



<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-250-259>
УДК 616.133-089-74-092.9:591.4:599.735.52

Морфологические особенности ремоделирования биологических и тканеинженерных сосудистых заплат: результаты испытаний на модели овцы

Е.С. Прокудина, Е.А. Сенокосова, Л.В. Антонова, Р.А. Мухамадияров,
В.А. Кошелев, Е.О. Кривкина, Е.А. Великанова, Н.А. Кочергин

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

Аннотация

Одним из способов реконструкции артериальной стенки является эндартерэктомия с использованием сосудистой заплаты. Применение протезов сосудистой стенки, изготовленных из существующих материалов, может приводить к возникновению осложнений с необходимостью реоперации. Актуален поиск новых материалов для изготовления сосудистых заплат, обладающих оптимальной совместимостью со стенкой сосуда.

Цель: изучить динамику и сравнить морфологические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых заплат из фиброина шелка (ФШ) и биологических лоскутов из ксеноперикарда (КП), имплантированных в стенку сонной артерии овец.

Материал и методы. Матрицы из 15% раствора ФШ ($n = 2$) изготавливали методом электроспиннинга. Для сравнения использовали лоскуты из бычьего перикарда ($n = 2$). Сосудистые заплаты имплантировали овцам в стенку сонной артерии сроком на 2 и 6 мес. Проводили гистологическое исследование эксплантированных образцов, сканирующую электронную микроскопию и конфокальную микроскопию со специфической иммунофлуоресцентной окраской препаратов.

Результаты. На основе имплантированной ФШ-заплаты сформировалась неоинтима и неоадвентиция. Спустя 2 мес. имплантации ФШ-матрикс сохранил свою структуру; через 6 мес. наблюдалась умеренная биодеградация материала с замещением собственной тканью сосуда. Участков кальцификации и массивного воспаления не обнаружено. Спустя 6 мес. выявлена гиперплазия неоинтимы в проекции имплантированной ФШ-заплаты. На основе имплантированного КП-лоскута также сформировалась неоинтима и неоадвентиция. Через 2 мес. выявлено расслоение имплантированного КП. Спустя 6 мес. обнаружена гиперплазия неоинтимы в проекции КП-заплаты.

Заключение. Ремоделирование ФШ-заплат и КП-лоскута, имплантированных в стенку сонной артерии овцы, шло по пути формирования трехслойной структуры, напоминающей архитектуру собственной стенки сосуда, с признаками умеренной биодеградации материала. Гиперплазия неоинтимы объясняется недостаточной комплаентностью артериальной стенки и заплаты, что требует совершенствования состава имплантированного матрикса.

Ключевые слова:	фиброин шелка, тканевая инженерия, сосудистая заплата, ксеноперикард, сонная артерия, неоинтима, гиперплазия.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0003 «Разработка новых изделий медицинского назначения для сердечно-сосудистой хирургии. Переход к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Создание систем обработки больших объемов данных, машинного обучения и искусственного интеллекта» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты».
Соответствие принципам этики:	работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 6 от 30.06.2022 г.).

Для цитирования:

Прокудина Е.С., Сенокосова Е.А., Антонова Л.В., Мухамадияров Р.А., Кошелев В.А., Кривкина Е.О., Великанова Е.А., Кочергин Н.А. Морфологические особенности ремоделирования биологических и тканеинженерных сосудистых заплат: результаты испытаний на модели овцы. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2023;38(4):250–259. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-250-259>.

Morphological features of biological and tissue-engineered vascular patches remodeling: results of tests on a sheep model

Ekaterina S. Prokudina, Evgeniia A. Senokosova, Larisa V. Antonova,
Rinat A. Mukhamadiyarov, Vladislav A. Koshelev, Evgeniia O. Krivkina,
Elena A. Velikanova, Nikita A. Kochergin

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

One of the ways to reconstruct the arterial wall is endarterectomy with a vascular patch. The use of vascular wall prostheses made from existing materials can lead to complications with the need for reoperation. The search for new materials for the manufacture of vascular patches that have optimal compatibility with the vessel wall is still relevant.

Aim: To study the dynamics and compare the morphological features of remodeling of tissue-engineered vascular patches from silk fibroin (SF) and biological xenopericardium (XP) flaps implanted into the wall of the sheep carotid artery.

Material and Methods. Matrices from a 15% SF solution ($n = 2$) were prepared by electrospinning. For comparison, bovine pericardial flaps were used ($n = 2$). Vascular patches were implanted into the wall of the carotid artery in sheep for 2 and 6 months. A histological examination of explanted samples of vascular patches, scanning electron microscopy and confocal microscopy with specific immunofluorescent staining of the preparations were performed.

Results. Based on the implanted SF-patch, neointima and neoadventitia were formed. After 2 months of implantation, the SF-matrix retained its structure; after 6 months, there were signs of moderate biodegradation of the material with the replacement of the vessel wall with its own tissue. There were no areas of calcification or massive inflammation. After 6 months, neointimal hyperplasia was detected in the projection of the implanted SF-patch. Based on the implanted XP-flap, neointima and neoadventitia were also formed. After 2 months, delamination of the implanted XP was revealed. After 6 months, neointimal hyperplasia was found in the projection of the XP-patch.

Conclusion. Remodeling of the SF-patches and XP-flaps implanted into the wall of the sheep carotid artery followed the formation of a three-layer structure resembling the architecture of the vessel's own wall, with signs of moderate biodegradation of the material. Neointimal hyperplasia is explained by insufficient compliance of the arterial wall and the patch and requires improvement in the composition of the implanted matrix.

Keywords:

silk fibroins, tissue engineering, vascular scaffold, xenopericardium, carotid artery, neointima, hyperplasia.

Conflict of interest:

the authors do not declare a conflict of interest.

Financial disclosure:

the work was supported by the comprehensive program of fundamental scientific research of the Russian Academy of Sciences within the framework of the fundamental theme of the Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases No. 0419-2022-0003 "Development of new medical devices for cardiovascular surgery. The transition to personalized medicine and high-tech healthcare. Creation of systems for processing large volumes of data, machine learning and artificial intelligence" with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the national project "Science and Universities".

Adherence to ethical standards:

the study was approved by the local ethical committee of Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases" (protocol 6 from 30.06.2022).

For citation:

Prokudina E.S., Senokosova E.A., Antonova L.V., Mukhamadiyarov R.A., Koshelev V.A., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Kochergin N.A. Morphological features of biological and tissue-engineered vascular patches remodeling: results of tests on a sheep model. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2023;38(4):250–259. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-4-250-259>.

