

На правах рукописи

ПОПОВА Ирина Владимировна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА,
ИЗГОТОВЛЕННОГО МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИНИНГА

14.01.26 Сердечно-сосудистая хирургия;
03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подпись

Соискателя

Новосибирск – 2016

**Работа выполнена в Центре сосудистой и гибридной хирургии
ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России**

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор

КАРПЕНКО Андрей Анатольевич;

Научный руководитель кандидат биологических наук

ЛАКТИОНОВ Павел Петрович

Официальные оппоненты:

ФОКИН Алексей Анатольевич, доктор медицинских наук профессор, заслуженный врач РФ, (факультет послевузовского и дополнительного профессионального образования ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; Уральский федеральный округ, 45402092, г. Челябинск, Молодогвардейцев, 51; заведующий кафедрой хирургии)

СУББОТИН Дмитрий Викторович, кандидат биологических наук, доцент кафедры фундаментальной медицины НГУ, Новосибирск,

(кафедра фундаментальной медицины НГУ, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. 630090 кандидат биологических наук, доцент кафедры)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

"Научноисследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний" (г. Кемерово)

Защита состоится 29.06. 2016 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.063.01 при ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России.

Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15; e-mail:

Lenko@meshalkin.ru

http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России
и на сайте http://meshalkin.ru/nauchnaya_deyatelnost/dissertatsionnyy_sovet/soiskateli

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций
д-р мед. наук, профессор

Ленько Евгений Владимирович

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БПВ – большая подкожная вена

БПШ – бедренно-подколенное шунтирование

БТШ – бедренно-тибиальное шунтирование

ВПКЧ – вена пупочного канатика человека

ГА – глутаральдегид

ГФИП – 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол ДС

– дуплексное сканирование

ЛСК – линейная скорость кровотока

МРТ – магнитно-резонансная томография

МПВС – малопроницаемый внутренний слой

ПКЛ – поликапролактон

ПКС – протез кровеносного сосуда

ПЛГА – полилактид-ко-гликолид

ПГК – полигликоливая кислота

ПЛКЛ – поли L-лактид с поликапролактоном

ПМК – полимолочная кислота

ПТФЭ – политетрафторэтилен

ПЭТФ – полиэтиленатрафталат

СД – сахарный диабет

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УЗДГ – ультразвуковая доплерография

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей **ОБЩАЯ**

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка новых материалов и развитие технологий в сосудистой хирургии до современного уровня позволили значительно улучшить лечение пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей. Несмотря на это частота послеоперационных осложнений, повторных операций и ампутаций остается достаточно высокой. Основной причиной снижения эффективности лечения, как правило, является тромбоз стентов, сосудистых шунтов и их анастомозов, что приводит к повторной ишемии нижней конечности и ставит под угрозу ее дальнейшую жизнеспособность (Покровский А.В. и др., 2002; Абалмасов К.Г. и др., 2004).

Результаты хирургической коррекции кровотока зависят от многих факторов: уровня и протяженности стенозированного/тромбированного участка артерии, диаметра сосуда и степени повреждения его стенки; наличия периферического (воспринимающего) и коллатерального кровеносного русла, технических особенностей операции (способа формирования анастомоза, вида сосудистого шва), используемого шовного материала. В литературе отмечено, что чем меньше диаметр протезируемого участка артерии – тем больше риск возникновения тромбоза (Бокерия Л.А. и др., 2010; Rychlik I.J., 2014).

В настоящее время биотрансплантаты и синтетические ПКС, применяемые в клиниках не полностью соответствуют требованиям,

предъявляемым к протезам кровеносных сосудов малого диаметра (менее 6 мм) и характеризуются высокой частотой осложнений (Abbott W.M. et al., 1997; Кохан Е.П. и др., 2001; Барбараш Л.С. и др., 2006). Следовательно, улучшение свойств протезов сосудов способных длительно функционировать в организме - является актуальной задачей сосудистой хирургии.

Необходимо отметить, что современное развитие химических технологий и физических методов позволяет получать трехмерные скаффолды с механическими свойствами, близкими к заменяемым органам. К числу этих технологий относится в первую очередь электроспиннинг – метод, позволяющий получать волокна из растворов полимеров и пригодный для изготовления протезов сосудов (Stegemann J.P. et al., 2007; Hasan A. et al., 2014).

НАУЧНАЯ ГИПОТЕЗА:

Протез, изготовленный методом электроспиннинга и содержащий малопроницаемый внутренний слой, позволит уменьшить степень интраоперационной кровопотери, снизить индукцию неоинтимы, сохранив диффузию питательных веществ из крови. Тогда как высокопористая наружная часть, проницаемая для клеток и новообразованных сосудов, обеспечит оптимальное формирование мышечного каркаса с сохранением прочности конструкции на протяжении всего времени биodeградации полимерных волокон.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать технологию и изготовить протезы сосудов методом электроспиннинга, обладающие повышенной био- и гемосовместимостью, пригодные для длительного функционирования в сосудистом русле.

Задачи исследования:

1. Разработать состав полимерной композиции и технологию изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга, в том числе и протезов с внутренним малопроницаемым слоем.
2. Изготовить три типа протезов сосудов, один контрольный и два с малопроницаемым внутренним слоем. Выполнить сравнительное исследование физических свойств протезов в соответствии с требованиями регламентирующих документов (ГОСТ Р ИСО 7198-2013) [20].
3. Оценить проницаемость протезов для крови, устойчивость к «разлохмачиванию» краев, формирование анастомозов с нативной артерией при выполнении основного этапа операции на экспериментальных животных.
4. Выполнить сравнительное исследование био- и гемосовместимости, склонность к формированию неоинтимы трех типов протезов приготовленных из различных полимерных композиций в сроки до 20 недель после имплантации экспериментальным животным.
5. Определить тип протеза в наибольшей степени отвечающего требованиям клиники.

