



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159>
УДК 616.1-77-089.844:544.777:547.995.17:577.11]-092.9

Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ

Е.О. Кривкина, А.В. Миронов, А.Р. Шабает, Е.А. Великанова, М.Ю. Ханова, А.В. Синицкая, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Аннотация

Тканеинженерные сосудистые протезы, разрабатываемые для протезирования артерий малого диаметра, помимо высокой биосовместимости и сохранения своей проходимости после имплантации в сосудистое русло, должны также обладать пригодностью для формирования на своей основе новообразованной ткани, максимально соответствующей нативной сосудистой ткани.

Цель: оценка результатов долгосрочной проходимости биodeградируемых сосудистых протезов с атромбогенным лекарственным покрытием на модели крупных лабораторных животных.

Материал и методы. Сосудистые протезы диаметром 4 мм были изготовлены методом электроспиннинга из полимерной композиции 5% полигидросибутирата/валериата (PHBV) и 10% поликапролактона (PCL) и комплекса проангиогенных факторов (GFmix): сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы (SDF-1 α). Для повышения тромборезистентных свойств графтов была проведена атромбогенная модификация поверхности части изготовленных протезов гепарином и илопростом. Модифицированные протезы были имплантированы в сонную артерию овец сроком на 12 мес. Группа с аутоартериальной имплантацией выступила в качестве контроля.

Результаты. Спустя 12 мес. имплантации проходимость аутоартериальных трансплантатов составила 87,5%. Проходимость PHBV/PCL/GFmix с гепарином и илопростом по окончании срока имплантации достигла 50%. Биodeградируемый каркас модифицированных протезов практически полностью резорбировался с образованием аневризм на всем протяжении. В модифицированных протезах обнаружено наличие основных элементов новообразованной сосудистой ткани и отмечено отсутствие кальция в стенках протезов.

Заключение. Полученные результаты показали, что биodeградируемые сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix^{Нер/Ило} обладают высокой долгосрочной проходимостью, что позволяет считать их пригодными для формирования на их основе новообразованной сосудистой ткани. Однако в связи с наличием факта аневризмобразования требуется проведение дополнительного укрепления каркаса протеза и повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности.

Ключевые слова:	сосудистые протезы, гемосовместимость, электроспиннинг, гепарин, илопрост, проангиогенные факторы.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации № 075-15-2022-1202 от 30 сентября 2022 г., заключенного в целях реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р.
Для цитирования:	Кривкина Е.О., Миронов А.В., Шабает А.Р., Великанова Е.А., Ханова М.Ю., Синицкая А.В., Антонова Л.В., Барбараш Л.С. Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2023;38(1):152–159. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-152-159 .

Кривкина Евгения Олеговна, e-mail: leonora92@mail.ru.

Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis

Evgeniya O. Krivkina, Andrey V. Mironov, Amin R. Shabaev,
Elena A. Velikanova, Mariam Yu. Khanova, Anna V. Sinitskaya,
Larisa V. Antonova, Leonid S. Barbarash

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”,
6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Tissue-engineered vascular prostheses developed for prosthesis of small-diameter arteries have high biocompatibility and coverage of their patency after implantation into the vascular bed, and should also show a high probability of forming on their basis a newly formed tissue that is largely susceptible to native vascular tissue.

Aim: To evaluate the expected patency of biodegradable vascular prostheses with athrombogenic drug coating in large laboratory animal models.

Material and Methods. Vascular prostheses Ø 4 mm were fabricated by electrospinning from a polymer composition of 5% polyhydroxybutyrate/valerate (PHBV) and 10% polycaprolactone (PCL) and a complex of proangiogenic tissues (GFmix): vascular endothelial growth (VEGF), rare fibroblast growth (bFGF) and chemoattractant molecule (SDF-1 α). To induce thromboresistant properties of grafts, an athrombogenic modification of the surface of parts of the fabricated prostheses with heparin and iloprost was carried out. Modified prostheses were implanted in the carotid artery for a period of 12 months. The group with autoarterial implantation acted as a control.

Results. In 12 months after implantation, the patency of auto-arterial grafts was 87.5%. The patency of PHBV/PCL/GFmix with heparin and iloprost reached 50% at the time of implantation. The biodegradable frame made of reinforced prostheses was almost completely resorbed with the formation of aneurysms throughout. In the modified prostheses, the main elements of the newly formed vascular tissue are present. There is no formation in the walls of the prostheses.

Conclusion. The results showed that biodegradable vascular prostheses PHBV/PCL/GFmix^{hep/ilo} have a high final patency, which allows us to consider them suitable for the formation of newly formed vascular tissue on their basis. However, due to the aneurysm formation, a long-term execution of the bone tissue of the prosthesis and the thrombogenic properties of the inner surface are required.

Keywords:	vascular prostheses, hemocompatibility, electrospinning, heparin, iloprost, pro-angiogenic factors.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the Agreement on the provision of grants from the federal budget in the form of subsidies in accordance with paragraph 4 of Article 78.1 of the Budget Code of the Russian Federation №075-15-2022-1202 dated September 30, 2022, concluded to implement the Order of the Russian Federation Government dated May 11, 2022 No. 1144-r.
For citation:	Krivkina E.O., Mironov A.V., Shabaev A.R., Velikanova E.A., Khanova M.Yu., Sinitskaya A.V., Antonova L.V., Barbarash L.S. Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2023;38(1):151–159. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159 .