Введение

Распространенность атеросклероза с каждым годом неуклонно растет во всем мире [1]. Образование атеросклеротических бляшек в стенке сонных артерий приводит к их стенозу и необходимости проведения каротидной эндартерэктомии с закрытием артериотомного дефекта сосудистой заплатой [2]. Сосудистые заплаты изготавливают из материалов природного и синтетического происхождения [3, 4]. Недостаточная комплаентность материала заплаты и стенки сосуда может приводить к воспалению в области имплантации, кальцификации, тромбозу, гиперплазии неоинтимы и рестенозу с необходимостью повторной операции [5]. Поиск и разработка новых материалов с целью изготовления сосудистых заплат для артериальной реконструкции является актуальной задачей.

Фиброин шелка (ФШ) является природным материалом с хорошей биосовместимостью [6]. Ранее в экспериментах *in vitro* нами были изучены его физико-механические характеристики, гемосовместимость и матриксные свойства, сопоставимые с таковыми для нативных сосудов [7]. Для более полной оценки биологических свойств ФШ как материала, пригодного для изготовления сосудистых заплат, необходимо исследование на экспериментальной модели лабораторного животного.

Цель работы: изучить динамику и сравнить морфологические особенности ремоделирования сосудистых заплат из ФШ и лоскутов из ксеноперикарда (КП), имплантированных в стенку сонной артерии овец.

Материал и методы

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 6 от 30.06.2022 г.).

Экспериментальное исследование выполнено с включением 4 случаев имплантации сосудистых заплат из ФШ ($n = 2$) и лоскутов из КП ($n = 2$) в сонную артерию овец. Сроки наблюдения за животными и вывода из эксперимента составили 2 и 6 мес. для каждого типа протезов.

Заплаты изготавливали методом электроспиннинга в магнитном поле на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония) из 15% регенерированного ФШ, растворенного в гексафторпропанол. Стерилизацию образцов, а также перевод материала в водонерастворимую форму проводили в 70% этиловом спирте. Для сравнения использовали биологические лоскуты коммерческого производства из бычьего перикарда (Кем-Периплас Нео, ЗАО «Неокор», Россия), которые широко применяются в сосудистой хирургии.

В качестве экспериментальной модели выбраны несутящие самки овец эдильбаевской породы массой 40–45 кг. Сосудистые протезы имплантировали в сонную артерию овцам последовательно, в соответствии с протоколом, описанным ранее [8]. Размер заплат – 40 × 4 мм. Спустя 2 и 6 мес. животных выводили из эксперимента

с последующей эксплантацией артериальных заплат. Проводили гистологическое исследование (ГИ), сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) и конфокальную микроскопию с иммунофлуоресцентным окрашиванием образцов.

Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы заплат подготавливали для ГИ в соответствии с ранее описанной методикой [8]. Для обзорного ГИ срезы образцов окрашивали гематоксилином Гарриса (БиоВитрум, Россия) и эозином (БиоВитрум, Россия). Для оценки коллагенизации исследуемых образцов срезы окрашивали по Ван Гизону, последовательно помещая в растворы гематоксилина Вейгерта (БиоВитрум, Россия) и пикрофуксина (БиоВитрум, Россия). Для идентификации присутствия кальция срезы окрашивали ализариновым красным С (Химсервис, Россия) с окраской ядер клеток DAPI (Sigma-Aldrich, США). Окрашенные срезы заливали монтирующей средой (БиоВитрум, Россия) и накрывали покровным стеклом. Образцы исследовали с использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении × 50, × 100 и × 200.

Сканирующая электронная микроскопия

Образцы эксплантированных заплат для СЭМ подготавливали по ранее описанной методике [8]. Исследуемые образцы окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95% этаноле, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США), далее шлифовали и полировали эпоксидные блоки на установке TegraPol-11 (Struers, США). Образцы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. После этого на поверхность эпоксидных блоков напыляли углерод (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры поверхности образцов выполняли в процессе СЭМ в обратно-рассеянных электронах на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Иммунофлуоресцентное исследование и конфокальная микроскопия

Образцы для иммунофлуоресцентного окрашивания подготавливали в соответствии с ранее описанной методикой [8]. В качестве первичных антител были выбраны: кроличьи антитела к CD31 (Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к α-актину гладкомышечных клеток (ГМК) (α-SMA, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда (vWF, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену IV типа (Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к коллагену I типа (Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену III типа (Novus Biologicals, США), мышинные антитела к эластину (SigmaAldrich, США). В качестве вторичных антител использовали: антитела козы к IgG кролика, конь-

югированные с Alexa Fluor 488-conjugated (Thermo Fisher, США), и антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 555-conjugated (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления автофлуоресценции срезы обрабатывали Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, США). Ядра контрастировали при помощи DAPI (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, США). Окрашенные препараты заключали под покровное стекло с использованием монтирующей среды ProLong (Thermo Fisher, США). Препараты анализировали с помощью сканирующего лазерного конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных

Анализ полученных данных проводили с помощью программы Jampvi (версия 2.3, Сидней, Австралия). Для проверки типа распределения количественных признаков использовали критерий Шапиро – Уилка. Для выявления межгрупповых различий применяли однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный тест Тьюки.

Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Количественные данные представлены в виде среднего, стандартного отклонения и 95% доверительного интервала $M \pm SD$ [5%; 95%].

Результаты

Результаты имплантации ФШ-заплат в сонную артерию овцы

Морфологическое исследование (ГИ и СЭМ) эксплантационных образцов ФШ-заплат после 2 мес. имплантации показало сохранность структуры материала: определялись неизменные волокна фиброина. Расслоения в толще матрикса были незначительные, обусловленные, вероятно, воздействием на материал в процессе приготовления гистологических срезов. На внутренней поверхности ФШ-матрикса сформировалась неоинтима, которая имела равномерную толщину на всем протяжении заплаты (таблица, рис. 1).

