

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

На правах рукописи

Гостев Александр Александрович

**Исследование биосовместимости и биостабильности синтетических
сосудистых протезов, изготовленных методом электроспиннинга из
полиуретана**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по
специальностям

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Научные руководители: д.м.н., проф. А.А.Карпенко,
к.б.н. П.П.Лактионов

Новосибирск 2020г.

Оглавление

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
НАУЧНАЯ ГИПОТЕЗА	7
ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ	8
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ.....	9
ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ	9
ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.....	10
АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ	10
ПУБЛИКАЦИИ	11
ДОСТОВЕРНОСТЬ ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ.....	12
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА.....	12
ГЛАВА 1 ПРОТЕЗЫ СОСУДОВ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОЛИУРЕТАНЫ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1 Актуальность проблемы	13
1.2 Виды протезов сосудов, их достоинства и недостатки.....	15
1.3 Методы производства тканеинженерных протезов сосудов.....	19
1.4 Применение полиуретанов в сердечно-сосудистой хирургии	21
1.4.1 Термопластичные полиэфирные полиуретаны	22
1.4.2 Полиуретаны с силоксановым сегментом.....	24
1.4.3 Поликарбонатные полиуретаны.....	25
1.4.4 Нанокompозитные полимеры	26
1.5 Способы улучшения биосовместимости и биостабильности полиуретановых тканеинженерных сосудистых протезов.....	28
1.6 Резюме	29
Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Общая структура эксперимента	30
2.2 Разработка протокола изготовления протезов.....	31
2.2.1 Реактивы:.....	31
2.2.2 Оборудование:	32
2.3 Методы:	32
2.3.1 Изготовление растворов для электроспиннинга из полиуретана	32
2.3.2 Получение матриц и протезов сосудов методом электроспиннинга	33
2.3.3 Обработка матриц и протезов сосудов глутаровым альдегидом	34
2.3.4 Исследование механических свойств матриц и протезов сосудов	34
2.3.5 Прочность материалов на прорыв нитью.....	35
2.3.6 Проницаемость протезов	35
2.3.7 Исследование податливости и давления разрыва протезов сосудов в условиях гидродинамической нагрузки	35
2.3.8 Определение области упругой деформации у материалов, изготовленных методом электроспиннинга.....	36

2.3.9 Исследование стабильности матриксов в физиологических условиях <i>in vitro</i>	36
2.3.10 Культивирование клеток	37
2.3.11 Исследование клеточной пролиферации на матриксах	37
2.3.12 Флуоресцентная микроскопия клеток на матриксах	37
2.3.13 Подготовка матриксов с клетками для сканирующей электронной микроскопии	38
2.3.14 Исследование влияния 3Д матриксов на гемостаз крови	38
2.3.15 Оценка высвобождения бивалирудина из матриксов <i>in vitro</i>	40
2.3.16 Измерение угла смачивания матриксов	40
2.3.17 Набор животных для исследования	41
2.3.18 Контроль содержания и использования животных.....	41
2.3.19 Процедура имплантации экспериментального протеза сосуда.....	43
2.3.20 Оценка проходимости протезированного участка аорты.....	44
2.3.21 Исследование морфологического строения протеза сосуда	45
2.3.22 Исследование экспериментального протеза сосуда на биостабильность	47
2.3.23 Статистическая обработка данных	48
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
3.1 Исследование механических свойств и цитотоксичности матриксов из Tecoflex.....	49
3.2 Исследование стабильности исследуемых 3Д матриксов в условиях <i>in vitro</i>	51
3.3 Изменение механических свойств матриксов при инкубации их в фосфатном буфере	53
3.4 Взаимодействие эндотелиальных клеток с поверхностью исследуемых матриксов	56
3.5 Исследование матриксов на гемосовместимость и тромбогенность поверхности	60
3.6 Сравнение механических свойств экспериментальных протезов сосудов и протезов сосудов из ПТФЭ.....	65
3.7 Экспериментальная часть <i>in vivo</i>	67
3.7.1 Интраоперационные показатели	67
3.7.2 Проходимость протезов сосудов.....	70
3.7.3 Исследования протезов сосудов на разных сроках наблюдения и обзорная микроскопия	72
3.7.4 Гистологическое исследование эксплантированных протезов.....	75
3.7.5 Исследование биodeградации эксплантированных протезов сосудов	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ.....	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВПКЧ – вена пупочного канатика человека