Введение

В связи с постоянным ростом частоты развития атеросклероза во всем мире возрастает также и количество хирургических вмешательств по восстановлению эффективного кровотока в поврежденных кровеносных сосудах посредством их протезирования или наложения шунтов [1]. Нехватка аутологичных кровеносных сосудов ведет к поиску альтернатив для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Сосудистая тканевая инженерия является перспективным направлением для создания новых эффективных сосудистых протезов [2–4]. Все подходы сосудистой тканевой инженерии направлены на создание высокопористого сосудистого протеза, обеспечивающего формирование ткани, идентичной нативным кровеносным сосудам человека. Высокая пористость стенки протеза и является важной характеристикой сосудистого протеза, обеспечивающей свободную миграцию клеток из кровотока и окру-

жающих тканей, а также поддерживающей прикреплению, пролиферацию и дифференцировку клеток в сосудистом направлении. Проангиогенные факторы и хемоаттрактантные молекулы, инкорпорированные в состав протеза в процессе его изготовления, способны стимулировать формирование полноценной новообразованной сосудистой ткани на месте имплантации сосудистого протеза [5]. Однако протез с такой конструкцией может вызвать тромбоз, поэтому для предотвращения тромбообразования поверхность тканеинженерного высокопористого сосудистого протеза можно модифицировать антитромботическими и антибактериальными препаратами [6].

Модифицирование тканеинженерных протезов проангиогенными факторами и дополнительная модификация их поверхности лекарственными препаратами с антиагрегантной и антикоагулянтной активностью позволяет повысить долгосрочную проходимость и качество ремоделирования [5, 6]. Таким образом, альтернативой сосудистого аналога артерий и вен малого диаметра может стать функционально активный биodeградируемый сосудистый протез, обладающий пролонгированной резорбцией и способный замещаться во времени собственными клетками и тканями пациента, формируя на месте каркаса новый сосуд [7–10].

Материал и методы

Изготовление тканеинженерных сосудистых протезов

Тканеинженерные сосудистые каркасы диаметром 4 мм изготавливали методом двухфазного электроспиннинга на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония) из композиции полимеров 5% поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV; Sigma-Aldrich, США) и 10% поли(ε-капролактона) (poly-ε-caprolactone; PCL; Sigma-Aldrich, США) в хлороформе, с включением в состав биологически активных молекул (GFmix), а именно: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF; Sigma-Aldrich, США) включенный в 1/3 внутренней стенки протеза, основной фактор роста фибробластов (bFGF; Sigma-Aldrich, США) и хемоаттрактантная молекула (SDF-1α; Sigma-Aldrich, США) – во внешние 2/3 стенки протеза.

Модификация поверхности сосудистых протезов антикоагулянтами и антиагрегантами

Для увеличения тромборезистентности поверхности изготовленных сосудистых протезов была проведена дополнительная поверхностная антитромботическая модификация по собственной оригинальной методике [11]. В качестве антитромботических лекарственных средств использовались антиагрегант илопрост (Ilo) и антикоагулянт нефракционированный гепарин (Hep).

На внутренней поверхности изготовленных полимерных каркасов методом радиационной прививочной полимеризации создавалось гидрогелевое покрытие из поливинилпирролидона (polyvinylpyrrolidone, PVP) для связывания лекарственных средств посредством комплексообразования. Для этого протез погружали на 30 мин в 10% раствор PVP в этиловом спирте с концентрацией 25%. После этого протез извлекали из раствора PVP и сушили в горизонтальном положении в течение 24 ч. Затем проводили полимеризацию PVP к поверхности сосудистого протеза посредством ионизирующего излучения с общей поглощенной дозой 15 кГр с использованием им-

пульсного линейного ускорителя ИЛУ-10 с энергией пучка 5МэВ 50 кВТ (производитель – Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Россия). Выбранная доза ионизирующего излучения позволила одновременно провести и модифицирование, и стерилизацию сосудистых протезов, поэтому дальнейшее формирование лекарственного покрытия проводили в стерильных условиях. Позже в стерильных условиях к гидрогелевому покрытию из PVP методом комплексообразования присоединяли антиагрегант илопрост (Ilo) и нефракционированный гепарин (Hep) [11].

В итоге были получены опытные образцы биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo}.

Имплантация сосудистых протезов

Изготовленные сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} длиной 40 мм диаметром 4 мм были имплантированы в сонную артерию восьми овец эдильбаевской породы по методике «конец в конец» по схеме: 1 животное – 1 протез. Срок имплантации – 12 мес.

Для оценки проходимости имплантированных трансплантатов было проведено ультразвуковое исследование с функцией доплера на аппарате M7 Premium (Mindray, Китай): 1 и 5 сут, 1, 3, 6, 9 и 12 мес. после имплантации – для проходимых сосудистых протезов; 1 и 5 сут – для тромбированных протезов.