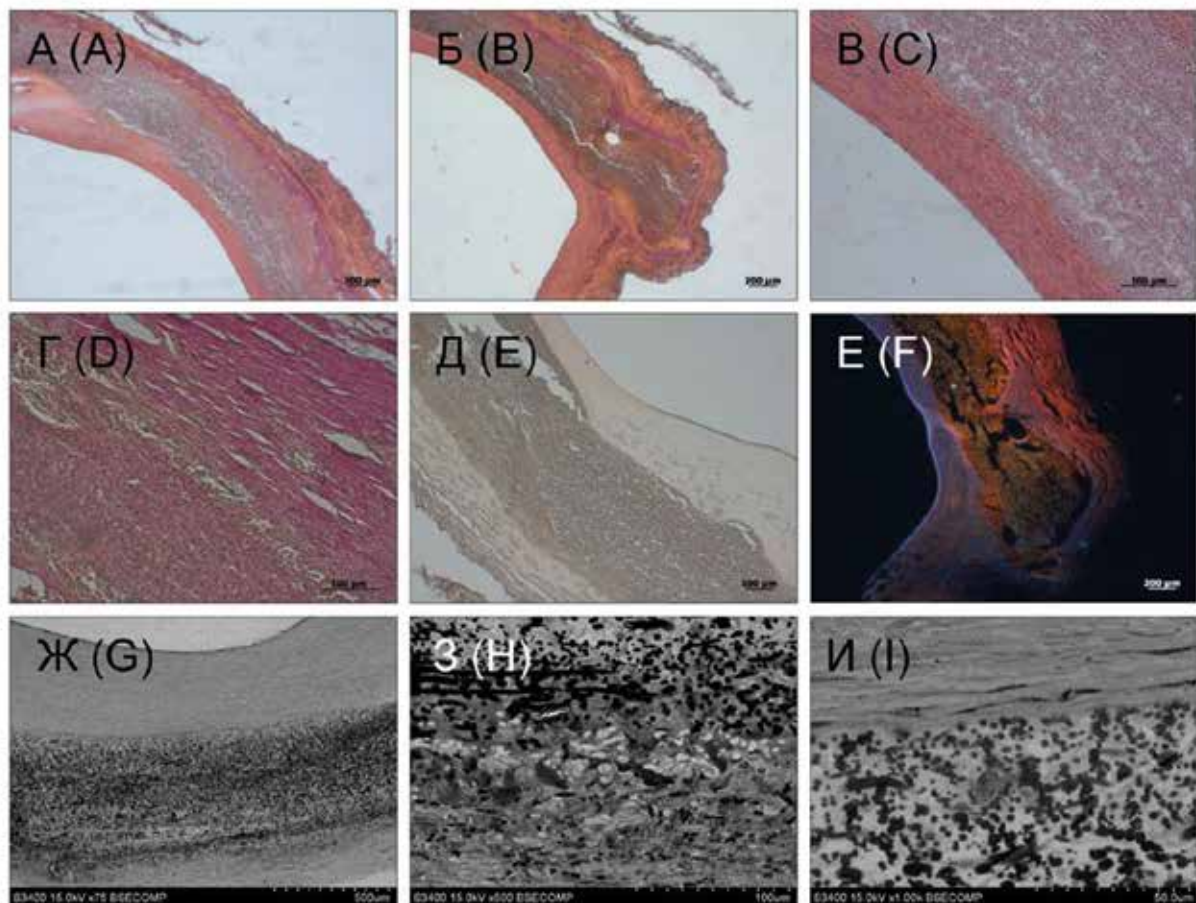


Рис. 1. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии ФШ-заплат (спустя 2 мес. имплантации): А – В – окраска гематоксилин + эозин, увеличение $\times 50$, $\times 100$; Г – окраска по Ван Гизону, увеличение $\times 100$; Д – окраска ализариновым красным С, увеличение $\times 100$; Е – флуоресцентный снимок, окраска ядер клеток Dapi, увеличение $\times 50$; Ж – И – снимки сканирующей электронной микроскопии: Ж – общий вид участка среза сонной артерии с имплантированной ФШ-заплатой, увеличение $\times 75$; З – участок перехода между ФШ-заплатой и неоадвентицией, увеличение $\times 500$; И – участок перехода между неоинтимой и ФШ-заплатой, увеличение $\times 1000$

Fig. 1. Results of histological examination and scanning electron microscopy (SEM) of SF-patch (after 2 months of implantation): A – C – hematoxylin + eosin staining, magnification $\times 50$, $\times 100$; D – Van Gieson staining, magnification $\times 100$; E – staining with alizarin red C, magnification $\times 100$; F – fluorescent image, staining of Dapi cell nuclei, magnification $\times 50$; G – I – SEM images: G – general view of the section of the carotid artery with an implanted SF-patch, magnification $\times 75$; H – area of transition between the SF-patch and neoadventitia, magnification $\times 500$; I – the area of transition between the neointima and the SF-patch, magnification $\times 1000$

Таблица. Толщина неоинтимы и неoadвентиции на разных сроках имплантации сосудистых заплат из фиброина шелка и ксеноперикарда
Table. Neointima and neoadventitia thickness at different stages of implantation of vascular patches from SF and XP

Сосудистый слой Vascular layer	ФШ-заплата SF-patch		КП-лоскут XP-flap	
	2 мес. 2 months	6 мес. 6 months	2 мес. 2 months	6 мес. 6 months
Неоинтима, мкм Neointima, μm	$48,4 \pm 5,99$ [43,4; 53,4]	831 ± 108 [741; 921]*	$20,2 \pm 1,69$ [18,8; 21,6]	696 ± 131 [586; 806]# °
Неoadвентиция, мкм Neoadventitia, μm	$41,0 \pm 7,81$ [34,4; 47,5]	140 ± 18 [125; 155]*	$17,2 \pm 1,57$ [15,9; 18,5]	181 ± 18 [132; 229]#

Примечание: ФШ – фиброин шелка, КП – ксеноперикард, * – статистически значимые различия по сравнению с «ФШ-заплата, 2 мес.» ($p < 0,05$), # – статистически значимые различия по сравнению с «КП-лоскут, 2 мес.» ($p < 0,05$), ° – статистически значимые различия по сравнению с «ФШ-заплата, 6 мес.» ($p < 0,05$).

Note: SF – silk fibroin, XP – xenopericardium, * – statistically significant differences compared to «SF-patch, 2 months» ($p < 0.05$), # – statistically significant differences compared to «XP-flap, 2 months» ($p < 0.05$), ° – statistically significant differences compared to «SF-patch, 6 months» ($p < 0.05$).

Эндотелиоподобные клетки (ЭПК), экспрессирующие vWF, непрерывным слоем покрывали всю поверхность неоинтимы, обращенную в просвет сосуда (рис. 2).