Научная новизна исследования

1. Разработан протокол изготовления протеза кровеносного сосуда методом электроспиннинга, содержащего малопроницаемый внутренний слой (мпвс).
2. Установлено, что физико-химические характеристики трансплантатов, изготовленных по предложенному протоколу, соответствуют ГОСТ Р ИСО 7198-2013 по прочности на разрыв в продольном направлении, прочности на прорыв нитью, проницаемости, при этом малопроницаемый

внутренний слой повышает герметичность протеза и снижает степень кровопотери через его стенку и в зоне анастомоза.

3. Показано, что протезы, содержащие малопроницаемый внутренний слой, сохраняют свою функциональную стабильность в артериальной позиции в течение 20 недель наблюдения, способствуют формированию тонкой внутренней выстилки с эндотелий подобными клетками, а высокопористая наружная часть ПКС способствует активному заселению клеток и прорастанию питающих кровеносных сосудов из окружающих тканей.

Отличия полученных новых научных результатов от результатов, полученных другими авторами

Анализ литературных данных показывает, что используемые в клиниках биотрансплантаты и синтетические ПКС характеризуются высокой частотой осложнений. Следовательно, поиск не только оптимальных конструкций изделий, но и новых, более совместимых с организмом материалов является актуальной задачей сосудистой хирургии.

Проделанная работа носит проспективный характер. Разработан протокол, который ранее не был заявлен в мировой литературе, изготовления протезов кровеносного сосуда методом электроспиннинга, имеющих малопроницаемый внутренний слой.

Достоверность выводов и рекомендаций

Дизайн исследования, достаточное количество наблюдений, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к анализу с применением современных методов статистической обработки свидетельствуют о достоверности выводов и рекомендаций,

сформулированных в диссертационной работе. Представленные в настоящей работе выводы не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

Практическая значимость полученных новых научных знаний

Результаты исследования демонстрируют новые возможности использования метода электроспиннинга в качестве альтернативного способа изготовления протезов кровеносных сосудов. Полученные данные об экспериментальных протезах позволяют рекомендовать их к полноразмерным доклиническим и клиническим исследованиям.

Краткая характеристика клинического материала (объекта исследования) и научных методов исследования

Разработан протокол изготовления протеза кровеносного сосуда с малопроницаемым внутренним слоем.

Работа содержит результаты стендовых испытаний и данные, полученные после выполненных 45 операций по имплантации экспериментальных ПКС в брюшной отдел аорты животных (крысы линии Wistar).

Дана интраоперационная оценка качества, био- и гемосовместимости экспериментальных протезов путем их имплантации на 2, 4 и 20 недель в аорту крыс. По завершению срока наблюдения исследована проходимость протезов с помощью МРТ и УЗИ, определена степень индукции неоинтимы при помощи обзорной микроскопии, а также клеточное заполнение путем обзорной флуоресцентной микроскопии, гистологического и иммуногистохимического анализа.

Для накопления данных и их первичной сортировки использовался Microsoft Excel 2010. Результаты исследований были обработаны с использованием пакета программ для статистической обработки “Statistica 7” в среде Windows 7 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены простым указанием количества, средним $\pm$ стандартное отклонение, медиана (25; 75 перцентиль), доли в процентах. Достоверность различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента. Для оценки связи между показателями вычислялся коэффициент линейной корреляции Пирсона. Сравнения качественных признаков проводились тестом Хи-квадрат. Различия считали статистически значимыми при $< 0,05$.

Методы исследования и используемая аппаратура

Протезы изготавливали на установке для электроспиннинга NF-103 (Месс. СО, Япония), используя синтетические полимеры (поликапролактон; раствор сополимера молочной и гидроксипропановой кислот), биологический полимер (желатин из кожи свиньи), растворитель - 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол.

Для исследования свойств протезов сосудов использовали электронный микроскоп JSM-6460 LV (Jeol, Япония), разрывную машину Zwick/Roell Z100 (Германия), стенд для гидродинамических испытаний собственного изготовления.

При исследовании био- и гемосовместимости использовали: операционный микроскоп OPMI PICO (Carl Zeiss, Германия), МРТ и УЗИ, микроскоп Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия), криостат «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия). Криосрезы окрашивали: гематоксилин - эозином, методом фон –

Косса, методом Пикро-Маллори, анализировали на микроскопе AxioVision FL-40 (Carl Zeiss, Германия).

Для иммуногистохимии были применены: маркер ЭК - anti-CD31, маркер ГKM - anti- α -sma, маркеры межклеточного матрикса - anti-collagen I и antifibronectin, маркер фибробластов anti-CD90, маркер ЭК (Isolectin GS-IB4), а также вторичные антитела (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Готовые препараты заключали в среду «Vectashield mounting medium with DAPI» (Vector laboratories, США) и анализировали с помощью лазерного сканирующего инвертированного флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM710.

Личный вклад автора в получении новых научных результатов данного исследования

Автором лично выполнены все операции по имплантации и забору экспериментальных протезов, а также контроль над состоянием животных на протяжении всего срока наблюдения. Автор принимала участие в изготовлении протезов сосудов и исследовании их механических свойств, функциональной оценке протезов с помощью доплеровского сканирования и МРТ-диагностики, исследовании послеоперационной морфологической и гистологической картины полученных результатов. Провела статистическую обработку данных, анализ и интерпретацию полученных данных.

Реализация и внедрение результатов исследований

Основные положения диссертации, полученные в процессе исследования, способствуют совершенствованию способа изготовления протеза кровеносного сосуда и определению трансплантата, рекомендуемого для дальнейшей клинической апробации.

Апробация работы и публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 2 печатные работы в журналах из перечня ВАК и получен 1 патент на изобретение.