Послеоперационное медикаментозное ведение: антибиотикотерапия (аксетин (цефуросим) 1,5 г – в/м 2 р/сут + энксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл в течение 5 дней. При доказанной проходимости биodeградируемых протезов: клопидогрел 75 мг перорально 1 р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2 р/сут) – в течение 1 мес.

Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы сосудистых протезов были окрашены на гематоксилин-эозин и по Ван-Гизону. Новообразованную ткань, сформированную на основе сосудистых протезов, окрашенных на гематоксилин-эозин и по Ван-Гизону, оценивали в сравнении с эксплантированными контралатеральными интактными сонными артериями.

Эксплантированные образцы фиксировали в 10% забуференном формалине в течение суток, после для удаления излишков фиксирующего раствора промывали в проточной воде, затем обезжировали в 6 порциях IsoPrep (BioVitrum, Россия). Пропитывали образцы парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 мин в каждой порции. Пропитанные образцы заливали в тугоплавкий парафин ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США). Изготовленные образцы подсушивали в термостате в течение ночи при 37 °С. Затем образцы депарафинизировали в 3 порциях о-ксилоле в течение 1–2 мин в каждой и дегидратировали в 3 порциях 96% спирта по 1–2 мин. Далее депарафинированные срезы окрашивали в соответствии с протоколом исследования. Образцы исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива ×50, ×100 и ×200.

Иммунофлуоресцентное исследование

Эксплантированные участки сосудистых протезов и контралатеральных интактных сонных артерий овец замораживали при температуре –120 °С. Замороженные

образцы фиксировали в криосреде Tissue-Tek (Sakura, Япония) и изготавливали срезы толщиной 8 мкм на криостате CryoStar NX50 (Thermo Scientific, США). Затем проводили непрямо флуоресцентное окрашивание изготовленных срезов на CD31, vWF (von Willebrand factor), α -actin, collagen I, III, IV типа (Abcam, Англия). Ядра клеток контрастировали DAPI (Sigma, США). Контрольные образцы готовили аналогично опытным, но вместо первичных антител использовали 1% BSA. Готовые стекла заключали в ProLong (Life Technologies, США) под покровное стекло. Изготовленные препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Анализ уровня мРНК

Для выделения РНК были отобраны образцы сосудистых протезов и интактных сонных артерий, эксплантированных из экспериментальных животных. Пробоподготовку проводили по ранее описанной методике [12]. Выделение общей РНК осуществляли при помощи коммерческого набора RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Качество и количество выделенной РНК оценивали на приборе Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, США). Оцен-

ку экспрессии генов (*IL1B*, *IL6*, *VEGFA*, *CXCL8*, *CXCR4*, *NR2F2*, *SNAI2*, *ICAM1*, *YAP1*, *KDR*, *FGF2*, *MMP2*) проводили методом кПЦР с обратной транскрипцией. В качестве референсных использовали гены АСТВ, GAPDH, B2M. Уровень генов интереса рассчитывали по методу Δ Ct и 2- $\Delta\Delta$ Ct, значения выражали в условных единицах (у.е.).

Результаты и обсуждение

Результаты ультразвукового исследования с функцией доплера

По результатам ультразвукового исследования с функцией доплера проходимость сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} через 1 сут после имплантации в сонную артерию овец составила 62,5% (5 из 8) (рис. 1). По окончании срока имплантации (12 мес.) проходимыми оставались 50,0% имплантированных протезов (4 из 8). Однако во всех проходимых протезах уже через 1,5 мес. имплантации обнаружена тенденция к увеличению диаметра с четкими признаками формирования аневризматического расширения по всей длине протеза через 6 мес. наблюдения. Вследствие аневризмобразования диаметр протезов спустя 12 мес. имплантации увеличился до 2,4 см (см. рис. 1).



Рис. 1. Результаты ультразвукового исследования с функцией доплера проходимости протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo}
Fig. 1. The results of an ultrasound examination with the Doppler function of the patency of the PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} prostheses

Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований

Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований эксплантированных образцов протезов и контралатеральных сонных артерий выявили, что биодеградируемый каркас PHBV/PCL/GFmix^{Hep/IIo} практически полностью резорбировался с образованием аневризм на всем протяжении протеза (рис. 2). На его месте выявлено формирование трехслойного новообразованного сосуда, схожего по своему строению с нативной сонной артерией овцы. На внутренней стороне неоинтимы новообразованного сосуда визуализировался слой эндотелиоподобных клеток (см. рис. 2).

Медиа представлена клетками, по морфологии схожими с гладкомышечными. За гладкомышечным слоем следовал слой соединительной ткани и адвентиция, тол-

ща которой содержала в себе фибробластоподобные и гигантские многоядерные клетки, большое количество новообразованных сосудов, лимфатические фолликулы, а также небольшое количество периваскулярной жировой ткани. Однако новообразованная сосудистая ткань отличалась от интактной сонной артерии овцы отсутствием эластических волокон и четкой вытянутости цитоплазмы гладкомышечных клеток. Также в эндотелиальных клетках новообразованного эндотелиального монослоя на внутренней поверхности PHBV/PCL/GFmix с лекарственным покрытием выявлены признаки эндотелиально-мезенхимального перехода (одновременная экспрессия эндотелиальными клетками CD31, vWF и α -актина) (см. рис. 2).