Неоинтима образована клетками с положительной окраской на α -актин. Эластиновые волокна не определялись (см. рис. 2). Коллагены III и IV типов пропитывают неоинтиму, в толще заплата представлены слабо (см. рис. 2). Клеточность заплата низкая в центральной части с увеличением в зонах, приближенных к анастомозам. Коллагеновые волокна III и IV типов выявлены преимущественно во внешней соединительнотканной капсуле, сформировавшейся вокруг заплата со стороны адвентиции (см. рис. 2). Неoadвентиция ярко выражена, наполнена фибробластоподобными клетками (см. таблицу, рис. 1). В толще заплата на границе с неoadвен-

тицией обнаруживались клетки воспалительного ряда с включенными в цитоплазму волокнами фиброина, единичные гигантские многоядерные клетки инородных тел, а также новообразованные кровеносные капилляры (см. рис. 1). В целом признаки биodeградации ФШ выражены незначительно, материал заплата демонстрирует структурную стабильность. Участков кальцификации не обнаружено.

Спустя 6 мес. имплантации ФШ-матрикса на его основе сформировалась полноценная трехслойная сосудистая ткань (рис. 3). Неоинтима была значительно гиперплазирована, ее толщина в проекции заплата была достоверно больше, чем на сроке 2 мес. (см. таблицу). Со стороны просвета сосуда неоинтима покрыта слоем ЭПК, экспрессирующих vWF (см. рис. 2, 3).

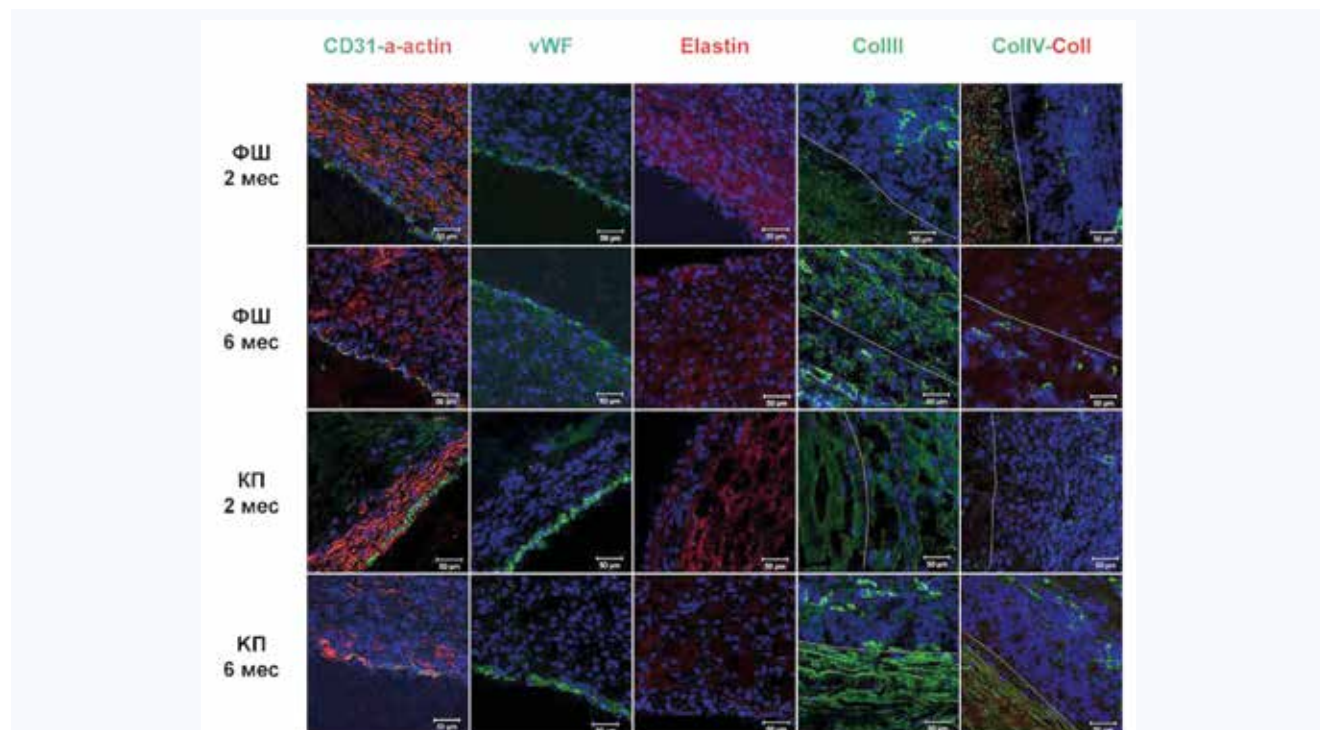


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов ФШ-запат и КП-лоскутов: CD31 (зеленый), α -актин гладкомышечных клеток (красный), эластин (красный), коллаген III типа (зеленый), коллаген IV типа (зеленый), коллаген I типа (красный). Ядра клеток докрашены DAPI (синий). Масштабная линейка 50 мкм. Линии на микрофотографиях разграничивают область заплата и область адвентиции

Fig. 2. Immunofluorescent staining of samples of SF-patches and XP-flaps: CD31 (green), α -SMA (red), elastin (red), type III collagen (green), type IV collagen (green), type I collagen (red). Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar 50 μm . The lines in the micrographs demarcate the patch area and the adventitia area

