2-eluting polymer stent system / Y. Honda, E. Grube, L. M. De la Fuente et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104 (4). –P. 380–383.
88. Aguilar, L. E. On-demand drug release and hyperthermia therapy applications of thermoresponsive poly-(NIPAAm-co-HMAAm)/polyurethane core-shell nanofiber mat on non-vascular nitinol stents / L. E. Aguilar, Amin Ghavami Nejad, Chan Hee Park et al. // *Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 13. – P. 527–538.
89. Stone, G. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent / G. Stone, S. Ellis, D. Cox et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109 (16). – P. 1942–1947.
90. Radke, P. W. Outcome after treatment of coronary in-stentrestenosis: results from a systematic review using meta-analysis techniques / P. W. Radke, A. Kaiser, C. Frost et al. // *Eur. Heart J*. – 2003. – Vol. 24 (3). – P. 266–273.
91. Hong, M. K. Paclitaxel coating reduces in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the Asian paclitaxel-eluting stent clinical trial (ASPECT) / M. K. Hong, G. S. Mintz, C. W. Lee et al. // *Circulation*. –2003. –Vol. 107 (4). – P. 517–520.
92. Axel, D. I. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery / D. I. Axel, W. Kunert, C. Göggelmann et al. // *Circulation*. – 1997. – Vol. 96 (2). – P. 636–645.
93. Yusuf, R. Z. Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation / R. Z. Yusuf, Z. Duan, D. E. Lamendola et al. // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2003. – Vol. 3 (1). – P. 1–19.
94. Heldman, A. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis / A. Heldman, L. Cheng, M. Jenkins et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol. 103 (18). – P. 2289–2295.

95. Parmon, V. N. Modern approaches to the study and description of the processes of drying porous bodies / V. N. Parmon. – Novosibirsk : Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2001. – 300 p.
96. Shen, M. PEO-like plasma polymerized tetraglyme surface interactions with leukocytes and proteins: in vitro and in vivo studies / M. Shen, L. Martinson, M.S.Wagner et al. // J. Biomater. Sci. Polymer Edition. – 2002. – Vol.13 (4). – P. 367–390.
97. Peppas, N. A. Mathematical models in drug delivery: how modeling has shaped the way we design new drug delivery systems / N. A. Peppas, B. Narasimhan // J. Control. Release. – 2014. – Vol. 190. – P. 75–81.
98. Grube, E. Prevention of distal embolization during coronary angioplasty in saphenous vein grafts and native vessels using porous filter protection / E. Grube, U. Gerckens, A. C. Yeung et al. // Circulation. – 2001. – Vol. 104 (20). – P. 2436–2441.
99. Nakano, Y. Propensity score matched lesion-based comparison of long-term clinical and angiographic outcomes after placement of sirolimus (Cypher Bx Velocity) and paclitaxel (TAXUS Express)-eluting stents for de novo native coronary stenosis / Y. Nakano, T. Ishikawa, Sh. Hino et al. // Cardiovasc. Interv. Ther. – 2014. – Vol. 29 (2). – P. 93–101.
100. Purcell, M. Interaction of taxol with human serum albumin / M. Purcell, J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. –Vol.1478 (1). – P. 61–68.
101. Stone, G. Randomized comparison of everolimus- and paclitaxel-eluting stents: 2-year follow-up from the SPIRIT (Clinical Evaluation of the XIENCE V everolimus eluting coronary stent system) IV Trial / G. Stone, A. Rizvi, K. Sudhir et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2011. – Vol. 58 (1). – P. 19–25.
102. Chevalier, B. Randomized comparison of the Nobori Biolimus A9-eluting coronary stent with the Taxus Liberte paclitaxel-eluting coronary stent in patients with stenosis in native coronary arteries: the NOBORI 1 trial – phase 2 / B.