Базальная мембрана содержала коллаген I и IV типа. Коллаген III типа также обнаружен в стенке ремоделированного протеза (рис. 3).

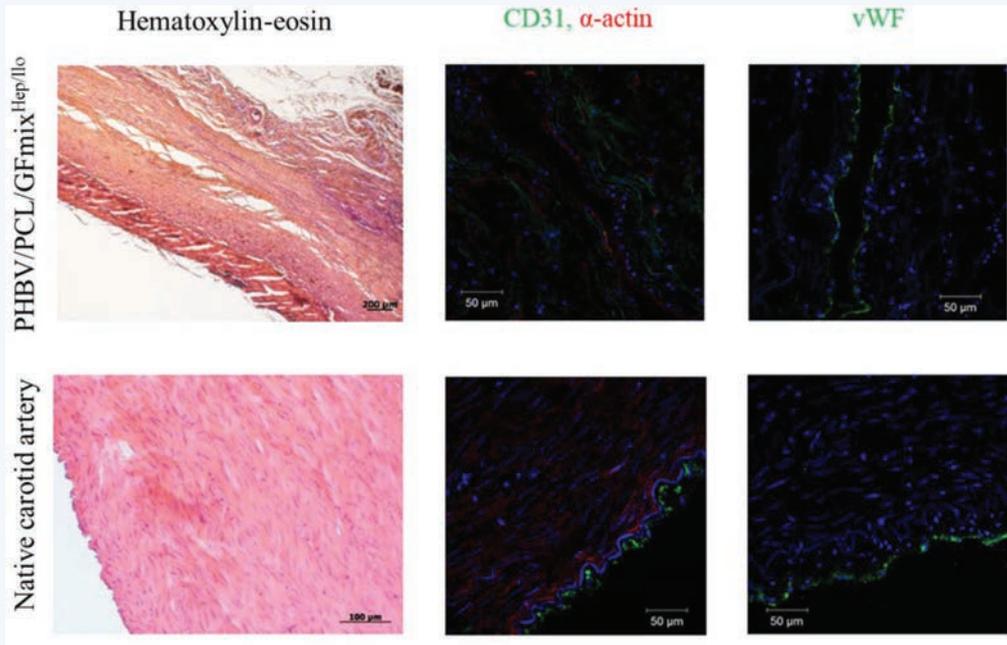


Рис. 2. Сравнение результатов гистологического и иммунофлуоресцентного исследований протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и интактной сонной артерии овцы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$. Окраска на CD31 (зеленое свечение), α -actin (красное свечение), vWF (зеленое свечение), $\times 200$

Fig. 2. Comparison of the results of histological and immunofluorescence studies of PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo prostheses and intact sheep carotid artery. Hematoxylin-eosin staining, $\times 50$. Staining for CD31 (green glow), α -actin (red glow) and vWF (green glow), $\times 200$

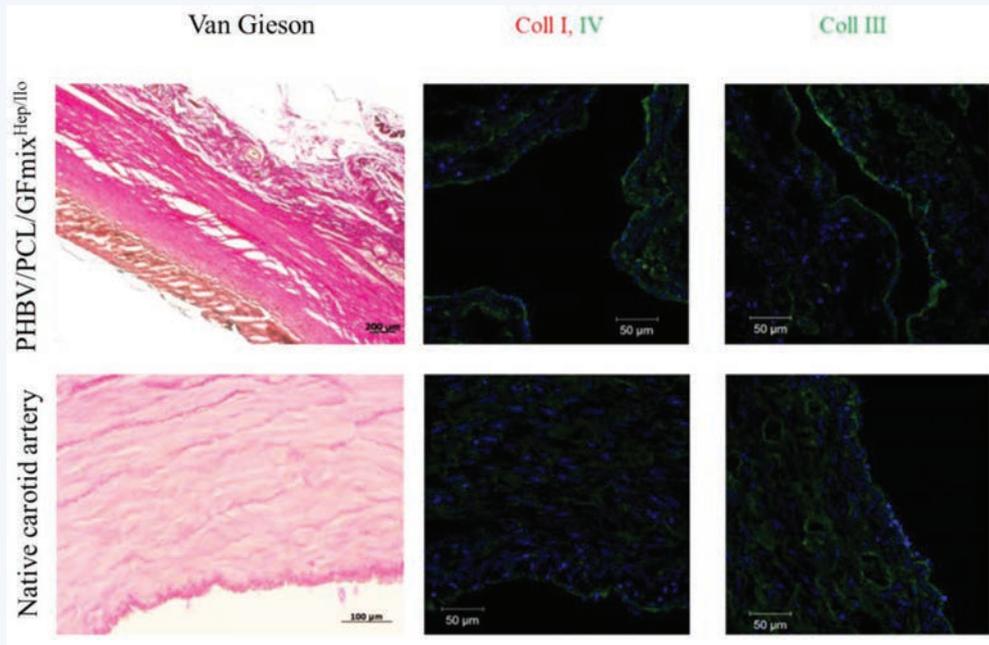


Рис. 3. Сравнение результатов гистологического и иммунофлуоресцентного исследований протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и нативной артерии овцы. Окраска по Ван-Гизону, $\times 50$. Окраска на Collagen I, III, IV (зеленое свечение), $\times 200$