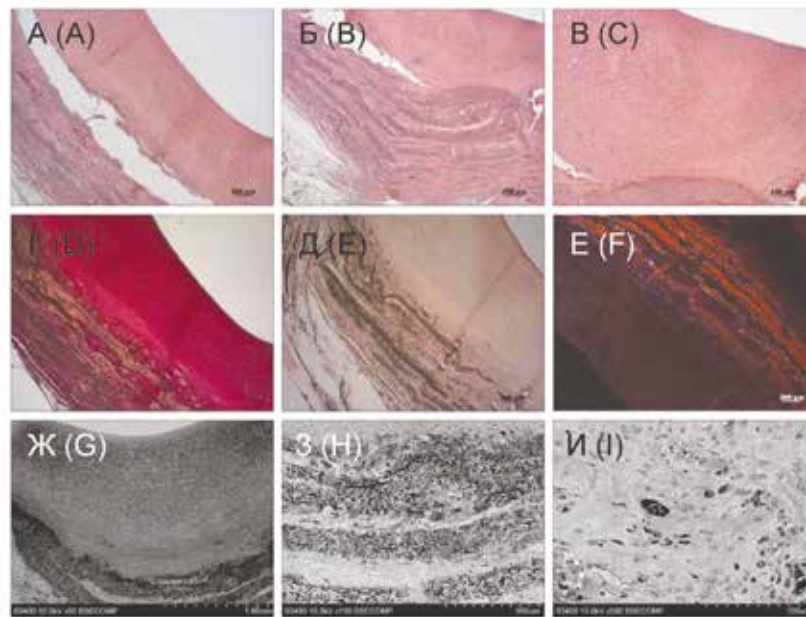


Рис. 3. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии ФШ-заплат (спустя 6 мес. имплантации): А – В – окраска гематоксилин + эозин, увеличение $\times 50$, $\times 100$; Г – окраска по Ван Гизону, увеличение $\times 50$; Д – окраска ализариновым красным С, увеличение $\times 50$; Е – флюоресцентный снимок, окраска ядер клеток Dapi, увеличение $\times 50$; Ж – И – снимки сканирующей электронной микроскопии: Ж – общий вид участка среза сонной артерии с имплантированной ФШ-заплатой, увеличение $\times 50$; З – участок перехода между неоинтимой и ФШ-заплатой, увеличение $\times 150$; И – зона анастомоза с единичными новообразованными кровеносными капиллярами, увеличение $\times 500$
 Fig. 3. Results of HE and SEM of the SF-patch (after 6 months of implantation): А – В – hematoxylin + eosin staining, magnification $\times 50$, $\times 100$; Д – Van Gieson staining, magnification $\times 50$; Е – staining with alizarin red C, magnification $\times 50$; F – fluorescent image, staining of Dapi cell nuclei, magnification $\times 50$; G – I – SEM images: G – general view of the section of the carotid artery with an implanted SF-patch, magnification $\times 50$; H – area of transition between the neointima and the SF-patch, magnification $\times 150$; I – anastomotic zone with single newly formed blood capillaries, magnification $\times 500$

Основную толщу неоинтимы составляли ГМК-подобные клетки, экспрессирующие α -актин (см. рис. 2). Через 6 мес. признаки ремоделирования ФШ-заплат были выражены в большей степени, чем спустя 2 мес. имплантации – она была представлена расходящимися пластами фиброина, между которыми располагалась вновь сформированная ткань стенки сосуда (см. рис. 3).

Имплантированный ФШ-матрикс был наполнен клеточными элементами (макрофаги, фибробластоподобные и ГМК-подобные клетки, немногочисленные гигантские многоядерные клетки инородного тела), между которыми располагались пучки коллагеновых волокон. Кроме того, в толще ФШ-заплат и в области анастомозов обнаруживались вновь образованные *vasa vasorum* (см. рис. 3). В неоадвентиции наблюдались все характерные для нее элементы: коллагеновые волокна, фибробластоподобные клетки, немногочисленные гигантские многоядерные клетки инородного тела, лимфоциты и *vasa vasorum*. Толщина неоадвентиции была в 3,4 раза больше, чем на сроке имплантации 2 мес. (см. таблицу, рис. 2, 3).

Таким образом, ремоделирование ФШ-заплат шло по пути формирования трехслойной структуры, повторяющей нормальную стенку сонной артерии овцы. Постепенная биодеградация ФШ сопровождалась замещением собственной тканью стенки сосуда. Гиперплазия неоинтимы в проекции имплантированной ФШ-заплат, вероятно, объясняется недостаточной комплаентностью материала и стенки артерии и требует дальнейшего поиска оптимального состава тканеинженерного матрикса.

Результаты имплантации КП-лоскутов в сонную артерию овцы

ГИ и СЭМ КП-лоскута после 2 мес. имплантации в стенку сонной артерии овцы показали, что материал сохранил характерную для бычьего перикарда коллагеновую структуру, отмечалось расслоение стенки заплаты по всей ее длине (рис. 4).

Толщина неоинтимы в проекции КП-лоскута достоверно не отличалась от таковой для ФШ-заплат (см. таблицу, рис. 4). Эндотелизация внутренней поверхности неоинтимы проходила менее качественно – обнаруживались участки отсутствия монослоя ЭПК (см. рис. 4). Клетки эндотелия на всем протяжении экспрессировали vWF (см. рис. 2). В толще неоинтимы обнаружены α -актин-содержащие клетки, а также диффузно расположенные волокна коллагена III и IV типов (см. рис. 2). Наполненность клетками заплаты низкая, волокна эластина не визуализировались (см. рис. 2, 4). Неоадвентиция в среднем наполнена фибробластоподобными клетками, встречались единичные гигантские многоядерные клетки инородных тел, присутствовали в небольшом количестве коллагеновые волокна III и IV типов (см. таблицу, рис. 2, 4). На границе прилегания неоадвентиции к КП-заплате, а также в области анастомозов обнаруживались немногочисленные *vasa vasorum*. Кроме того, зона стыка КП-лоскута и собственной ткани артерии окружена валом клеток воспалительного ряда (см. рис. 4).

Спустя 6 мес. имплантации КП-лоскут сохранил свою структуру, несмотря на участки расслоения, которые наблюдались в области прилегания к неоинтиме и неоадвентиции (рис. 5).