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

1. Новейшие материалы клеточных технологий в медицине (Новосибирск, 2014).
2. The second ESVS Spring meeting for Vascular Biology, Materials and Engineering (Лондон, 2014).
3. I-й Ежегодный семинар УНУ Центра генетических ресурсов лабораторных животных (Новосибирск, 2015).
4. XXX Международная конференция «Новые направления в лечении сосудистых больных (Сочи, 2015).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, содержащих литературный обзор, описание используемых материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Указатель литературы содержит 56 отечественных и 97 зарубежных источников.

Работа иллюстрирована 6 таблицами и 35 рисунками.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Предложенный протокол изготовления сосудистых протезов методом электроспиннинга с малопроницаемым внутренним слоем позволяет получить полимерный каркас, обладающий достаточными механическими характеристиками, а именно прочностью на разрыв, прочностью на прорыв

нитью, устойчивостью к расслоению при воздействии длительной гидродинамической нагрузки в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7198-2013.

2. Проведенная хирургическая оценка изготовленных сосудистых протезов показала их хорошую адаптацию с нативной артерией, устойчивость на прорезывание ниткой и к "разлохмачиванию" краев, низкую проницаемость для клеток крови при наличии в их структуре мпвс.

3. При длительной оценке био- и гемосовместимости протезов на экспериментальных животных было отмечено, что изготовленные протезы являются тромборезистентными, не вызывают избыточного образования неофиброзной капсулы, неоинтимы, при этом наилучшую биосовместимость имеют протезы из ПКЛ с желатином и мпвс.

4. По совокупности данных: прочностных характеристик полученных при стендовых испытаниях и биологических параметров у экспериментальных животных наиболее оптимальным оказался протез из ПКЛ с желатином и мпвс, который рекомендуется для доклинических и клинических исследований.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Для достижения цели и решения поставленных задач была намечена схема исследования, которая включала в себя: разработку протокола изготовления ПКС методом электроспиннинга, оценку их механических свойств *in vitro*, исследование био- и гемосовместимости путем имплантации ПКС в брюшной отдел аорты крыс, с последующим интраоперационным анализом, оценкой проходимости (УЗИ и МРТ), обзорной микроскопией, а также исследованием гистологической и иммуногистохимической картины.

Протокол изготовления ПКС с мпвс включает в себя: формирование волокон на электроде-коллекторе из 10% от требуемого объема полимерной смеси, остановку электроспиннинга и нанесение поверх волокон 2% водного раствора желатина, после чего возобновление электроспиннинга в прежнем

режиме до израсходования всего запланированного объема раствора (90%). По завершению выполняется сшивка белка с помощью глутарового альдегида, глицина и отмывания в апиrogenной дисстилизованной воде.

Стендовые испытания

Разработан протокол создания ПКС с мпвс и изготовлены экспериментальные трансплантаты (см. рис. 1).

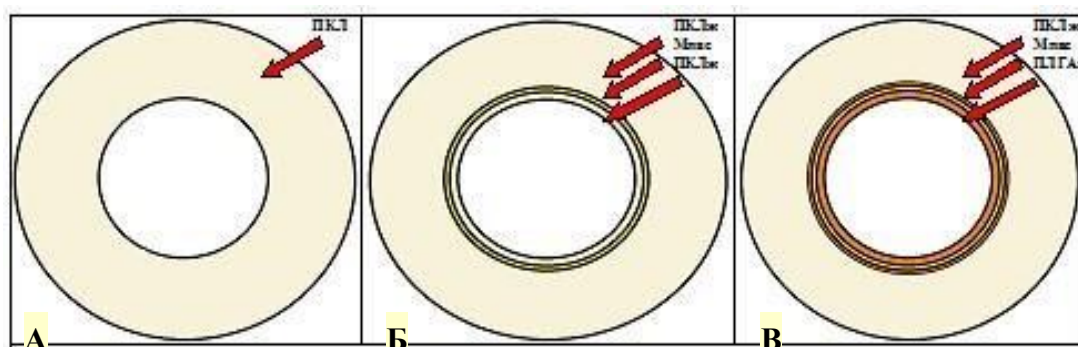


Рисунок 1. Варианты экспериментальных сосудистых протезов.

Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона с желатином и мпвс; В) протез из поликапролактона с желатином с внутренним слоем из ПЛГА с желатином и мпвс

Структура поверхности исследуемых протезов была достаточно ровная/гладкая, не имела посторонних включений и красителей. Данные сканирующей электронной микроскопии демонстрируют, что матриксы состоят из волокон диаметром в среднем 1 микрон и пор между ними с размером 6,6 мкм. Длина протезов составила 70-80 мм, внутренний диаметр 1,7 мм, толщина стенки 150-200 мкм. В протезах 2 и 3 типа мпвс определяется как уплотненный слой толщиной 15 ± 3 микрона.

Обнаружено, что протезы, содержащие желатин в стартовом растворе на 20-30% прочнее по сравнению с ПКС из чистого ПКЛ (см. таб.1). Введение мпвс практически не влияло на прочностные характеристики протезов.

Таблица 1

Механические свойства экспериментальных протезов

Тип протеза	Прочность в области упругой деформации (Мпа)	Относительное удлинение (%)	Прочность на разрыв в продольном направлении (Мпа)	Относительное удлинение (%)	Прочность на прорыв ниткой грамм силы	Прочность на сдавливание(грамм силы)
1. протез из ПКЛ (контроль)	1,2±0,2	7±2	2,3±0,5	860±120	160±20	20±2
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	1,4±0,2	11±2	2,1±0,5	450±100	170±20	19±2
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	1,4±0,2	11±2	2,1±0,5	450±100	170±20	19±2
p- уровень	p _(1,2,3) =0,824	p _(1,2,3) =0,79	p _(1,2,3) =0,856	p _(1,2,3) =0,005 p _(1,2) < 0.001 p _(1,3) < 0.001 p _(2,3) = 1	p _(1,2,3) =0,787	p _(1,2,3) =0,787

Примечание: В таблице указано среднее значение ± стандартное отклонение. Сравнение по вертикали: p_(1,2,3) - сравнение трех типов протезов; p_(1,2) - протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; p_(1,3) – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; p_(2,3) – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

Наличие мпвс в структуре стенки протеза позволило снизить показатель проницаемости с 20 мл/см²/мин (ПКС из 1 группы) до 0,07-0,15 мл/см²/мин (ПКС 2 и 3 группы).