Fig. 3. Comparison of the results of histological and immunofluorescent studies of prostheses and native sheep arteries. Coloring according to Van-Gieson, $\times 50$. Coloring for Collagen I, III, IV (green glow), $\times 200$

Результаты оценки профиля экспрессии генов

Сравнительный анализ профиля генной экспрессии в гомогенатах ткани, полученных из ремоделированного сосудистого протеза, характеризовался обилием транскриптов, связанных с воспалением (*IL1B*, *IL6* и *CXCL8*),

ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса (*MMP2*) и эндотелиально-мезенхимальным переходом (*SNAI2*), чего не наблюдали в контралатеральной сонной артерии овцы. Эндотелиальный лизат был обогащен воспалительными транскриптами (*IL1B*, *IL6* и *ICAM1*) и признаками репрограммирования эндотелия (венозный

транскрипт *NR2F2* и маркер эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI2*) (табл. 1, 2). В связи с этим можно предположить, что молекулярный ландшафт сосудистой ткани, формирующейся на месте биодеградируе-

мого сосудистого протеза, может отличаться от соответствующих кровеносных сосудов даже при регенерации артерий в долгосрочной перспективе (12 мес. после имплантации).

Таблица 1. Транскрипционный профиль регенерированных на месте сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и intactных контралатеральных сонных артерий через 12 мес. после имплантации: уровень экспрессии в условных единицах $m \pm SD$

Table 1. Transcriptional profile of in situ regenerated vascular prostheses PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo and intact contralateral carotid arteries 12 months after implantation: expression level in conventional $m \pm SD$ units

Ген Gene	Интactная сонная артерия (гомогенат) Intact carotid artery (homogenate)	Графт (гомогенат) Graft (homogenate)	Интactная сонная артерия (смыв) Intact carotid artery (flush)	Графт (смыв) Graft (flush)
IL1B	0,000186 ± 0,000055	0,000594 ± 0,000713	0,000579 ± 0,000073	0,005530 ± 0,001007
IL6	0,001678 ± 0,000702	0,001533 ± 0,000900	0,001058 ± 0,000170	0,003976 ± 0,000091
CXCL8	0,000689 ± 0,000332	0,001904 ± 0,000379	0,001928 ± 0,002761	0,004351 ± 0,000618
IL10	-	-	-	-
IL12A	-	-	-	-
IL12B	-	-	-	-
TNF	-	-	-	-
IFNG	-	-	-	-
CXCR4	0,017592 ± 0,005557	0,025238 ± 0,018372	0,062432 ± 0,002754	0,047241 ± 0,012453
NOS3	-	-	-	-
VEGFA	0,023848 ± 0,009059	0,019827 ± 0,011576	0,006904 ± 0,003760	0,006484 ± 0,001813
FGF2	0,070019 ± 0,016891	0,013054 ± 0,003294	0,015252 ± 0,006000	0,012227 ± 0,003214
TGFB	-	-	-	-
ICAM1	0,020364 ± 0,018289	0,006392 ± 0,001281	0,005075 ± 0,001121	0,004993 ± 0,001278
MMP2	0,084705 ± 0,034208	1,134578 ± 1,216459	0,006230 ± 0,004468	0,051311 ± 0,002237
KDR	0,057268 ± 0,052768	0,017468 ± 0,005699	0,002294 ± 0,000830	-
YAP1	0,173951 ± 0,063811	0,032772 ± 0,032010	0,012259 ± 0,003241	0,007270 ± 0,001915
NR2F2	0,012703 ± 0,010607	0,007789 ± 0,002543	0,000684 ± 0,001160	0,000958 ± 0,000214
SNAI2	0,156352 ± 0,072169	0,176597 ± 0,172171	0,001378 ± 0,000674	0,014902 ± 0,003125

Таблица 2. Транскрипционный профиль регенерированных на месте сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo и intactных контралатеральных сонных артерий через 12 мес. после имплантации: относительный уровень экспрессии (кратность изменения относительно контроля)

Table 2. Transcriptional profile of in situ regenerated PHBV/PCL/GFmixHep/Ilo vascular prostheses and intact contralateral carotid arteries 12 months after implantation: relative expression level (fold change relative to control)

