

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕЗОВ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

СЕВОСТЬЯНОВА В.В.¹, ЕЛГУДИН Я.А.², ГЛУШКОВА Т.В.¹,
ВНЕК Г.³, ЛЮБЫШЕВА Т.³, ЭМАНСИПАТОР С.², КУДРЯВЦЕВА Ю.А.¹,
БОРИСОВ В.В.¹, ГОЛОВКИН А.С.¹, БАРБАРАШ Л.С.¹

¹ Отдел экспериментальной и клинической кардиологии, НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, Кемерово, Россия

² Отделение хирургии, Кливлендский медицинский центр реабилитации ветеранов,

³ Факультет макромолекулярных наук и инженерии, Западный резервный университет Кейза, Кливленд, шт. Огайо, США

В настоящее время активно развиваются подходы тканевой инженерии, направленные на создание сосудистых графтов малого диаметра. Это связано с существующей в сердечно-сосудистой хирургии потребностью в протезах для проведения аорто-коронарного шунтирования. В данной работе была проведена оценка возможности использования сосудистого графта малого диаметра, изготовленного из биodeградируемого полимера поликапролактона методом электроспиннинга. Были изучены физико-механические свойства и структура графтов из поликапролактона, а также их тромборезистентность и проходимость после имплантации в кровеносное русло крыс. Результаты показали наличие оптимальных физико-механических свойств сосудистых графтов, их биосовместимость, эндотелиализацию внутренней поверхности и инфильтрацию стенки протеза клетками с формированием новой ткани. Было обнаружено образование обширного слоя неоинтимы в зонах анастомозов.

Таким образом, исследование продемонстрировало возможность использования графтов из поликапролактона в качестве сосудистых протезов, но при этом необходима их дальнейшая модификация, которая будет способствовать уменьшению гиперплазии соединительной ткани в просвет графта.

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

ВСТУПЛЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с облитерацией кровеносных сосудов, являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в развитых странах мира [1]. В основе лечения таких заболеваний лежит проведение шунтирующих операций. Для осуществления процедур по восстановлению кровотока в зонах ишемии в качестве шунтов используют аутологичные вены или артерии. Однако отсутствие необходимых вен или артерий в результате их поражения или проведения повторных операций у 30% пациентов приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых графтов [2, 3]. К последним относят гомографты, применение которых крайне ограничено малой доступностью донорского материала, синтетические графты, такие как Dacron из полиэтилентетрафолата и Gore-Tex из политетрафлуорэтилена, а также биологические протезы из ксеноматериала [4]. Несмотря на удобство в применении и коммерческую доступность, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как

существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неоинтимы или тромбообразования [5].

На сегодняшний день существует несколько стратегий, направленных на избежание данных проблем. Одна из них заключается в создании кровеносных сосудов методом тканевой инженерии *in vitro* с использованием полимерной биodeградируемой матрицы, клеток пациента и биологически активных молекул [6, 7]. К сожалению, создание персонального графта для пациента из его собственного клеточного материала является сложным и трудоемким методом, что ограничивает его клиническое применение. Большой интерес представляет создание полимерных графтов, которые будут заселяться клетками *in vivo* и одновременно подвергаться биodeградации, что должно обеспечить регенерацию кровеносного сосуда. Одним из перспективных материалов для создания таких графтов является синтетический полимер поликапролактон (poly(-caprolactone) – PCL), который известен хорошими механическими свойствами. Механизм его деградации *in vivo* обусловлен медленным гидролитическим процессом

с образованием нетоксичных продуктов [8].

Целью данной работы явилась оценка возможности применения графтов из поликапролактона в качестве протезов сосудов малого диаметра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление PCL-графтов. Сосудистые графты (внутренний диаметр 2 мм, толщина стенки 100 мкм) изготавливали методом электроспиннинга из биodeградируемого полимера PCL ($M=80\ 000$) (Sigma-Aldrich, США). Электроспиннинг проводили при следующих условиях: 10% раствор PCL в хлороформе, напряжение на игле +15 кВ, скорость потока раствора 1 мл/ч, расстояние между иглой и коллектором 15 см. В качестве коллектора использовали вращающийся штифт диаметром 2 мм.