Гидродинамические испытания при выполнении с перепадами давления физ. раствора до и после протеза от 100 до 200 мм.рт.ст., демонстрировали высокую функциональную стабильность всех типов ПКС.

Экспериментальная часть *in vivo*

В зависимости от типа имплантированного экспериментального протеза в инфраренальный отдел аорты (45 крыс) были выделены три группы наблюдения: 1) протез из ПКЛ, 2) протез из ПКЛ с желатином и мпвс, 3) протез из ПКЛ с желатином ПЛГА - мпвс (см. таб. 2).

Таблица 2

Распределение животных по полу в группах

Характеристика	1 группа (15 крыс)	2 группа (15 крыс)	3 группа (15 крыс)	р-уровень
мужской n (%)	10 (66,7%)	8 (53,3%)	6 (40%)	$p_{(1,2,3)} = 0,35$
масса животного	$422,6 \pm 34,3 /$ 420 (400;450)	$434,6 \pm 51,2 /$ 430 (400;500)	$462,66 \pm 18,3 /$ 460 (450;480)	$p_{(1,2,3)} = 0,016$ $p_{(1,2)} = 0,457$ $p_{(1,3)} < 0,001$ $p_{(2,3)} = 0,56$
диаметр аорты	$1,7 \pm 0,04 /$ 1,8 (1,7;1,8)	$1,7 \pm 0,05 /$ 1,8 (1,7;1,8)	$1,8 \pm 0,09 /$ 1,8 (1,8;1,9)	$p_{(1,2,3)} = 0,293$
длина имплантированного протеза	$12,5 \pm 1,18 /$ 12 (12;13)	$12,0 \pm 0,7 /$ 12 (12;13)	$12,2 \pm 0,7 /$ 12 (12;13)	$p_{(1,2,3)} = 0,367$

Примечание: Количественные данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение / медиана (25; 75 процентиль). Качественные признаки представлены как число (%). Сравнение по горизонтали: $p_{(1,2,3)}$ - сравнение трех типов протезов; $p_{(1,2)}$ - протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; $p_{(1,3)}$ – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; $p_{(2,3)}$ – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

Интраоперационная оценка качества изготовленных протезов показала их хорошую устойчивость к «разломачиванию» при отрезании части ножницами, способность сохранять свою цилиндрическую форму на

протяжении всех этапов имплантации. Формирование анастомозов не сопровождалось подворачиванием краев трансплантата, а область соединения протеза с нативной артерией была в виде плотного контакта.

В условии пульсирующего кровотока отмечалась хорошая растяжимость протезов. После запуска кровотока по имплантированному протезу, наблюдалось выраженное пропитывание кровью стенки

ПКС из ПКЛ без мпвс и потребовалось более длительное время для местного гемостаза (время от снятия зажимов с аорты до прекращения кровотечения из области проколов иглой) в отличие от протезов, содержащих такой слой (см. таб. 3).

Таблица 3

Время операции и окклюзии аорты в группах

Тип протеза	Общее время операции (минут)	Время окклюзии аорты (минут)	Время гемостаза (минут)
1. протез из ПКЛ	$103 \pm 13,3 / 100(90;110)$	$55,8 \pm 5,5 / 56 (50;60)$	$9,2 \pm 1,4 / 9(8;10)$
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	$112,4 \pm 10 / 115(105;120)$	$58,2 \pm 6,3 / 60(55;63)$	$5,6 \pm 1,1 / 5(5;6)$
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	$103,8 \pm 13,2 / 100(95;120)$	$57,4 \pm 5,8 / 55(54;63)$	$5,4 \pm 1 / 5(5;6)$
р-уровень	$p_{(1,2,3)} = 0,07$	$p_{(1,2,3)} = 0,37$	$p_{(1,2,3)} = < 0,001$ $p_{(1,2)} < 0,001$ $p_{(1,3)} < 0,001$ $p_{(2,3)} = 0,628$

Примечание: В таблице представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение / медиана (25; 75 перцентиль). Сравнение по вертикали: $p_{(1,2,3)}$ - сравнение трех типов протезов; $p_{(1,2)}$ - протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; $p_{(1,3)}$ – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; $p_{(2,3)}$ – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

Проходимость ПКС за весь период наблюдения составила: для 1 и 2 групп наблюдения - 100%; для 3 группы - 93,5% (тромбоз 1 ПКС на 2 недельном сроке).

Спустя двадцать недель после имплантации (УЗДГ) линейная скорость кровотока (ЛСК) статистически значимо не отличалась между 3 типами трансплантатов ($p > 0,07$) и от скорости кровотока в аорте 5 крыс контрольной группы, т.е. без хирургического вмешательства ($p > 0,205$). В протезе из ПКЛ показатель ЛСК составил $1,06 \pm 0,1$ м/с, в ПКС из ПКЛ с желатином и мпвс $0,95 \pm 0,002$ м/с, а в протезе из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс $1,1 \pm 0,1$ м/с. Средняя линейная скорость кровотока в контрольной группе животных (без хирургического вмешательства) была равна $1,06 \pm 0,03$ м/с.

Объемная скорость кровотока по данным МРТ на 4 неделе наблюдения для ПКС из ПКЛ с желатином и ПЛГА – мпвс имела наибольшее значение, а для протеза из ПКЛ с желатином и мпвс занимала промежуточное положение между 1 и 3 группами (см. таб. 4).

