

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: irapozd1963@yandex.ru.

Степанова Екатерина Алексеевна, заведующая лабораторией оптической спектроскопии ГБОУ ВПО

СибГМУ Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: carpicon@mail.ru.

УДК 616.13/14-089.819.843-77:615.461:577.1]-092.9

РЕГЕНЕРАЦИЯ КРОВЕНОСНОГО СОСУДА НА ОСНОВЕ ГРАФТА ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИССЛЕДОВАНИИ

**В.В. Севостьянова¹, А.В. Миронов¹, Т.В. Глушкова¹, А.Ю. Бурого¹, В.Г. Матвеева¹, Л.В. Антонова¹,
Ю.А. Кудрявцева¹, А.М. Сейфалиан², О.Л. Барбараш¹, Л.С. Барбараш¹**

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний", Кемерово

²Centre for Nanotechnology & Regenerative Medicine, University College London, England, UK

E-mail: sevostyanova.victoria@gmail.com

EXPERIMENTAL STUDY OF POLYCAPROLACTONE VASCULAR GRAFT FOR BLOOD VESSEL REGENERATION

**V.V. Sevostyanova¹, A.V. Mironov¹, T.V. Glushkova¹, A.Yu. Burago¹, V.G. Matveeva¹, L.V. Antonova¹,
Yu.A. Kudryavtseva¹, A.M. Seifalian², O.L. Barbarash¹, L.S. Barbarash¹**

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

²Centre for Nanotechnology & Regenerative Medicine, UCL Division of Surgery & Interventional Science, University College London (UCL), London, England, UK and NanoRegMed Ltd, London, England, UK

Работа посвящена изучению регенерации кровеносного сосуда на основе графта из поликапролактона (polycaprolactone, PCL) в долгосрочном исследовании. Графты изготавливали из PCL методом электроспиннинга с дальнейшей оценкой их морфологии и механических свойств. Для изучения формирования кровеносного сосуда и биосовместимости графты имплантировали в брюшную часть аорты крыс на 2 недели, 1 и 10 мес. PCL графты, изготовленные методом электроспиннинга, имели высокопористую структуру. По механическим свойствам PCL графты отличались от нативных сосудов, но выдерживали механическую нагрузку, создаваемую током крови. Имплантированные в кровеносное русло графты заселялись клетками, синтезирующими межклеточный матрикс и формирующими стенку кровеносного сосуда, в связи с чем PCL графты биосовместимы и могут выполнять роль временных сосудистых протезов.

Ключевые слова: сосудистый графт, поликапролактон, электроспиннинг, тканевая инженерия.

The polycaprolactone (PCL) vascular graft for tissue regeneration was evaluated in the long-term *in vivo* study. The grafts were fabricated by electrospinning with the further morphological assessment and mechanical tests. Grafts were implanted into rat abdominal aortas for 2 weeks, 1 and 10 months to evaluate the formation of blood vessels and graft biocompatibility. PCL grafts had a highly porous structure. Mechanical properties of the grafts differed from those of native vessels; however, grafts were able to withstand the mechanical stress created by a blood flow. Implanted grafts were infiltrated by the host cells. Thus, PCL grafts are biocompatible and can be used as temporary vascular prostheses.

Key words: vascular graft, polycaprolactone, electrospinning, tissue engineering.

Введение

Традиционным способом лечения заболеваний, связанных со значительным поражением коронарных и периферических артерий, является хирургическое вмешательство с имплантацией биологических или синтетических протезов [1]. В качестве "золотого стандарта" для проведения данных операций используют аутоотрансплантаты, такие как подкожная вена, а также грудная и лучевая артерии. Однако применение аутологичных вен и артерий в большинстве случаев приводит к повторным опе-

рациям, связанным с деструктивными изменениями и окклюзией шунтов. Кроме того, около 30% пациентов не обладают подходящими для трансплантации венами или артериями в результате уже перенесенных операций либо других заболеваний [2].

Существует несколько подходов к созданию альтернативных сосудистых графтов малого диаметра. Первый подход основан на использовании синтетических полимеров. Наиболее известными являются трансплантаты из полиэтилентерефталата (polyethylene terephthalate, PET

– Dacron) и политетрафторэтилена (polytetrafluoroethylene, ePTFE – Teflon) [3]. Однако данные графты не эффективны в реконструкции артерий малого диаметра (<5 мм) в результате низкой скорости кровотока, что приводит к тромбозу и гиперплазии неоинтимы в зоне анастомоза [4].

Существенные успехи были достигнуты в тканевой инженерии кровеносных сосудов с использованием биодеградируемых природных и синтетических полимеров [5]. Графты, изготовленные из природных полимеров, наиболее биосовместимы, а также способны поддерживать прикрепление клеток, их рост, дифференцировку и жизнеспособность [5, 6]. Тем не менее, данные материалы имеют недостатки, связанные с невозможностью контролировать их деградацию, а также с недостаточной прочностью и эластичностью [6].