Ген Gene	Интactная сонная артерия (гомогенат) Intact carotid artery (homogenate)	Графт (гомогенат) Graft (homogenate)	Интactная сонная артерия (смыв) Intact carotid artery (flush)	Графт (смыв) Graft (flush)
IL1B	1	3,19	1	9,55
IL6	1	0,91	1	3,76
CXCL8	1	2,76	1	2,26
IL10	-	-	-	-
IL12A	-	-	-	-
IL12B	-	-	-	-
TNF	-	-	-	-
IFNG	-	-	-	-
CXCR4	1	1,43	1	0,76
NOS3	-	-	-	-
VEGFA	1	0,83	1	0,94
FGF2	1	0,19	1	0,80
TGFB	-	-	-	-
ICAM1	1	0,31	1	0,98
MMP2	1	13,39	1	8,24
KDR	1	0,31	1	-
YAP1	1	0,19	1	0,59
NR2F2	1	0,61	1	1,40
SNAI2	1	1,13	1	10,81

Обсуждение

Несмотря на активные усилия по разработке биодеградируемого сосудистого протеза малого диаметра, обладающего биосовместимостью, прочностью, способностью к адаптивному росту и устойчивостью к развитию

кальцификации, текущие достижения в этой области ограничены экспериментальными прототипами, демонстрирующими в лучшем случае 50% первичную проходимость в долгосрочном периоде (например, через 1 год после имплантации) [13, 14].

Одним из популярных подходов создания тканеинженерных сосудистых протезов является выращивание нового здорового сосуда на базе функционально активного каркаса, способного задавать привлекаемым клеткам вектор развития в сторону формирования новообразованной сосудистой ткани. При этом каркас протеза в идеале может полностью рассасываться во времени. При этом для эффективной биофункционализации сосудистых протезов очень важно понимать синергизм взаимодействий биологически активных компонент, которые вводятся в состав протеза.

В НИИ КПССЗ был разработан и протестирован в условиях *in vitro* и в экспериментах *in vivo* на мелких лабораторных животных сосудистый протез диаметром 1,5 мм, изготовленный из биodeградируемых полимеров полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) и содержащий в своем составе проангиогенные факторы: VEGF, bFG и SDGF-1a, послойно инкорпорированных в стенку протеза в процессе электроспиннинга. VEGF был призван активировать и поддерживать миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку эндотелиальных клеток, увеличивать продукцию оксида азота и усиливать сосудистую проницаемость. bFGF ответственен за миграцию, пролиферацию и выживание эндотелиальных и гладкомышечных клеток, обеспечение созревания кровеносных сосудов. SDF-1a является хемоаттрактантом, поэтому способен усиливать миграцию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые могут дифференцироваться в гладкомышечном направлении внутри сосудистой стенки. Проприетарность разработанных протезов спустя 12 мес. имплантации в аорту крысы близилась к 100%. Заселение клетками пористой стенки биodeградируемого протеза после его имплантации в сосудистое русло происходило благодаря естественным процессам ремоделирования имплантата с формированием трехслойной новообразованной сосудистой ткани, схожей со строением стенки нативного сосуда. Было доказано образование устойчивого эндотелиального монослоя, что является критичным моментом для обеспечения долгосрочной эффективности протезов после их имплантации в сосудистое русло [15].

Данные обнадеживающие результаты сподвигли на проведение преclinical испытаний разработанных сосудистых протезов на модели крупных лабораторных животных. В качестве модели выбраны овцы, которые обладают схожей с человеком физиологией сердечно-сосудистой системы, особенно механизмов гемостаза. Считается, что овцы пригодны для моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к тромбозу и кальцификации, что позволяет провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов [16]. Плюс на модели, приближенной к человеку, гораздо эффективнее выявлять весь спектр возможных рисков несостоятельности разрабатываемого изделия; в нашем случае как минимум потому, что в сосудистое русло овцы можно вшить гораздо более длинный протез, который не сможет так же быстро эндотелиализоваться, как на модели крысы. В итоге на двух животных моделях получены настолько разные и неожиданные результаты, что в дальнейшем пришлось значительно менять технологию изготовления протеза.

Так, в пилотных исследованиях на овцах в 100% случаев в раннем послеоперационном периоде получен тромбоз биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix, не содержащих лекарственного покрытия. Запуск тромбообразования, по-видимому, был спровоцирован пористостью внутренней поверхности протеза [17]. Исходя из этого, нами был разработан подход поверхностного модифицирования протезов антикоагулянтом нефракционированным гепарином и антиагрегантом илопростом с целью повышения гемосовместимых свойств протезов [11], что повысило проходимость протезов с 0 до 50%.

Также ранее нами было определено, что само оперативное вмешательство на столь агрессивной в плане тромбообразования животной модели способно внести свою лепту в итоговую проходимость оперированного сосуда. С этой целью была выполнена аутоартериальная имплантация с выводом животных из эксперимента через год. Выявлено, что полную проходимость реоперированные сонные артерии сохраняли только в 87,5% случаев [17]. Таким образом, оперативное вмешательство способно дополнительно снижать процент проходимости оперированных сосудов в 12,5% случаев.