Таблица 4

Объемная скорость кровотока в зоне хирургического вмешательства
на 4 неделе наблюдения (мл/мин)

Тип протеза	V1	V2	V3	V4	V5	p _(1,2,3,4,5)
1. протез из ПКЛ	$8,6 \pm 3,4 / 7,3$ (7,1;9,9)	$9,1 \pm 3 / 7,5$ (6,2;11,4)	$7,9 \pm 2 / 7$ (6,4;10,1)	$9,2 \pm 2,4 / 10,3$ (8,1;11,2)	$9,9 \pm 3,4 / 9$ (7,7;11,8)	0,866
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	$12,7 \pm 5,5 / 12,8$ (10,5;16,8)	$12,9 \pm 5,5 / 15,3$ (9,8;15,5)	$12,5 \pm 4,1 / 13,4$ (9,5;13,8)	$14,3 \pm 5,2 / 13,7$ (9,4;19,2)	$13,1 \pm 4,5 / 11,8$ (10,5;17)	0,982

3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	17,5 ± 2,1/ 17 (16,7;18,9)	16,7 ± 3/ 17 (16,7;18,9)	14,5 ± 3,3 14,3 (12;17)	17,4 ± 3,1/ 16,8 (14,7;18,9)	17,2 ± 7,9/ 15 (14,3;24,1)	0,802
р - уровень	p _(1,2,3) =0,014 p _(1,2) =0,197 p _(1,3) =0,001 p _(2,3) =0,111	p _(1,2,3) =0,035 p _(1,2) = 0,211 p _(1,3) =0,004 p _(2,3) =0,212	p _(1,2,3) =0,025 p _(1,2) =0,058 p _(1,3) =0,006 p _(2,3) =0,449	p _(1,2,3) =0,017 p _(1,2) =0,086 p _(1,3) =0,001 p _(2,3) =0,295	p _(1,2,3) =0,163 p _(1,2) = 0,238 p _(1,3) =0,095 p _(2,3) =0,347	

Примечание: В таблице представлено среднее значение ± стандартное отклонение / медиана (25; 75 процентиль); V1–аорта проксимально от протеза; V2–проксимальный анастомоз; V3–середина протеза; V4–дистальный анастомоз; V5–аорта дистально от протеза. Сравнение по горизонтали: p_(1,2,3,4,5) – сравнение показателей внутри одной группы; Сравнение по вертикали: p_(1,2,3) - сравнение трех типов протезов; p_(1,2) - протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; p_(1,3) – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; p_(2,3) – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

По сравнению с 4 недель, на 20 неделе наблюдения у всех типов экспериментальных протезов внутри группы отмечается тенденция к постепенному повышению объемной скорости кровотока во всех точках фиксации, однако это не было статистически значимым (в первой группе p = 0,599; во второй группе p = 0,395; в третьей группе p = 0,488). Достоверной разницы между 3 группами ПКС и между 5 точками показателей кровотока внутри групп на 20 неделе наблюдения также не было выявлено (p ≥ 0,05) (см. таб. 5).

В послеоперационном периоде не наблюдалось диастаза, нагноений или других осложнений послеоперационной раны, окружающих тканей и самих протезов. Макроскопически не было выявлено деформаций стенки и изменения цвета экспериментальных ПКС. При этом определялось достаточно плотное фиксирование трансплантатов с окружающими тканями и выраженная васкуляризация.

Трансплантаты из ПКЛ на 2 и 4 неделе после имплантации имели тенденцию к увеличению своего диаметра на 15-10%, в отличие от протезов содержащих мпвс. А статистически значимая разница толщины стенки протеза была выявлена между 3 группами на всех сроках наблюдения и внутри группы у протезов из ПКЛ с желатином и ПЛГА (см. рис.2 и таб. 5).

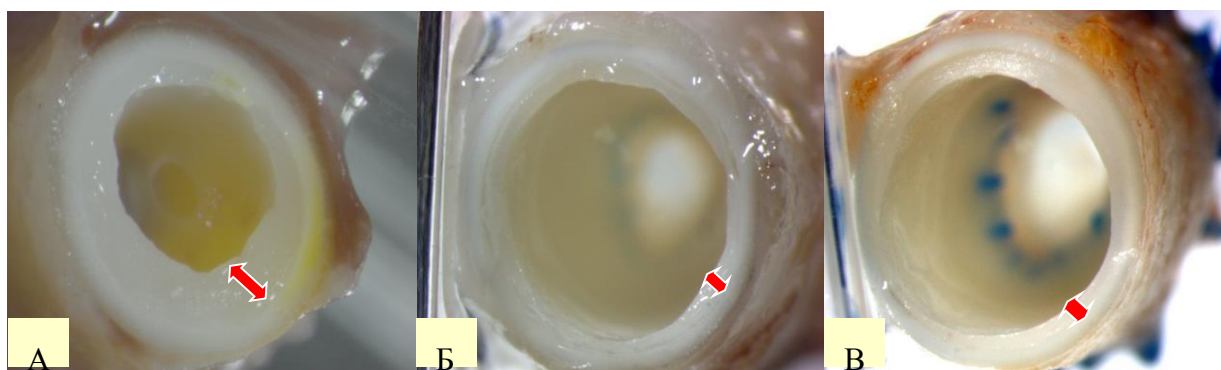


Рис. 2. Обзорная микроскопия сосудистых протезов на 20 неделе наблюдения, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение x100.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА. Стрелками обозначена толщина сформированной неоинтимы.