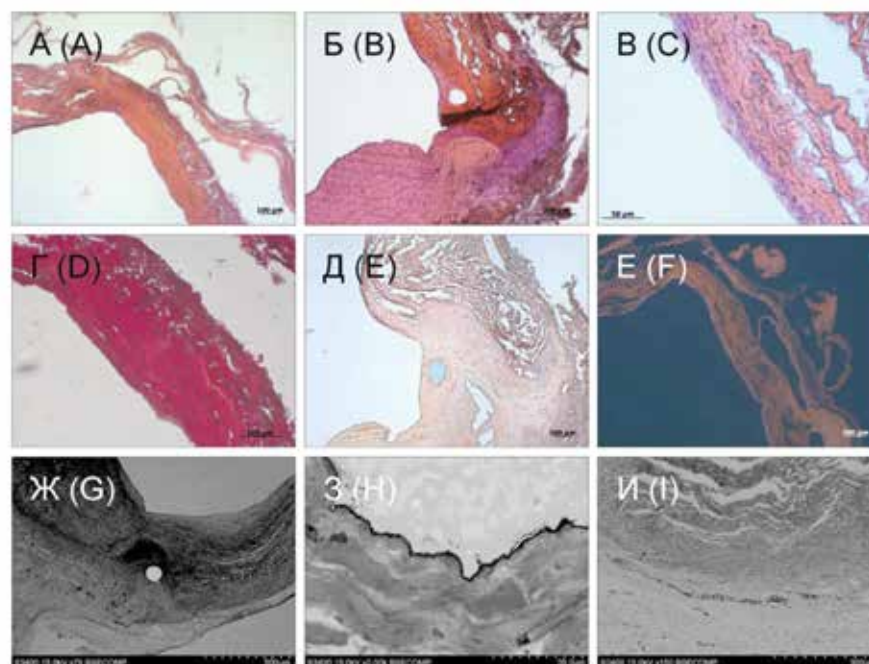


Рис. 4. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии КП-лоскута (спустя 2 мес. имплантации): А – В – окраска гематоксилин + эозин, увеличение $\times 50$, $\times 100$, $\times 400$; Г – окраска по Ван Гизону, увеличение $\times 200$; Д – окраска ализариновым красным С, увеличение $\times 100$; Е – флюоресцентный снимок, окраска ядер клеток Дарі, увеличение $\times 50$; Ж – И – снимки сканирующей электронной микроскопии: Ж – область анастомоза, увеличение $\times 75$; З – эндотелиоподобные клетки на поверхности заплаты из КП, обращенной в просвет сосуда, увеличение $\times 2000$; И – участок перехода между КП-лоскутом и неоадвентицией, новообразованные *vasa vasorum*, увеличение $\times 150$
Fig. 4. Results of HE and SEM of the XP-flap (after 2 months of implantation): А – В – hematoxylin + eosin staining, magnification $\times 50$, $\times 100$, $\times 400$; D – Van Gieson staining, magnification $\times 200$; D – staining with alizarin red C, magnification $\times 100$; E – fluorescent image, staining of Dapi cell nuclei, magnification $\times 50$; G – I – SEM images: G – area of anastomosis, magnification $\times 75$; H – endothelial-like cells on the surface of the XP-flap, facing the lumen of the vessel, magnification $\times 2000$; I – area of transition between the XP-flap and neoadventitia, newly formed *vasa vasorum*, magnification $\times 150$

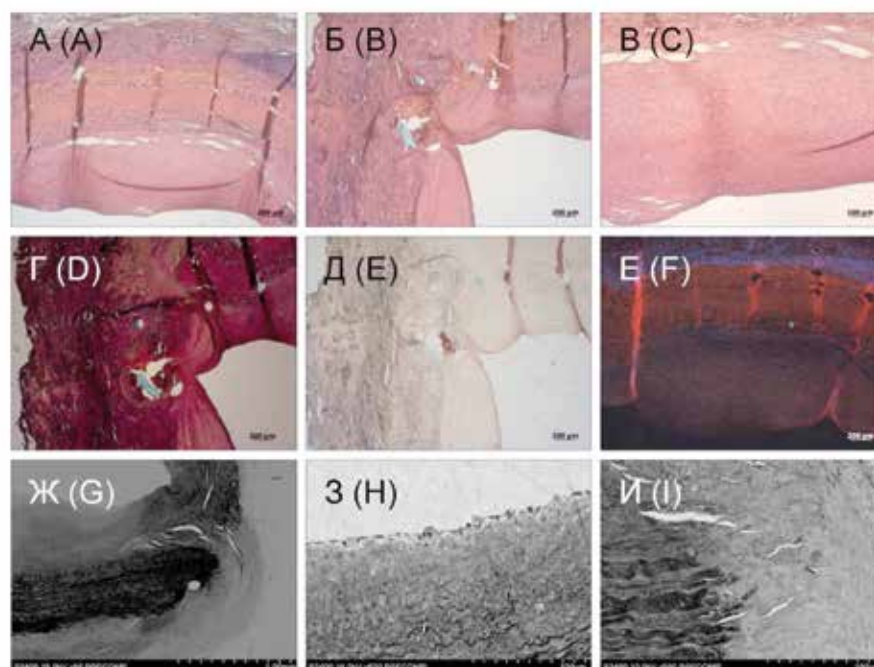


Рис. 5. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии КП-лоскута (спустя 6 мес. имплантации): А – В – окраска гематоксилин + эозин, увеличение $\times 50$, $\times 100$; Г – окраска по Ван Гизону, увеличение $\times 50$; Д – окраска ализариновым красным С, увеличение $\times 50$; Е – флюоресцентный снимок, окраска ядер клеток Дарі, увеличение $\times 50$; Ж – И – снимки сканирующей электронной микроскопии: Ж – область анастомоза, увеличение $\times 50$; З – эндотелиоподобные клетки на поверхности неоинтимы, обращенной в просвет сосуда, увеличение $\times 500$; И – область анастомоза с новообразованными *vasa vasorum*, увеличение $\times 500$
Fig. 5. Results of HE and SEM of the XP-flap (after 6 months of implantation): А – В – hematoxylin + eosin staining, magnification $\times 50$, $\times 100$; D – Van Gieson staining, magnification $\times 50$; E – staining with alizarin red C, magnification $\times 50$; F – fluorescent image, staining of Dapi cell nuclei, magnification $\times 50$; G – I – SEM images: G – area of anastomosis, magnification $\times 50$; H – endothelial-like cells on the surface of the neointima facing the lumen of the vessel, magnification $\times 500$; I – area of anastomosis with newly formed *vasa vasorum*, magnification $\times 500$

Наполненность заплаты клетками невысокая, однако она выше на границе с неоинтимой и неoadвентицией (см. рис. 2, 5). С внутренней стороны сосуда в проекции КП-лоскута неоинтима гиперплазирована, но ее толщина уступала таковой для ФШ-заплаты (см. таблицу, рис. 2, 3). Неоинтима представлена плоскими α -актин-содержащими клетками, присутствие эластических волокон не выявлено (см. рис. 2). Эндотелиальный слой рыхлый, прерывистый, легко сдвигается. Экспрессия vWF слабая (см. рис. 2). Коллаген III типа в большом количестве присутствует во всем образце, в основном пропитывает ткани. Коллаген IV типа окрашен ярко, пропитывает заплату; в области неoadвентиции выявлены только отдельные секретирующие клетки и их скопления (см. рис. 2). Со стороны неoadвентиции заплата окружена клетками воспалительного ряда, обнаружены *vasa vasorum*, которые присутствовали также в зонах анастомозов (см. рис. 5). Толщина неoadвентиции значительно увеличилась по сравнению со сроком имплантации 2 мес. (см. таблицу). В области прокола выявлен единичный участок кальцификации, который, вероятно, объясняется местной реакцией на шовный материал.

В целом ремоделирование КП-лоскута шло по пути образования трехслойной структуры, напоминающей архитектуру стенки сонной артерии овцы. Отличительной особенностью для КП-лоскута является наличие участков расслоения, что в дальнейшем может быть причиной преждевременной деградации материала сосудистой заплаты. Кроме того, гиперплазия неоинтимы свидетельствует о недостаточной совместимости имплантированного КП-лоскута и собственной стенки сосуда.