Вторая неожиданная находка заключалась в крайне быстрой резорбции полимерного каркаса сосудистого протеза, что привело к аневризмообразованию всех проходимых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} с лекарственным покрытием. Начало формирования аневризм зафиксировано спустя 1,5 мес. имплантации. Апогей аневризмообразования пришелся на период 6 мес. имплантации с последующей стабильной картиной в последующие 6 мес. наблюдения за имплантированными сосудистыми протезами. В литературе имеются сообщения об ускоренной деградации полимерных каркасов у овец по сравнению с крысами или другими животными моделями [18]. Мы получили аналогичные результаты на модели овцы, хотя в наших собственных предшествующих экспериментах на модели крысы даже спустя 12 мес. имплантации аналогичные протезы сохраняли свою начальную геометрию, а скорость биорезорбции полимеров, полученная нами в экспериментах *in vivo*, соответствовала литературным данным [5, 19.]

Таким образом, несмотря на то, что биodeградируемый сосудистый протез PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} показал высокую биосовместимость и пригодность для замещения новообразованной сосудистой тканью без инициации процессов воспаления и кальцификации, разработанная конструкция требует укрепления внешнего каркаса и дополнительного повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности с целью достижения 100% проходимости в долгосрочной перспективе.

Заключение

Результаты проведенного исследования продемонстрировали хорошую пригодность сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Illo} с лекарственным покрытием для формирования на его основе новообразованной сосудистой ткани, которая оказалась очень схожей по морфологии с протезируемой сонной артерией овцы. Однако в связи с наличием факта аневризмообразования требуется проведение дополнительного укрепления каркаса протеза и повышения атромбогенных свойств внутренней поверхности.

Литература / References

1. Husain M.J., Datta B.K., Kostova D., Joseph K.T., Asma S., Richter P. et al. Access to cardiovascular disease and hypertension medicines in developing countries: an analysis of essential medicine lists, price, availability, and affordability. *J. Am. Heart Assoc.* 2020;9(9):e015302. DOI: 10.1161/JAHA.119.015302.
2. Naegeli K.M., Kural M.H., Li Y., Wang J., Hugentobler E.A., Niklason L.E. Bioengineering human tissues and the future of vascular replacement. *Circ. Res.* 2022;131:109–126. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319984.
3. Iwaki R., Shoji T., Matsuzaki Y., Ulziibayar A., Shinoka T. Current status of developing tissue engineering vascular technologies. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2022;22:433–440. DOI: 10.1080/14712598.2021.1960976.
4. Wei Y., Wang F., Guo Z., Zhao Q. Tissue-engineered vascular grafts and regeneration mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2022;165:40–53. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2021.12.010.
5. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Matveeva V.G. et al. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2018;7(2):25–36. DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-86-96.
6. Matsuzaki Y., Ulziibayar A., Shoji T., Shinoka T. Heparin-eluting tissue-engineered bioabsorbable vascular grafts. *Appl. Sci.* 2021;11:4563. DOI: 10.3390/app11104563.
7. Stowell C.E.T., Li X., Matsunaga M.H., Cockreham C.B., Kelly K.M., Cheetham J. et al. Resorbable vascular grafts show rapid cellularization and degradation in the ovine carotid. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020;14(11):1673–1684. DOI: 10.1002/term.3128.
8. L'Heureux N., McAllister T.N., de la Fuente L.M. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(14):1451–1453. DOI: 10.1056/NEJMc071536.
9. Matsuzaki Y., Miyamoto S., Miyachi H., Iwaki R., Shoji T., Blum K. et al. Improvement of a novel small-diameter tissue-engineered arterial graft with heparin conjugation. *Ann. Thorac. Surg.* 2021;111:1234–1241. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2020.06.112.
10. Zhu T., Gu H., Ma W., Qiu Z., Du J., Chen S. et al. A fabric reinforced small diameter tubular graft for rabbits' carotid artery defect. *Composites. Part B: Engineering.* 2021;225:109274. DOI: 10.1016/j.compositesb.2021.109274.
11. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А., Кривкина Е.О., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л. и др. Технология изготовления функционально активных биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием: пат. 2702239. Заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) (RU); № 2019119912; заявл. 25.06.2019; опубл. 07.10.2019, Бюл. № 28. [Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Rezvova M.A., Krivkina E.O., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L. et al. Manufacturing technology of functionally active biodegradable vascular prostheses of small diameter with drug coating: Pat. 2702239. Applicant and patent holder Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases" (NII KPSSZ) (RU); No. 2019119912; dec. 06/25/2019; publ. 07.10.2019, Bull. No. 28. (In Russ.)].
12. Антонова Л.В., Кривкина Е.О., Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Миронов А.В. и др. Результаты преклинических испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели овцы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2022;24(3):80–93. [Antonova L.V., Krivkina E.O., Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Mironov A.V. et al. Results of preclinical trials in a sheep model of biodegradable small-diameter vascular grafts. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2022;24(3):80–93. (In Russ.)]. DOI: 10.15825/1995-1191-2022-3-80-93.
13. Fang S., Ellman D.G., Andersen D.C. Review: Tissue engineering of small-diameter vascular grafts and their in vivo evaluation in large animals and humans. *Cells.* 2021;10:713. DOI: 10.3390/cells10030713.
14. Durán-Rey D., Crisóstomo V., Sánchez-Margallo J.A., Sánchez-Margallo F.M. Systematic review of tissue-engineered vascular grafts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:771400. DOI: 10.3389/fbioe.2021.771400.
15. Antonova L., Kutikhin A., Sevostianova V., Velikanova E., Matveeva V., Glushkova T. et al. bFGF and SDF-1 α improve in vivo performance of VEGF-incorporating small-diameter vascular grafts. *Pharmaceuticals.* 2021;14:302. DOI: 10.3390/ph14040302.
16. Koch S.E., de Kort B.J., Holshuisen N., Brouwer H.F.M., van der Valk D.C., Dankers P.Y.W. et al. Animal studies for the evaluation of in situ tissue-engineered vascular grafts – a systematic review, evidence map, and meta-analysis. *NPJ Regen. Med.* 2022;7:17. DOI: 10.1038/s41536-022-00211-0.
17. Antonova L.V., Mironov A.V., Yuzhalin A.E., Krivkina E.O., Shabaev A.R., Rezvova M.A. et al. A brief report on an implantation of small-caliber biodegradable vascular grafts in a carotid artery of the sheep. *Pharmaceuticals.* 2020;13:101. DOI: 10.3390/ph13050101.
18. Fukunishi T., Ong C.S., Yesantherao P., Best C.A., Yi T., Zhang H. et al. Different degradation rates of nanofiber vascular grafts in small and large animal models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2020;14:203–214. DOI: 10.1002/term.2977.
19. Насонова М.В., Шишкова Д.К., Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л. и др. Результаты субкутанной имплантации полимерных матриц на основе поликапролактона и полигидроксипропирилатов, модифицированных ростовыми факторами. *Соврем. технол. мед.* 2017;2:7–18. [Nasonova M.V., Shishkova D.K., Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L. et al. Results of subcutaneous implantation of polymer matrices based on polycaprolactone and polyhydroxybutyrate modified by growth factors. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2017;2:7–18. (In Russ.)]. DOI: 10.17691/stm2017.9.2.01.