Таблица 5

Толщина стенки экспериментальных протезов в зависимости от срока наблюдения (мкм)

Тип протеза	2 неделя наблюдения	4 неделя наблюдения	20 неделя наблюдения	р-уровень
1. протез из ПКЛ	395 ± 111,3/ 381,4 (363,8;408,8)	282 ± 38,6/ 280 (270,4;291,9)	374 ± 83,8/ 353,4 (329,1; 430,4)	p* (1,2,3)=0,119
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	298 ± 80,9/ 298,77 (240,18; 332,6)	226 ± 28,7/ 235,38 (209,06; 235,53)	231 ± 46,7/ 256,44 (195,6; 258,3)	p* (1,2,3)=0,122
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА - мпвс	210 ± 30,7/ 211,88 (182,5; 235,5)	193 ± 33,8/ 182,3 (170; 222)	261 ± 36,3 261 (246,1;265,2)	p*(1,2,3) = 0,02 p(1)= 0,422 p(2)= 0,015 p(3)= 0,044

p - уровень	$p_{(1,2,3)}=0,013$ $p_{(1,2)}=0,154$ $p_{(1,3)}=0,007$ $p_{(2,3)}=0,053$	$p_{(1,2,3)}=0,004$ $p_{(1,2)}=0,03$ $p_{(1,3)}=0,095$ $p_{(2,3)}=0,83$	$p_{(1,2,3)}=0,006$ $p_{(1,2)}=0,002$ $p_{(1,3)}=0,024$ $p_{(2,3)}=0,015$	
-------------	--	--	--	--

Примечание: В таблице представлено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение / медиана (25; 75 процентиль). Сравнение по горизонтали: $p^*_{(1,2,3)}$ – сравнение на всех сроках наблюдения; $p_{(1)}$ – сравнение 2 и 4 недель наблюдения; $p_{(2)}$ – сравнение 2 – 20 недель наблюдения; $p_{(3)}$ – сравнение 4-20 недель наблюдения. Сравнение по вертикали: $p_{(1,2,3)}$ – сравнение трех типов протезов; $p_{(1,2)}$ – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; $p_{(1,3)}$ – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; $p_{(2,3)}$ – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

Следует отметить, что толщина стенки протезов на 20 неделе наблюдения значимо не влияла на показатели линейной скорости кровотока (коэффициент корреляции Пирсона $R_{xy}=0,14$, $p > 0,6$).

По результатам гистологического исследования (окраска гематоксилин - эозином, фон - Коссу, Пикро – Маллори) отмечалась этапность вживления ПКС (см. рис. 3):

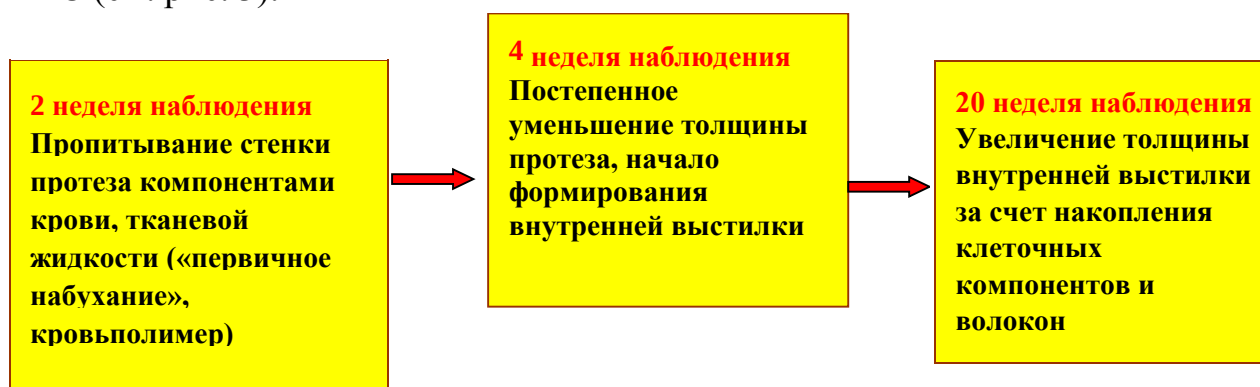


Рис. 3. Этапы вживления экспериментальных протезов в артериальную позицию.

На всех сроках наблюдения экспериментальные ПКС не имели признаков острого или хронического воспаления (полиморфноядерных лейкоцитов, гигантских клеток и лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов). Связь трансплантатов с нативным сосудом осуществлялась за счет образования регенеративной ткани, вплетающейся в их концы.

На второй неделе наблюдения наружная фиброзная капсула на всем протяжении ПКС была представлена в большей степени коллагеновыми волокнами, фибробластами и миоцитами, в меньшей эластическими волокнами. Важной отличительной характеристикой у протезов на этом сроке являлась глубина проникновения свежих эритроцитов в их стенку. При этом вся толщина стенки протезов из ПКЛ была заполнена форменными элементами крови, тогда как в протезах из второй и третьей групп (ПКЛ с желатином и мпвс; ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА) локализация клеток крови была ограничена малопроницаемым внутренним слоем. В составе внутренней выстилки выявляются циркулярно-направленные эластические волокна (в большей степени) и в меньшей коллагеновые.

На четвертой недели наблюдения у всех типов протезов наружная фиброзная капсула представлена элементами соединительной ткани богатой кровеносными сосудами. Экспериментальные ПКС представляют собой каркас из синтетических волокон с плотным заполнением пор элементами соединительной ткани: ГМК, коллагеновыми и эластическими волокнами, при этом наиболее отчетливо выявлявшимися у протезов из ПКЛ и едва заметными у ПКС из 2 и 3 групп (с мпвс). У всех типов трансплантатов в области анастомозов слой неоинтимы был более толстый по сравнению со средней частью, что связано с наличием узловых швов, которые изменяют направление пучков коллагеновых и эластических волокон с циркулярного на перпендикулярное по отношению к плоскости стенки сосуда. Внутренняя выстилка состоит в большей степени из эластических волокон, ГМК и имеет участки с разной степенью утолщения. При этом у ПКС с мпвс неоинтима представляет собой тонкий и равномерный слой с эндотелиоцитподобными клетками, в отличие от ПКС без такого слоя.