Обсуждение

Исследование ФШ как материала для тканевой инженерии нашло применение в различных ее областях [9, 10]. Его биологические свойства были изучены как в опытах *in vitro*, так и в экспериментах *in vivo* [11, 12]. Ранее в экспериментах *in vitro* нами было показано, что ФШ обладает хорошей гемосовместимостью и демонстрирует оптимальные матричные свойства и физико-механические характеристики [7].

Формирование неоинтимы и неoadвентиции, а также полноценная эндотелизация внутренней поверхности сосуда в проекции ФШ-заплаты свидетельствуют о его достаточной биологической привлекательности для собственных клеток организма.

Обращает на себя внимание гиперплазия неоинтимы сосуда, которая наблюдалась спустя 6 мес. имплантации

ФШ-заплаты в стенку сонной артерии овцы. Схожие данные были получены другими исследователями [13]. Это свидетельствует о недостаточной совместимости артериальной стенки и материала заплаты по ряду причин. С одной стороны, повышенная жесткость ФШ [7] может вызывать нарушение ламинарного потока крови в сосудах с последующей активацией эндотелия и экспрессией прооксидантных, провоспалительных, прокоагулянтных и проапоптотических генов [14, 15]. Эндотелиальная дисфункция, возникающая в области имплантации [16], сопровождается нарушением регуляции эндотелиальной NO-синтазы и снижением выработки NO [17, 18]. Кроме того, локальная воспалительная реакция, протекающая с привлечением лейкоцитов и моноцитов в субэндотелиальную область [19], усугубляется активацией матричных металлопротеиназ и расщеплением белков внеклеточного матрикса [20].

В совокупности эти факторы способствуют миграции в область неоинтимы и пролиферации ГМК с ее последующей гиперплазией. Действительно, по данным гистохимического исследования, спустя 2 и 6 мес. имплантации ФШ-заплаты в области гиперплазированной неоинтимы наблюдаются клетки, экспрессирующие α -актин – ГМК-подобные клетки (см. рис. 2). Следовательно, для дальнейшего использования ФШ в качестве материала, пригодного для изготовления сосудистых заплат, необходим поиск решений для преодоления проблемы гиперплазии неоинтимы.

Заключение

Ремоделирование имплантированных в сонную артерию овец ФШ-запат и КП-лоскутов развивалось по пути формирования трехслойной структуры, напоминающей строение стенки сосуда. КП-лоскут отличался наличием участков расслоения заплаты и кальцификации в зонах анастомозов. Обнаруженная спустя 6 мес. имплантации гиперплазия неоинтимы сосуда в проекции КП-лоскута свидетельствует о недостаточной совместимости материала заплаты и артериальной стенки.

Отличительными особенностями ФШ-матрикса были их структурная стабильность спустя 2 и 6 мес. имплантации. Умеренная биорезорбция ФШ проходила с постепенным замещением собственной тканью стенки сосуда. Гиперплазия неоинтимы, сформировавшаяся на основе ФШ-заплаты спустя 6 мес. имплантации, вероятно, также связана с недостаточной комплаентностью матрикса и сосудистой стенки и требует совершенствования состава материала.

Литература / References

1. Mensah G.A., Roth G.A., Fuster V. The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019;74(20):2529–2532. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.10.009.
2. AbuRahma A.F., Avgerinos E.D., Chang R.W., Darling R.C. 3rd, Duncan A.A., Forbes T.L. et al. Society for Vascular Surgery clinical practice guidelines for management of extracranial cerebrovascular disease. *J. Vasc. Surg.* 2022;75(1S):4–22. DOI: 10.1016/j.jvs.2021.04.073.
3. Севостьянова В.В., Миронов А.В., Антонова Л.В., Тарасов Р.С. Применение сосудистых заплат для артериальной реконструкции, проблемы и перспективные технологии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2019;8(3):116–129. Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Antonova L.V., Tarasov R.S. Vascular patches for arterial reconstruction, challenges and advanced technologies. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2019;8(3):116–129. (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278-2019-8-3-116-129.

4. Allen K.B., Adams J.D., Badylak S.F., Garrett H.E., Mouawad N.J., Oweida S.W. et al. Extracellular matrix patches for endarterectomy repair. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;11(8):1–13. DOI: 10.3389/fcvm.2021.631750.
5. Liesker D.J., Gareb B., Looman R.S., Donners S.J.A., de Borst G.J., Zeebregts C.J. et al. Patch angioplasty during carotid endarterectomy using different materials has similar clinical outcomes. *J. Vasc. Surg.* 2023;77(2):559–566. DOI: 10.1016/j.jvs.2022.09.027.
6. Wang M., Wang Y., Pan P., Liu X., Zhang W., Hu C. et al. A high molecular weight silk fibroin scaffold that resists degradation and promotes cell proliferation. *Biopolymers.* 2023;114(7):e23554. DOI: 10.1002/bip.23554.
7. Prokudina E.S., Senokosova E.A., Antonova L.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Akentieva T.N. et al. New tissue-engineered vascular matrix based on regenerated silk fibroin: *in vitro* study. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2023;15(4):41. DOI: 10.17691/stm2023.15.4.04.
8. Антонова Л.В., Миронов А.В., Шабеев А.Р., Сильников В.Н., Кривкина Е.О., Матвеева В.Г. и др. Тканеинженерные сосудистые запла-