Одним из перспективных синтетических полимеров для изготовления сосудистых графтов является поликапролактон (polycaprolactone, PCL), поскольку он обладает высокой прочностью и эластичностью, медленной скоростью биодеградации и хорошей биосовместимостью [7–9]. Ранее нами были получены результаты по имплантации PCL графтов в брюшную часть аорты крыс сроком на 6 недель, свидетельствующие о проходимости графтов и клеточной инфильтрации его стенок [10]. Тем не менее, интерес вызывает функционирование сосудистого PCL графта в долгосрочных исследованиях. Цель исследования: изучение особенностей регенерации кровеносного сосуда в разные сроки имплантации графта в кровеносное русло в эксперименте на животных.

Материал и методы

Изготовление графтов. Сосудистые графты диаметром 2 мм изготавливали методом электроспиннинга на приборе Nanon-01A (MECC CO, Япония) из 14%-го раствора PCL, M=80000 (Sigma-Aldrich Co. LLC, США) в хлороформе при подаваемом напряжении 15 кВ и скорости подачи раствора – 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора – 15 см, в качестве коллектора использовали вращающиеся штифты диаметром 2 мм.

Оценка поверхности графтов. Образцы PCL графтов (0,5х0,5 мм) покрывали золотым токопроводящим напылением толщиной в 30 нм и изучали на сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония). Размер волокон и пор, а также пористость материала определяли с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Механические свойства графтов. Исследование осуществляли с использованием универсальной испытательной машины “Zwick/roell”-2.5N (Германия). Прочность PCL графтов оценивали по максимальному напряжению при растяжении, упруго-деформативные свойства – по удлинению до нарушения целостности образца и модулю упругости.

Определение комплаентности стенки графта осуществляли на базе лаборатории NanoRegMed (Лондон, Англия) под руководством проф. А.М. Сейфалиана. Исследование проводили с помощью установки артериального пульсирующего потока с физиологическими параметрами.

Таблица 1

Гемодинамические значения пульсирующего тока

Физические параметры	Переменная
Среднее давление (мм рт. ст.)*	30–90
Пульсовое давление (мм рт. ст.)	62
Частота пульсирующего цикла (Гц)	1
Средняя скорость потока (мл/мин)	100
Температура перфузата (°C)	37

Примечание: * – с шагом в 30 мм рт. ст.

ми. Для перфузии в установке применяли гепаринизированную (Heparin sodium, CP Pharmaceuticals Ltd., Англия) цельную кровь, смешанную с физиологическим раствором (Baxter Healthcare Ltd., Англия) в соотношении 2:1. PCL графты диаметром 2 мм, длиной 50 мм (n=6) подвергали 3%-му продольному растяжению для воспроизведения характеристик *in vivo*. Диаметры просвета определяли посредством системы отслеживания движений сосудистой стенки (Pie Medical Wall Track Version 2, Pie Medical Systems, Нидерланды). Данные по гемодинамике представлены в таблице 1.

После сбора данных комплаентность (C) рассчитывали по формуле:

$$C (\% \text{mmHg}^{-1} \times 10^{-2}) = [(Ds - Dd) / Dd(Ps - Pd)] \times 10^4,$$

где P, D, s и d – давление, диаметр, систола и диастола соответственно.

В качестве контроля использовали синтетические сосудистые протезы Dacron и ePTFE, а также участки внутренних грудных артерий (A. thoracica interna) и подкожных вен (V. saphena), которые забирали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на забор биоматериала.

Имплантация *in vivo*. Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм и длиной 10 мм после стерилизации этилен оксидом имплантировали в брюшную часть аорты крыс самцов линии Wistar массой 400–450 г (n=10). Животных вводили в наркоз 3%-м изофлураном, операцию проводили с ингаляционным наркозом 1,5%-го изофлурана. Графт имплантировали ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации с использованием шовного материала 9-0. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рациионе питания. Опыты проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986).

Спустя 2 недели, 1 и 10 мес. зону анастомоза и сам PCL графт оценивали гистологически с окрашиванием гематоксилин-эозином и по Ван Гизону.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статис-

тически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение (M} \pm \text{SD)}$ и как медиана и 25 и 75-й процентиля Me (25; 75%).

Результаты и обсуждение

Характеристика поверхности графтов. Изготовленные PCL графты состояли из волокон и имели высокопористую структуру. Средний диаметр PCL волокон составил $2,05 \pm 0,69$ мкм, средний диаметр пор – 23,58 мкм, пористость – 49,7%. Такая морфология способна имитировать структуры внеклеточного матрикса, состоящего из фибриллярных белков. Тонкие полимерные волокна обеспечивают большую площадь доступной поверхности для взаимодействия, что способствует лучшему прикреплению клеток, а также обеспечивает транспорт питательных веществ и удаление продуктов метаболизма [11, 12].