На двадцатой неделе наблюдения в наружной капсуле трансплантатов содержатся структуры характерные для зрелой рыхлой соединительной ткани с большим количеством кровеносных сосудов. Явных признаков значимой биodeградации полимера при гистологическом исследовании у всех типов ПКС не было выявлено, т.к. их стенка хорошо определяется и представлена синтетическими волокнами, между которыми находятся ГМК, коллагеновые волокна с наружной части и эластические волокна со стороны просвета сосуда. На этом сроке наблюдения выраженным отличием является внутренняя выстилка, которая у ПКС из поликапролактона имеет вид рыхлой структуры, не содержащей эндотелиоцит-подобных клеток, тогда как у протезов с мпвс она определяется в виде плотного волокнистого слоя с ГМК и клетками похожими на клетки эндотелия.

Окраска по методу фон – Косса показала ограниченное малопроницаемым внутренним слоем распределение фосфатов кальция у протезов из 2 и 3 групп (содержащих мпвс) на всех сроках наблюдения, тогда как у ПКС из ПКЛ фосфаты кальция были равномерно расположены по всей толщине стенки на 2 неделе и локально на границе неointима – протез на 4-й и 20-й неделях.

Иммуногистохимический анализ показал, что наибольшее количество маркеров CD31 (эндотелиальных клеток) было выявлено на 4 неделе у протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс, однако к 20 неделе их количество значительно снижалось. С учетом длительности наблюдения у протеза из поликапролактона обнаружено прогрессирующее накопление маркеров гладкомышечных клеток во внутреннем слое, тогда как маркеры эндотелиальных клеток практически отсутствуют. Протезы из ПКЛ с желатином и мпвс на протяжении всего срока наблюдения характеризуются равномерным процессом замещения чужеродного материала клетками

хозяина, при этом выявляются обширные области занятые эндотелиоцитоподобными и гладкомышечными клетками, что более характерно для процесса эндотелизации (см. рис. 4).

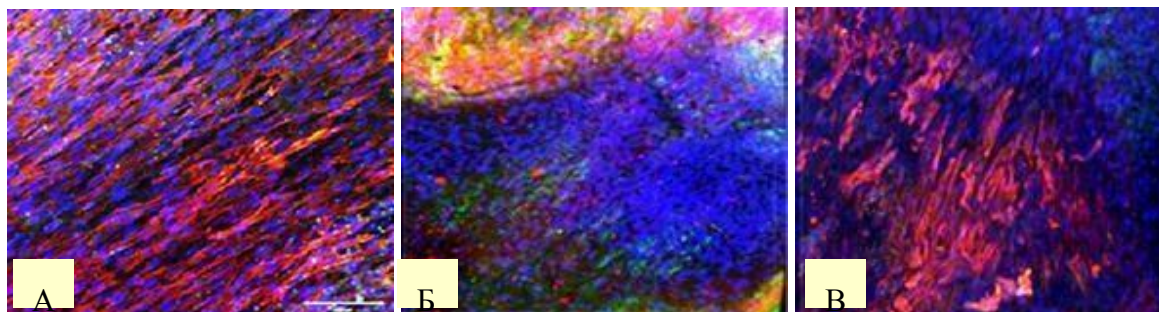


Рис. 4. Окраска экспериментальных протезов через 20 недель после имплантации на маркеры гладкомышечных клеток – α SMA (красный цвет) и эндотелиальных клеток - CD31 (зеленый цвет)

Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона, желатина и мпвс; В) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, полилактидкогликолида.

Выводы

1. Разработаны протоколы изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга из растворов поликапролактона и полилактид-ко-гликолида в гексафторизопропанол. Для улучшения механических и биологических свойств предложено вводить в растворы базовых полимеров 10% желатин, что позволяет увеличить прочность сосудистой стенки и сформировать интегрированный малопроницаемый слой для воды, непроницаемый для клеток крови.

2. Физические свойства протезов сосудов исследованы в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 7198-2013. Показано, что прочность сосудов на разрыв составляет для ПКЛ $2,3 \pm 0,5$ МПа, для ПКЛ с желатином и мпвс $2,1 \pm 0,5$ МПа и для ПКЛ с желатином и ПЛГА – мпвс, $2,1 \pm 0,5$ МПа, прочность на прорыв ниткой 160 ± 20 , 170 ± 20 и 170 ± 20 МПа, проницаемость для воды 20 мл/см²/мин, 0,07-0,15 мл/см²/мин и 0,07-0,15 мл/см²/мин, соответственно.

3. Интраоперационная оценка качества изготовления протезов показала, что они устойчивы к «разлохмачиванию» при отрезании их ножницами. Через проколы стандартными атравматическими иглами в сосудах с мпвс нет кровопотери, что достоверно снижает время гемостаза анастомозов в момент основного этапа операции. При запуске кровотока по имплантированному сосуду было отмечено, что протезы без малопроницаемого внутреннего слоя пропитываются кровью, в отличие от протезов, содержащих такой слой.

4. При оценке гемо- и биосовместимости, проходимость для протезов из ПКЛ и протезов из ПКЛ с желатином и мпвс составила 100%, для протезов из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс – 93,5%, при этом линейные скорости кровотока во всех типах трансплантатов на 4 и 20 неделях наблюдения не отличались от нормальных. Аневризматического расширения и дефектов трансплантатов не наблюдалось во всех сравниваемых группах, однако внешний диаметр протезов из ПКЛ через 20 недель увеличивается на 10-15%. Толщина стенки протезов варьируется в зависимости от времени имплантации – увеличиваясь на 2 неделе, слегка уменьшаясь на 4 неделе и значительно увеличиваясь к 20 неделе, при этом протезы с малопроницаемым внутренним слоем способствуют образованию структур соединительной ткани и формированию более тонкой внутренней выстилки с большим количеством эндотелий - подобных клеток в отличие от протезов без такого слоя.