- Chevalier, S. Silber, S.-J. Park et al. // *Circulation: Cardiovasc. Interv.* – 2009. – Vol.2 (3). – P. 188–195.
103. Colombo, A. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions / A. Colombo, J. Drzewiecki, A. Banning et al. // *Circulation.* – 2003. – Vol. 108 (7). – P. 788–794.
104. Güneş, H. Rare complication of diagnostic coronary angiography: Perforation / H. Güneş, Ö. Şahin, H. A. Bolayır et al. // *Int. J. Cardiovasc. Acad.* – 2017. –Vol. 3 (1). – P. 45–47.
105. Mauri, L. Rationale and design of the dual antiplatelet therapy study, a prospective, multicenter, randomized, double-blind trial to assess the effectiveness and safety of 12 versus 30 months of dual antiplatelet therapy in subjects undergoing percutaneous coronary intervention with either drug-eluting stent or bare metal stent placement for the treatment of coronary artery lesions / L. Mauri, D. J. Kereiakes, S. L. Normand et al. // *Am. Heart J.* – 2010. – Vol. 160 (6). –P. 1035–1041.
106. Kei, A. A. Review: Antiplatelet drugs: what comes next? / A. A. Kei, M. Florentin, D. P. Mikhailidis et al. // *Clin. App. Thrombosis/Hemostasis.* – 2011. – Vol. 17 (1). – P. 9–26.
107. Richheimer, S. L. High-performance liquid chromatographic assay of taxol / S. L. Richheimer, M. Tinnermeier, D. W. Timmons // *Anal. Chem.* – 1992. –Vol. 64 (20). – P. 2323–2326.
108. Otsuka, Y. Scanning electron microscopic analysis of defects in polymer coatings of three commercially available stents: comparison of BiodivYsio, Taxus and Cypher stents / Y. Otsuka, N. A. Chronos, R. P. Apkarian et al. // *J. Invasive Cardiol.* – 2007. – Vol. 19 (2). – P. 71–76.
109. Kedhi, E. Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial / E. Kedhi, K. Sh. Joesoef, E. Fadden et al. // *Lancet.* – 2010. – Vol. 375 (9710). – P. 201–209.

110. Seo, E. H. Polyurethane membrane with porous surface for controlled drug release in drug eluting stent / E. H. Seo, K. Na // *Biomater. Res.* – 2014. – Vol. 18, art. 15. – P. 1–5.
111. Simamora, P. Solubilization of rapamycin / P. Simamora, J. M. Alvarez, S. H. Yalkowsky // *Int. J. Pharm.* – 2001. – Vol. 213 (1/2). – P. 25–29.
112. Singh, R. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins / R. Singh, S. H. Singh, J. W. Lillard // *J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 97 (7). – P. 2497–2523.
113. Vetrovec, G. Sirolimus PK trial: a pharmacokinetic study of the sirolimus-eluting Bx velocity stent in patients with de novo coronary lesions / G. Vetrovec, D. Rizik, C. Williard et al. // *Catheter. Cardiovasc. Interv.* – 2006. – Vol. 67 (1). – P. 32–37.
114. Schofer, J. Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS) / J. Schofer, M. Schlüter, A. Gershlick et al. // *Lancet.* – 2003. – Vol. 362 (9390). – P. 1093–1099.
115. Moses, J. Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery / J. Moses, M. Leon, J. Popma et al. // *New Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P. 1315–1322.
116. Levin, A. D. Specific binding to intracellular proteins determines arterial transport properties for rapamycin and paclitaxel / A. D. Levin, N. Vukmirovic, Ch. W. Hwang et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2004. – Vol. 101 (25). – P. 9463–9467.
117. Stoney, R. J. The arterial autograft / R. J. Stoney, D. P. Connelly // *Vasc. Surgery.* – 1995. – Vol. 67 (1). – P. 475–481.
118. Chernonosova, V. S. Study of hemocompatibility and endothelial cell interaction of tecoflex-based electrospun vascular grafts / V. S. Chernonosova, A. A. Gostev, Y. A. Chesalov et al. // *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* – 2019. – Vol. 68 (1/3). – P. 34–43.

119. Adipurnama, I. Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review / I. Adipurnama, M.-Ch. Yang, T. Ciach et al. // *Biomaterials Science*. –2017. – Vol. 5, (1). –P. 22–37.
120. Janjic, M. Surface modification of endovascular stents with rosuvastatin and heparin-loaded biodegradable nanofibers by electrospinning / M. Janjic, F. Pappa, V. Karagkiozaki et al. // *Int. J. Nanomed*. –2017. –Vol. 12. – P. 6343–6355.
121. Grube, E. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions / E. Grube, S. Silber, K. E. Hauptmann et al. // *Circulation*. –2003. – Vol. 107 (1). – P. 38–42.
122. Schampaert, E. The Canadian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRIUS) / E. Schampaert, E. Cohen, M. Schluter et al. // *J. Am. Coll. Cardiol*. – 2004. –Vol. 43 (6). – P. 1110–1115.
123. Kuznetsov, K. A. Vascular stents coated with electrospun drug-eluting material: functioning in rabbit iliac artery / K. A. Kuznetsov, I. S. Murashov, V. S. Chernonosova et al. // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12 (8) : 1741.