Физико-механические свойства PCL-графтов. Физико-механические испытания проводили на универсальной испытательной машине (Zwick/goell, Германия) в условиях одноосного растяжения образцов ($n=15$). При оценке физико-механических свойств биоматериала учитывали показатели прочности и упругой деформации. Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении, упругодеформированные свойства – по модулю упругости ($E_{\text{мод}}$) и относительному удлинению до нарушения целостности образца. Для большей точности измерения относительного удлинения к образцу применяли предварительную нагрузку в 0,01Н. В качестве контроля использовали сосудистые биопротезы «КемАнгиопротез» (ЗАО «НеоКор», Россия), изготовленные из грудной артерии крупного рогатого скота и обработанные диглицидоловым эфиром этиленгликоля. Данные протезы используют для замещения пораженных артерий среднего и малого диаметра [9].

Оценка адгезии тромбоцитов на PCL-графтах. Адгезию тромбоцитов на PCL-графтах и биопротезах «КемАнгиопротез» оценивали в эксперименте *in vitro* с помощью многоканального перистальтического насоса 2054U/CA24 (Watson–Marlow, Великобритания). Магистраль с фиксированными образцами длиной 3 см заполняли свежей цитратной донорской кровью, в соотношении кровь: цитрат – 9:1. Скорость циркуляции крови составила 0,04 л/мин, $t=37^{\circ}\text{C}$. После 40 мин. контакта с кровью сегменты графтов ($n=10$) фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4$), после чего помещали в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$ до полного высыхания. Адгезию и морфологические изменения тромбоцитов на поверхности материала оценивали при помощи сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия. При оценке структуры поверхности графта и адгезии

тромбоцитов на полимерных графтах и биопротезах «КемАнгиопротез», образцы покрывали золотым токопроводящим напылением толщиной в 30 нм и далее изучали на сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония).

Имплантиция PCL-графтов в брюшную часть аорты крыс. Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм и толщиной стенки 100 мкм имплантировали в брюшную часть аорты крыс. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания. Эксперимент выполнялся в лаборатории Cleveland VA Medical Center в соответствии с протоколом, одобренным IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, Cleveland VA Medical Center). Самцов крыс линии Wistar массой 400–450 г ($n=5$) вводили в наркоз внутривенной инъекцией 40 мг/кг тиопентала натрия. Перед операцией животным вводили 10 мг/кг цефазолина. Во время хирургического вмешательства проводили ЭКГ и измерение температуры тела. Все животные были оперированы под ингаляционным наркозом 1% изофлурана. После проведения срединной лапаротомии открывали брюшное пространство и выделяли аорту. Далее аорту пережимали ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Проксимальный анастомоз выполняли с использованием шовного материала 9–0. Графт промывали и аорту повторно пережимали. Дистальный анастомоз выполняли подобным образом. После снятия зажимов наличие тока крови через графт подтверждали интраоперационно с использованием сосудистого доплера. Через 6 недель животных выводили из эксперимента. Зону анастомоза и сам PCL-графт оценивали на наличие кровотечений, тромбообразования. Гиперплазию неоинтимы, а также степень заселения графта клетками изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилином-эозином, а

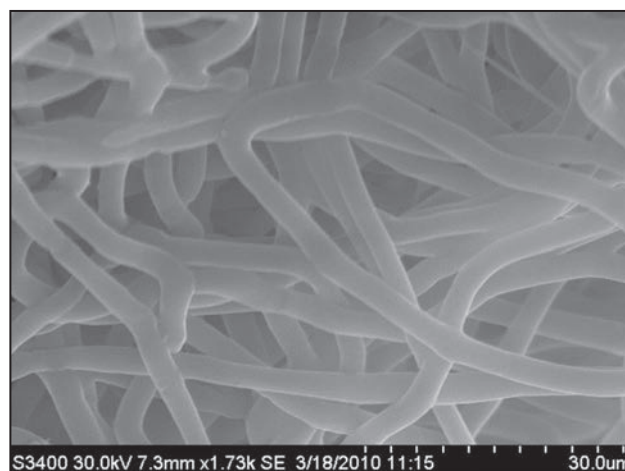


Рис. 1. Стенка PCL-графта, изображение сканирующей электронной микроскопии.