Механические свойства. При изучении механических свойств PCL графтов было обнаружено, что их прочность в 2,7 раза ниже прочности нативных вен человека (табл. 2). При этом эластичность полимерного материала в 10 раз превышала эластичность кровеносных сосудов. Кроме того, PCL графты обладали большей жесткостью. При этом зависимость “напряжение – удлинение” для PCL графтов имела форму, характерную для многих других синтетических полимеров. Отличия кривой “напряжение – удлинение” для PCL графтов от данной зависимости для нативных сосудов обусловлены в первую очередь наличием в тканях коллагена, эластина и гликозаминогликанов, обеспечивающих основную часть механической прочности сосудов [13].

При изучении свойств артерий наблюдали экспоненциальное снижение комплаентности при повышении среднего давления (табл. 3). Графты Dacron и ePTFE демонстрировали среднюю комплаентность в 1,8–2% на мм рт. ст. $\cdot 10^{-2}$, и этот параметр не изменялся значительно на всем диапазоне давления, что отличалось от комплаентности артерий. Графты из PCL показали снижение комплаентности с увеличением среднего давления крови, но с очень высоким стандартным отклонением.

При деформации артерии не отвечают на давление линейным растяжением, и их комплаентность уменьшается при более высоком давлении. Данная особенность описана как анизотропия и не выявлена при физиологических условиях у доступных на сегодняшнее время сосудистых протезов [14]. Комплаентность графтов из PCL отличалась от комплаентности артерий. Однако их вязкоэластические свойства были более схожи со свойствами артерий в сравнении с протезами Dacron и ePTFE. Возможно, что при применении этих графтов в качестве трехмерного каркаса с инкорпорированием клеток их комплаентность может быть более близкой к

артериям в сравнении с экспериментами *in vitro*.

Ремоделирование PCL графтов. Через 2 недели после имплантации в 50% случаев было обнаружено образование пристеночного тромба в зоне анастомозов. Другая половина графтов не имела признаков тромбообразования на внутренней поверхности. Подобная картина наблюдалась также через 1 и 10 мес. после имплантации. Тромбообразование в части имплантированных PCL графтов может быть обусловлено несовпадением диаметра протеза и нативной аорты, которое приводит к нарушению гемодинамики в данной области.

Важными характеристиками заживления сосудистого графта являются образование внутренней эндотелиальной выстилки и инфильтрация стенки трансплантата клетками. Признаки эндотелизации наблюдались уже через 2 недели после имплантации, чему, вероятно, способствовала пористая морфология внутренней поверхности графта. Также через месяц имплантации на внутренней поверхности графтов определяли частичное формирование неоинтимы, которая представляла собой тонкую выстилку.

Высокопористая структура PCL графтов способствовала проникновению клеток в их стенки. Так, через 2 недели отмечали слабую клеточную инфильтрацию в стенке имплантированного графта, представленную преимущественно макрофагами и фибробластами. К 1-му мес. исследования клетки проникали на 2/3 толщины графта. Через 10 мес. имплантации клетки располагались по всей толщине графта и активно формировали внеклеточный матрикс, о чем свидетельствовали волокна коллагена в стенке протеза. На наружной поверхности имплантатов наблюдали реакцию на инородное тело с образованием гигантских многоядерных клеток, а также волокон соединительной ткани. К 10-му мес. данная реакция на инородное тело уменьшалась.

В проведенном исследовании низкая скорость деградации PCL и активный синтез фибробластами внеклеточного вещества в графтах способствовали сохранению

Таблица 2

Сравнение механических свойств PCL графтов и нативной вены

Графт	Прочность, МПа	Относительное удлинение, %	E_{mod} , МПа
PCL	3,72 (3,35–4,51)*	779,92 (743,35–802,31)*	4,025 (3,52–5,71)*
Нативная v. saphena	10,09 (8,05–12,13)	73,1 (62,8–81,8)	1,37 (0,89–1,75)

Примечание: * $p < 0,05$ – относительно нативной V. saphena.

Таблица 3

Комплаентность (C, процент на мм рт. ст. $\cdot 10^{-2}$) PCL графтов в сравнении с комплаентностью подвздошных артерий и вены человека, графтов Dacron и ePTFE

C	PCL	A. thoracica interna	V. saphena	Dacron	ePTFE
С при 30 мм рт.ст.	6,1 $\pm$ 5,2	18,3 $\pm$ 12,8	24,2 $\pm$ 13,1	1,9 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,5
С при 60 мм рт.ст.	4,7 $\pm$ 3,6	8,9 $\pm$ 7,3	3,4 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,4
С при 90 мм рт.ст.	2,8 $\pm$ 2,1	3,5 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 1,0	1,8 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,2

целостности имплантата в условиях кровообращения на протяжении 10 мес.