Информация о вкладе авторов

Кривкина Е.О. – разработка дизайна исследования, изготовление сосудистых протезов, гистологическое исследование эксплантированных образцов сосудистых протезов, литературный поиск, анализ литературы, написание статьи.

Миронов А.В. – имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ полученных результатов.

Шабеев А.Р. – имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ полученных результатов.

Великанова Е.А. – работы по проведению иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных образцов сосудистых протезов, анализ и интерпретация данных.

Ханова М.Ю. – работы по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овец, анализ и интерпретация данных.

Синицкая А.В. – проведение экспериментов (анализ генной экспрессии), анализ и интерпретация данных.

Антонова Л.В. – руководство работой, разработка дизайна исследования, работы по проведению научного исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи.

Барбараш Л.С. – руководство работой, разработка дизайна исследования, экспертиза окончательного варианта статьи.

Information on author contributions

Krivkina E.O. – study design development, vascular prosthesis fabrication, histological examination of explanted samples of vascular prostheses, literature search and analysis, article writing.

Mironov A.V. – implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, results analysis.

Shabaev A.R. – implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, results analysis.

Velikanova E.A. – work on the immunofluorescence study of explanted samples of vascular prostheses, data analysis and interpretation.

Khanova M.Yu. – work on the implantation of vascular prostheses in the carotid artery of sheep, data analysis and interpretation.

Sinitskaya A.V. – conducting experiments (analysis of gene expression), data analysis and interpretation.

Antonova L.V. – head of work, development of research design, work on conducting scientific research, data analysis and interpretation, writing an article.

Barbarash L.S. – head of work, development of research design, revision of the final version of the article.

Сведения об авторах

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Миронов Андрей Владимирович, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8846-5077.

E-mail: a.mir.80@mail.ru.

Шабает Амин Рашитович, младший научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9734-8462.

E-mail: shabar@kemcardio.ru.

Великанова Елена Анатольевна, научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Ханова Марьям Юрисовна, младший сотрудник, лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: khanovam@gmail.com.

Синицкая Анна Викторовна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Антонова Лариса Валерьевна, д-р мед. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antonova.la@mail.ru.

Барбараш Леонид Семенович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-2814-4300.

E-mail: reception@kemcardio.ru.

 **Кривкина Евгения Олеговна**, e-mail: leonora92@mail.ru.

Information about the authors

Evgeniya O. Krivkina, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Andrei V. Mironov, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8846-5077.

E-mail: a.mir.80@mail.ru.

Amin R. Shabaev, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-9734-8462.

E-mail: shabar@kemcardio.ru.

Elena A. Velikanova, Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Maryam Y. Khanova, Junior Research Scientist, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8826-9244.

E-mail: khanovam@gmail.com.

Anna V. Sinitskaya, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: cepoav1991@gmail.com.

Larisa V. Antonova, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Cellular Technologies, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-8874-0788.

E-mail: antonova.la@mail.ru.

Leonid S. Barbarash, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Leading Research Scientist, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases". ORCID 0000-0002-2814-4300.

E-mail: reception@kemcardio.ru.

 **Evgeniya O. Krivkina**, e-mail: leonora92@mail.ru.

Поступила 10.11.2022

Received November 10, 2022