Физико-механические свойства графтов из поликапролактона и биопротезов «КемАнгиопротез»			
Протезы сосудов	Прочность, МПа (25% ₀ <M<75% ₀)	Упругая деформация	
		относительное удлинение, % (25% ₀ <M<75% ₀)	E _{мод} (25% ₀ <M<75% ₀)
Биопротез «КемАнгиопротез»	0,85<1,26<1,42	79,8<95,4<100,6	0,24<0,28<0,34
PCL-графт	1,51<1,88* <1,98	202,2<232,1* <441,4	3,27<3,89* <5,57

* p<0,01 относительно биопротезов «КемАнгиопротез».

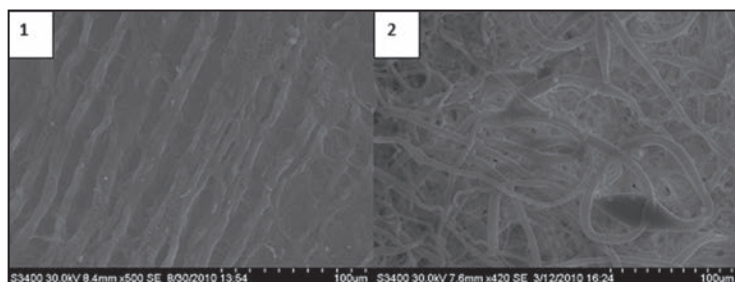


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия поверхности биопротеза «КемАнгиопротез» (1) и PCL-графта (2) после 40 минут контакта с кровью.

также по Маллори и Ван-Гизону.

Статистические методы. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего или как медиана и 25-й и 75-й процентиля (25%₀<M<75%₀).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование графтов из поликапролактона методом сканирующей электронной микроскопии показало, что поверхность имеет высокопористую структуру, образованную полимерными волокнами толщиной $3,340 \pm 0,510$ мкм. Волокна были равномерные по толщине без видимых дефектов (рис. 1).

При оценке механической прочности и эластичности сосудистых графтов в качестве контроля использовали биологические протезы кровеносных сосудов «КемАнгиопротез», так как физико-механические свойства данных протезов не отличаются от нативных артерий. Результаты физико-механического испытания сосудистых графтов продемонстрировали, что показатели прочности PCL-графтов выше данных показателей биопротезов

«КемАнгиопротез» (табл.). Показатели упругой деформации PCL-графтов также превышают данные показатели биопротезов «КемАнгиопротез»: относительное удлинение – в 2,4 раза ($p=0,00001$), модуль упругости (E_{мод}) – в 14 раз ($p=0,00001$), что указывает на их большую эластичность относительно контрольных образцов. В целом, результаты физико-механических испытаний свидетельствуют о достаточной прочности и удовлетворительных свойствах упругой деформации PCL-графтов.

Гемосовместимость – важное качество протезов, взаимодействующих с кровью. Для оценки медицинских изделий, контактирующих с кровью, одним из основных тестов, рекомендованных ISO 10993-4:2009, является исследование активации тромбоцитов. При изучении внутренней поверхности графтов после контакта с кровью методом сканирующей электронной микроскопии было выявлено значительное количество адгезированных тромбоцитов,

в то время как на образцах биопротезов «КемАнгиопротез» тромбоциты отсутствовали (рис. 2). Несмотря на то, что на поверхности графтов наблюдали значительное количество адгезированных тромбоцитов, не было обнаружено измененных и расплывчатых форм клеток, что может свидетельствовать о гемосовместимости испытываемых образцов.

Согласно результатам подобных исследований по имплантации синтетических графтов в кровеносное русло мелких лабораторных животных полная эндотелиализация протеза происходит к концу 6 недели [10]. В связи с этим срок 6 недель был выбран в качестве критического для завершения эксперимента