Выводы

Исследование PCL графтов в физиологических условиях путем имплантации в брюшную часть аорты крыс продемонстрировало их эндотелизацию и активную трансмуральную инфильтрацию клетками, синтезирующими внеклеточный матрикс. Данные процессы обеспечивали регенерацию тканей. Кроме того, сосудистые графты, изготовленные методом электроспиннинга, были способны выдерживать длительную механическую нагрузку, оказываемую током крови. Таким образом, PCL графты могут быть использованы в качестве основы для восстановления кровеносного сосуда *in situ*. Тем не менее, остается потребность в улучшении их проходимости, механических и вязкоэластических свойств.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) и проведено в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Литература

1. Taggart D.P. Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting // Ann. Cardiothorac. Surg. – 2013. – Vol. 2, No. 4. – P. 427–430.
2. Desai M., Seifalian A.M., Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 2011. – Vol. 40, No. 2. – P. 394–398.
3. Roll S., Muller-Nordratern J., Keil T. et al Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery – systematic review and meta-analysis // BMC Surgery. – 2008. – Vol. 8. – P. 22.
4. Chlupac J., Filova E., Bacakova L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery // Physiol. Res. – 2009. – No. 58, Suppl. 2. – P. s119–s139.
5. Catto V., Fare S., Freddi G. et al. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration // ISRN Vascular Medicine. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–27.
6. Hirai J., Matsuda T. Self-organized, tubular hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen for low pressure loaded venous system // Cell Transplant. – 1995. – Vol. 4, No. 6. – P. 597–608.
7. Pektok E., Nottelet B., Tille J. et al. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(e-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation // Circulation. – 2008. – Vol. 118, No. 24. – P. 2563–2570.
8. Iwasaki K., Kojima K., Kodama S. et al. Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically equivalent pulsatile bioreactor // Circulation. – 2008. – Vol. 118, No. 14, Suppl. – P. s52–s57.
9. Wu W., Allen R.A., Wang Y. et al. Fast-degrading elastomer enables rapid remodeling of a cell-free synthetic graft into a neoartery // Nat. Med. – 2012. – Vol. 18, No. 7. – P. 1148–1153.
10. Sevostyanova V.V., Elgudin Y.L., Glushkova T.V. et al. Use of polycaprolactone grafts for small-diameter blood vessels // Angiol Sosud Khir. – 2015. – No. 21. – P. 44–53.
11. Pham Q., Sharma U., Mikos A. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A Review // Tissue engineering. – 2006. – Vol. 12, No. 5. – P. 1197–1211.
12. Sill T.J., von Recum H.A. Electrospinning: Applications in drug

delivery and tissue engineering // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, No. 13. – P. 1989–2006.

13. Heureux N.L., Paquet S., Labbe R. et al. A completely biological tissue-engineered human blood vessel // FASEB J. – 1998. – Vol. 12, No. 1. – P. 47–56.
14. Tai N.R., Salacinski H.J., Edwards A. et al. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction // Br. J. Surg. – 2000. – Vol. 87, No. 11. – P. 1516–1524.

Поступила 12.02.2016

Сведения об авторах

Севостьянова Виктория Владимировна, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: sevostyanova.victoria@gmail.com.

Миронов Андрей Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

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

Глушкова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

E-mail: bio.tvg@mail.ru.

Бураго Андрей Юрьевич, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: burago_andrey@mail.ru.

Матвеева Вера Геннадьевна, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: matveeva_vg@mail.ru.

Антонова Лариса Валерьевна, канд. мед. наук, заведующий лабораторией клеточных технологий НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

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

Кудрявцева Юлия Александровна, докт. биол. наук, заведующий отделом экспериментальной и клинической кардиологии НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: yulia_k1970@mail.ru.

Сейфалиан Александр М., Ph.D., профессор нанотехнологии и регенеративной медицины, заведующий Division of Surgery & Interventional Science University College London, руководитель NanoRegMed Ltd.

Адрес: NW3 2QG, London, UK, UCL Centre for

Nanotechnology & Regenerative Medicine, 9th Floor,
Royal Free Campus, Pond Street.

E-mail: seifalian.ucl@gmail.com.

Барбараш Ольга Леонидовна, докт. мед. наук, профессор, директор НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: barbol@kemcardio.ru.

Барбараш Леонид Семенович, докт. мед. наук, академик РАН, главный научный сотрудник НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний.

Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: ls.barbarash@gmail.com.