5. По совокупности свойств, а именно: прочности, способности к активному заселению матрикса клетками, прорастанию питающих кровеносных сосудов снаружи в стенку трансплантата, а также формированию минимального слоя неоинтимы, кальцификации и синтеза коллагеновых и эластических волокон из соединительнотканых белков, протез из поликапролактона с желатином и малопроницаемым внутренним слоем может быть рекомендован для дальнейшего клинического исследования.

Практические рекомендации

1. Для улучшения физико-механических характеристик и повышения адгезии, пролиферации клеток - при изготовлении протезов сосудов из синтетических полимеров методом электроспиннинга, дополнительно рекомендуется включать в состав стенки биополимер - желатин.

2. Не стоит включать синтетический полимер - ПЛГА в качестве самостоятельного слоя, т.к. это увеличивает длительность формирования внутренней выстилки сосуда, однако в составе композиций с другими синтетическими полимерами его использование рекомендуется.

3. Для замены участка поврежденного сосуда рекомендуется использование протеза, изготовленного методом электроспиннинга и содержащего малопроницаемый внутренний слой, так как он обладает наименьшей степенью пропитывания кровью и временем для местного гемостаза.

4. Необходимость предварительной обработки кровью сосудистых протезов отсутствует, однако рекомендуется смочить его физиологическим раствором перед имплантацией. Не допускается контакт протеза с органическими растворителями, например, спиртом.

5. Процедура имплантации заявленных в настоящей работе протезов не должна сопровождаться грубыми манипуляциями на трансплантате или нативном сосуде, особенно в зоне анастомоза. Не следует накладывать на протез зажим и цеплять пинцетом его внутренний слой стенки.

6. Протез не перекручивается и не деформируется во время имплантации, однако необходимо точное соответствие длины и диаметра протеза заменяемому участку сосуда, т.к. его избыток или недостаток может стать причиной деформации зон анастомозов и, следовательно, его дисфункции. Запрещается использование слишком короткого протеза, т.к. его подтягивание может приводить к отслойке внутреннего слоя.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Публикации в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных в действующем
перечне ВАК

1. Изучение проходимости сосудистого протеза, изготовленного методом электроспиннинга / Попова И.В., Степанова А.О., Плотникова Т.А., Сергеевичев Д.С., Акулов А.Е., Покушалов А.А., Лактионов П.П., Карпенко А.А. // **Ангиология и сосудистая хирургия**, - 2015, - том 21, - №2, с. 136-141.
2. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте *in vitro* и *in vivo* / Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С., Акулов А.Е., Захарова И.С., Покушалов А.А., Лактионов П.П., Карпенко А.А. // **Патология кровообращения и кардиохирургия**, 2015, № 4, с. 63-71.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и
международных конференций и симпозиумов.

3. Электронно-лучевая обработка протезов сосудов, изготовленных методом электроспиннинга / Лебедева А.О., Афонин Ю.В., Демьянова А.Ю., Коробейников М.В., Юношев А.С., Карпенко А.А., Попова И.В., Покушалов Е.А., Акулов А.Е., Ромащенко А.В., Лактионов П.П. // конференция «Взаимодействие высококонцентрированных потоков энергии с материалами в перспективных технологиях и медицине», Новосибирск. 26-29 марта 2013, С. 106.
4. Biocompatibility of electrospun produced vacular grafts and modification of their stiffness with electron-beam irradiation / Lebedeva A.O., Afonin Yu.V., Cherepanova A.V., Demianova A.Yu., Korobeinikov M.V., Yunoshev A.S., Karpenko A.A., Popova I.V., Pokushalov E.A., Laktionov P.P. «TERMIS-EU 2013, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society», Стамбул, 17-20 июня 2013, P. 256.
5. Electrospun-produced small diameter vascular grafts: modification of the phisical properties and the assesment of their biocompartibility / Laktionov P.P.,

Lebedeva A.O., Korobeinikov M.V., Yunoshev A.S., Karpenko A.A., Popova I.V., Sergeevichev D.S., Pokushalov E.A. // The second ESVS Spring meeting for Vascular Biology Materials and Engineering, Лондон, 16-17 May 2014, P. 692.

6. Разработка и исследование гемо- и биосовместимости сосудистого протеза нового поколения / Попова И.В., Карпенко А.А., Сергеевичев Д.С., Шилова А.Н., Кармадонова Н.А., Степанова А.О., Лактионов П.П., Захарова И.С. // Двадцатый всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов, Москва, 23-26 ноября 2014, Т. 15, №6., С. 57.

7. «Экспериментальное изучение сосудистого протеза, изготовленного методом электроспиннинга» Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С., Покушалов Е.А., Захарова И.С., Шевченко А.И., Закиян С.М., Карпенко А.А., Лактионов П.П., // «Новейшие методы клеточных технологий в медицине», Новосибирск, 2-6 сентября 2014, С. 39.

8. Разработка и экспериментальное изучение тканеинженерного сосудистого протеза малого диаметра / Попова И.В. // Новые направления в лечении сосудистых больных. Сочи, 25-27 июня 2015. Материалы XXX международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. Т. 21., №2., С. 491.

9. Протезы сосудов малого диаметра, изготовленные методом электроспиннинга: модификация физико-химических свойств и исследование биосовместимости *in vitro* и *in vivo* / Степанова А.О., Попова И.В., Черноусова В.С., Коробейников М.В., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Власов В.В., Лактионов П.П. // Материалы II национального конгресса по регенеративной медицине. Москва. 3-5 декабря 2015. С. 173.

Патент.

1. Пат. 2572333 Российская Федерация, МПК А61L 27/58; А61L 33/06; А61F 2/06 Способ изготовления протезов сосудов малого диаметра с низкой пористостью [Текст] / Степанова А.О., Черноусова В.С., Попова И.В., Карпенко А.А., Покушалов Е.А., Караськов А.М., Лактионов П.П., Власов В.В. заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина" Минздрава России) (RU). - №2014143589; заявл. 28.10.2014; опубл. 10.01.2016, Бюл. №1. – 10 с.: ил.