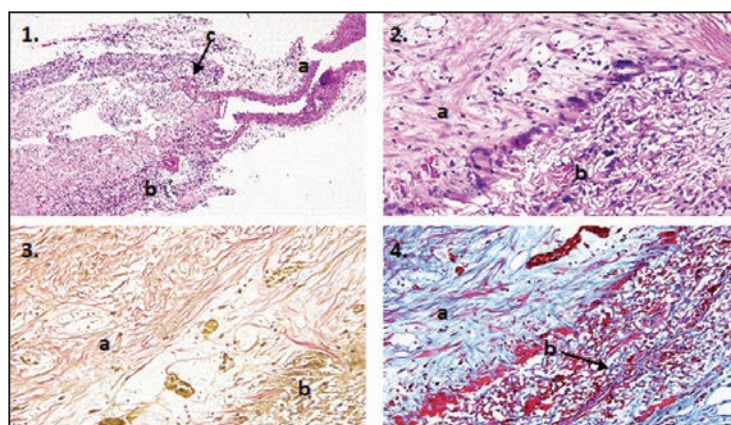


Рис. 3. Сосудистый PCL-графт через 6 недель после имплантации в брюшную часть аорты крысы: 1. Окр. гематоксилином и эозином, ув. 40: а – интактная аорта, б – PCL-графт, с – зона анастомоза; 2. Окр. гематоксилином и эозином, ув. 400: а – неоинтима, б – стенка графта, инфильтрированная клетками; 3. Окр. по Ван-Гизону, ув. 400: а – неоинтима, б – стенка графта; 4. Окр. по Маллори, ув. 400: а – неоинтима, б – участки коллагена в стенке графта.

и выведения животных. Имплантированный графт выделяли с прилежащими участками нативной аорты. При гистологическом исследовании в просвете графта и зонах анастомозов был выявлен сплошной слой неоинтимы (рис. 3). Внутренняя поверхность графта была покрыта эндотелиальными клетками, большинство из которых имело увеличенные гиперхромные ядра и уменьшенный ядерно-цитоплазматический индекс по сравнению с эндотелиальными клетками нативной аорты. Графт был инфильтрирован клетками с морфологическими признаками миофибробластов и макрофагов. Участки накопления коллагена богатые гликозаминогликанами, ламинином и фибронектином были выявлены по всей толщине и длине графта. Кроме того, не были зафиксированы гистологические признаки деградации протеза, что указывает на медленную скорость разрушения полимера.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие в настоящее время сосудистых кондуитов малого диаметра, обладающих хорошей проходимостью и долговечностью, обуславливает попытки создания новых сосудистых графтов для заселения клетками *in vivo* на основе биодеградируемых полимерных матриц.

С одной стороны, идеальный искусственный графт должен обладать механическими свойствами, соответствующими нативным артериям. С другой стороны, он также должен имитировать морфологию внеклеточного матрикса, что может быть обеспечено высокопористой поверхностью, состоящей из нановолокон диаметром 5–500 нм и пор размером 5–500 мкм [11]. В свою очередь механические свойства, а также микро- и наноструктура конечного продукта будут зависеть не только от используемого полимера, но также и от метода его изготовления. Одним из способов создания полимерных графтов, который привлекает все больше внимания в последние годы, является электроспиннинг растворов полимеров. Данный метод позволяет создавать тканеинженерные пористые матрицы, состоящие из тончайших волокон.

Результаты сканирующей электронной микроскопии графта, изготовленного методом электроспиннинга, показали, что его стенка состоит из переплетенных между собой тонких волокон, образующих поры. Такая структура поверхности способна имитировать внеклеточный матрикс, подходящий для формирования на его основе новой ткани. Благодаря высокому коэффициенту отношения поверхности матрицы к ее объему увеличивается адгезия клеток на тканеинженерном графте, миграция клеток, а также их пролиферация и дифференцировка. Кроме того, пористость мате-

риала способствует транспорту питательных веществ к новообразующейся ткани.

Поскольку сосудистый графт имплантируют непосредственно в кровоток, он аналогично артериям должен выдерживать давление крови. Результаты физико-механических испытаний показали, что PCL-графты превосходят биопротезы «КемАнгиопротез» по показателям прочности и эластичности. Пористая структура PCL-графтов способствует увеличению их относительного удлинения без снижения модуля упругости. В свою очередь по ранее проведенным исследованиям известно, что биопротезы «КемАнгиопротез» обладают удовлетворительными физико-механическими свойствами, что позволяет их использовать в хирургической практике для имплантации в операциях по замещению пораженных артерий среднего и малого диаметров [9]. Можно предполагать, что PCL-графты не будут уступать по прочности протезам из биологического материала, а также нативным сосудам, при этом большая эластичность должна положительно отразиться на их гемодинамических характеристиках. В свою очередь значительное количество участков полимера, обнаруженное при гистологическом исследовании графтов через 6 недель после имплантации в брюшную часть аорты крыс, свидетельствует о медленной скорости деградации протеза. Благодаря этому возможно поддержание оптимальной прочности графта до момента формирования нового кровеносного сосуда.