- ты – сравнительная характеристика и результаты преклинических испытаний на модели овцы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022;24(4):94–108.
- Antonova L.V., Mironov A.V., Shabaev A.R., Silnikov V.N., Krivkina E.O., Matveeva V.G. et al. Tissue-engineered vascular patches: comparative characteristics and preclinical test results in a sheep model. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2022;24(4):94–108. (In Russ.). DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-94-108.
9. Ghorbani M., Vasheghani-Farahani E., Azarpira N., Hashemi-Najafabadi S., Ghasemi A. Dual-crosslinked in-situ forming alginate/silk fibroin hydrogel with potential for bone tissue engineering. *Biomater. Adv.* 2023;153:213565. DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213565.
10. Dong Z., Peng R., Zhang Y., Shan Y., Ding W., Liu Y. et al. Tendon repair and regeneration using bioinspired fibrillation engineering that mimicked the structure and mechanics of natural tissue. *ACS Nano*. 2023;17(18):17858–17872. DOI: 10.1021/acsnano.3c03428.
11. Wuttisiriboon K., Tippayawat P., Daduang J., Limpaboon T. Three-dimensional silk fibroin-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid-aloe vera scaffold supports in vitro chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and reduces inflammatory effect. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2023;111(8):1557–1570. DOI: 10.1002/jbm.b.35254.
12. Yan Y., Zhang W., Wu R., Guan T., Li Z., Tu Q. et al. Promising application of a novel biomaterial, light chain of silk fibroin combined with NT3, in repairment of rat sciatic nerve defect injury. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;240:124447. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124447.
13. Chan A.H.P., Filipe E.C., Tan R.P., Santos M., Yang N., Hung J. et al. Altered processing enhances the efficacy of small-diameter silk fibroin vascular grafts. *Sci. Rep.* 2019;9(1):17461. DOI: 10.1038/s41598-019-53972-y.
14. Remuzzi A., Ene-Iordache B. Novel paradigms for dialysis vascular access: upstream hemodynamics and vascular remodeling in dialysis access stenosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013;8(12):2186–2193. DOI: 10.2215/CJN.03450413.
15. Chiu J.J., Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol. Rev.* 2011;91(1):327–387. DOI: 10.1152/physrev.00047.2009.
16. Bonatti J., Oberhuber A., Schachner T., Zou Y., Hammerer-Lercher A., Mittermayr R. et al. Neointimal hyperplasia in coronary vein grafts: pathophysiology and prevention of a significant clinical problem. *Heart Surg. Forum*. 2004;7(1):72–87. DOI: 10.1532/hcf.910.
17. Lavin B., Gómez M., Pello O.M., Castejon B., Piedras M.J., Saura M. et al. Nitric oxide prevents aortic neointimal hyperplasia by controlling macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34(8):1739–1746. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303866.
18. Bahnson E.S., Koo N., Cantu-Medellin N., Tsui A.Y., Havelka G.E., Vercammen J.M. et al. Nitric oxide inhibits neointimal hyperplasia following vascular injury via differential, cell-specific modulation of SOD-1 in the arterial wall. *Nitric Oxide*. 2015;44:8–17. DOI: 10.1016/j.niox.2014.10.009.
19. Cai Y., Nagel D.J., Zhou Q., Cygnar K.D., Zhao H., Li F. et al. Role of cAMP-phosphodiesterase 1C signaling in regulating growth factor receptor stability, vascular smooth muscle cell growth, migration, and neointimal hyperplasia. *Circ. Res.* 2015;116(7):1120–1132. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304408.
20. Rotmans J.I., Velema E., Verhagen H.J., Blankensteijn J.D., de Kleijn D.P., Strokes E.S. et al. Matrix metalloproteinase inhibition reduces intimal hyperplasia in a porcine arteriovenous-graft model. *J. Vasc. Surg.* 2004;39(2):432–439. DOI: 10.1016/j.jvs.2003.07.009.

Информация о вкладе авторов

Прокудина Е.С. – планирование эксперимента, имплантация сосудистых заплат, проведение гистологического исследования, анализ результатов, подбор литературных источников, написание текста статьи.

Сенокосова Е.А. – планирование эксперимента, изготовление сосудистых заплат, имплантация сосудистых заплат, оценка данных, обработка результатов.

Антонова Л.В. – контроль за выполнением эксперимента, согласование текста статьи.

Мухамадияров Р.А. – проведение сканирующей электронной микроскопии, оценка данных, интерпретация результатов.

Кошелев В.А. – проведение сканирующей электронной микроскопии, оценка данных, интерпретация результатов.

Кривкина Е.О. – изготовление сосудистых заплат, подготовка и окраска гистологических препаратов.

Великанова Е.А. – иммунофлуоресцентная окраска образцов сосудистых заплат, конфокальная микроскопия препаратов, оценка данных, интерпретация результатов.

Кочергин Н.А. – контроль над выполнением эксперимента, согласование текста статьи.

Information on author contributions

Prokudina E.S. – an experiment planning, vascular patches implantation, histological examination conduction, analysis of results, literature sources selection, article writing.

Senokosova E.A. – an experiment planning, vascular patches making and implantation, data assessment, results processing.

Antonova L.V. – control over the experiment implementation, text approval.

Mukhamadiyarov R.A. – scanning electron microscopy performance, data assessment, interpretation of results.

Koshelev V.A. – scanning electron microscopy performance, data assessment, interpretation of results.

Krivkina E.O. – vascular patches making, preparation and staining of histological samples.

Velikanova E.A. – immunofluorescence staining of vascular patch samples, confocal microscopy of samples, data assessment, interpretation of results.

Kochergin N.A. – control over the experiment implementation, text approval.

Сведения об авторах

Прокудина Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1991-6516.
E-mail: goddess27@mail.ru.

Сенокосова Евгения Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-9430-937X.
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Антонова Лариса Валерьевна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-8874-0788.
E-mail: antonova.la@mail.ru.

Мухамадияров Ринат Авахдиевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория молекулярной трансляционной и цифро-

Information about authors

Ekaterina S. Prokudina, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1991-6516.
E-mail: goddess27@mail.ru.

Eugeniia A. Senokosova, Cand. Sci. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-9430-937X.
E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru.

Larisa V. Antonova, Dr. Sci. (Med.), Leading Research Scientist, Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-8874-0788.
E-mail: antonova.la@mail.ru.

Rinat A. Mukhamadiyarov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Translational and Digital Medicine, Research Institute

вой медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-5558-3229.

E-mail: muvara@kemcardio.ru.

Коселев Владислав Александрович, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной трансляционной и цифровой медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0001-6840-1116.

E-mail: koshva@kemcardio.ru.

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

E-mail: leonora92@mail.ru.

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

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Кочергин Никита Александрович, канд. мед. наук, заведующий лабораторией тканевой инженерии и внутрисосудистой визуализации, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1534-264X.

E-mail: nikotwin@mail.ru.

 **Прокудина Екатерина Сергеевна**, e-mail: goddess27@mail.ru.

Поступила 05.10.2023

for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-5558-3229.

E-mail: muvara@kemcardio.ru.

Vladislav A. Koshelev, Junior Research Scientist, Laboratory of Molecular Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0001-6840-1116.

E-mail: koshva@kemcardio.ru.

Eugeniia O. Krivkina, Junior Research Scientist, Laboratory of Cell Technology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-2500-2147.

E-mail: leonora92@mail.ru.

Elena A. Velikanova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Cell Technology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1079-1956.

E-mail: velikanova_ea@mail.ru.

Nikita A. Kochergin, Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Tissue Engineering and Intravascular Visualization, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1534-264X.

E-mail: nikotwin@mail.ru.

 **Ekaterina S. Prokudina**, e-mail: goddess27@mail.ru.

Received October 5, 2023