Адгезия и морфологические изменения тромбоцитов на поверхности материала при контакте с кровью являются одними из показателей гемосовместимости. Результаты сканирующей электронной микроскопии внутренней поверхности PCL-графтов и биопротезов после контакта с кровью продемонстрировали высокий уровень адгезии тромбоцитов к полимерным кондуитам по сравнению с биологическими протезами. Хотя на PCL-графтах адгезировалось большое количество тромбоцитов, но их активированных форм не было обнаружено. Следует отметить, что в других работах, посвященных исследованию тканеинженерных матриц из поликапролактона, было показано, что данный материал не является цитотоксичным [12]. В свою очередь на основе результатов, полученных в данной работе, также может быть сделан предварительный вывод о том, что сосудистые графты на основе поликапролактона достаточно гемосовместимы *in vitro*. Однако для более полной оценки необходимо изучение их свойств *in vivo* в эксперименте на животных.

Для оценки возможности хирургического применения, функциональности и биосовместимости сосудистые PCL-графты с внутренним диаметром 2 мм имплантировали в брюшную часть аорты крыс.

Через 6 недель после имплантации графта в зонах анастомозов был обнаружен обширный слой неоинтимы, который распространялся по всей внутренней поверхности графта. Наличие гиперплазии неоинтимы в просвете графта характерно для большинства синтетических сосудистых протезов и возникает как процесс ремоделирования кровеносного сосуда после его повреждения в течение 2–24 месяцев [5]. При нормальном течении процесса ремоделирования кровеносного протеза образование неоинтимы не приводит к значительному стенозу [13], но существует ряд причин, которые могут приводить к активному синтезу и накоплению большого количества экстрацеллюлярного матрикса и, следовательно, к гиперплазии неоинтимы. К таким факторам относят различие в диаметрах сосуда и протеза, отсутствие эндотелиальных клеток, а также миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток. Повреждение стенки сосуда стимулирует изменение фенотипа гладкомышечных клеток. В свою очередь активированные гладкомышечные клетки мигрируют из меди и интимы сосуда, где активно секретируют экстрацеллюлярный матрикс, а также ряд цитокинов и ростовых факторов, в том числе IL-1, bFGF, TGF- β 1, TNF- α , стимулирующих метаплазию соединительной ткани [14]. Кроме того, одной из причин может быть низкое напряжение сдвига на стенке сосуда, образующееся в местах анастомозов. При низком напряжении сдвига на внутренней поверхности графта клетки и секретируемый внеклеточный матрикс не ориентируются в одном на-

правлении, а располагаются случайным образом, что также провоцирует рост неоинтимы. Современные подходы, направленные на подавление гиперплазии неоинтимы, достаточно разнообразны и включают в себя доставку в периваскулярную зону лекарственных препаратов, генов, ростовых факторов, а также адсорбирование на сосудистых протезах эндотелиальных клеток. Несмотря на то, что данные способы влияния на рост неоинтимы демонстрируют положительные результаты на экспериментальных моделях, проблема гиперплазии неоинтимы в сосудистых протезах малого диаметра до сих пор остается нерешенной [15, 16].

В то же время образование эндотелиального слоя на внутренней поверхности графта, инфильтрация его стенки клетками, а также образование внеклеточного матрикса, замещающего полимерный материал графта, обнаруженные через 6 месяцев после имплантации, являются главными характеристиками процесса заживления кондуита.

Таким образом, при изучении свойств PCL-графтов, изготовленных методом электроспиннинга, было выявлено, что данные протезы обладают необходимыми физико-механическими свойствами, достаточно гемосовместимы и могут служить каркасом для образования собственного сосуда после имплантации в кровеносное русло млекопитающих. Несмотря на это, необходима дальнейшая модификация полимерных графтов, которая будет способствовать подавлению гиперплазии неоинтимы и сохранению проходимости кровеносного сосуда.