ГА – глутаральдегид

ГФИП - 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол

ДС – дуплексное сканирование

ЛСК – линейная скорость кровотока

ПУ – полиуретан

ПС – протез сосуда

ПТФЭ – политетрафторэтилен

СД – сахарный диабет

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УЗДГ - ультразвуковая доплерография

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ЭС – электроспиннинг

Жл – желатин

Бив – бивалирудин

Тек – полиуретан Tecoflex – EG 80A™

ВВЕДЕНИЕ

Старение населения, несбалансированное питание, низкая физическая активность способствуют широкому распространению атероклероза и связанной с ним необходимости реваскуляризации пораженных атеросклерозом артерий [1]. Несмотря на широкое использование сосудистых стентов, трехлетняя первичная проходимость стентированных артериальных сегментов ниже паховой складки составляет не более 19% [2, 3], что требует замены пораженных сосудов, т.е. открытого хирургического вмешательства. Для этой цели в современной хирургии используют аутологичные сосуды (вены или артерии) [4], децеллюляризованные ксеногенные сосуды [5] или синтетические протезы сосудов (ПС), изготовленные из вспененного политетрафторэтилена (ПТФЭ) [6], или полиэтилентерефталата (ПЭТ, Dacron) [7]. В то же время аутологичные сосуды не всегда доступны, а децеллюляризованные ксеногенные графты подвергаются дегенеративным изменениям с формированием аневризм в отдаленной перспективе [8]. Синтетические ПС хорошо зарекомендовали себя при замене сосудов большого диаметра, однако при протезировании сосудов малых диаметров (<6 мм), используемые для этих целей протезы из ПТФЭ часто стенозируются [9]. Это происходит из-за недостаточной податливости и биосовместимости материала, что в сумме, приводит к уменьшению сечения просвета сосуда в зоне анастомоза за счет тромбозов в раннем послеоперационном периоде, или гиперплазии неоинтимы в отдаленные сроки наблюдения [10]. В связи с этим, разработка новых синтетических ПС малого диаметра, которые обладали бы повышенной механической совместимостью, био- и гемосовместимостью и не были бы склонны к формированию гиперплазии неоинтимы является актуальной задачей.

Для изготовления ПС малого диаметра было предложено использовать биоразлагаемые или стабильные синтетические полимеры, такие как полилактид-ко-гликолид [11], поликапролактон [12], ПТФЭ [13], полиуретан [14] и др. Следует отметить, что несмотря на теоретические преимущества биоразлагаемых ПС малого диаметра, возможность их практического

использования сильно ограничена требованием надежности. Действительно, разрыв стенки ПС может привести к серьезным местным осложнениям, а синхронное с процессом деградации стенки нарастание ее прочности за счет новообразуемой ткани может зависеть от состояния пациента (возраст, сопутствующие заболевания, регенераторные способности). В связи с этим стабильные в биологических средах полимеры рассматриваются как наиболее перспективные материалы для изготовления ПС малого диаметра. Одним из наиболее перспективных классов полимеров являются полиуретаны (ПУ), обладающие [15] прекрасными механическими свойствами, высокой биосовместимостью, и, в зависимости от строения мягкого и жесткого сегментов [16], различной стабильностью в биологических средах. Термопластичные ПУ, используемые в биомедицинской промышленности (полимеры, таких торговых марок, как Chronoflex™, Tecoflex™, Elastane™ и Pelletane™), отличаются повышенной стабильностью в биологических системах. Несмотря на несколько сообщений о биodeградации таких ПУ *in vivo* [17-19], в других исследованиях не было обнаружено признаков их биodeградации в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [14, 20, 21].

Для изготовления ПС может быть использовано несколько методов, включая разные варианты метода раздела фаз [22], замораживания-высушивания [23], формования (molding) [24], экструзии [25], электроспиннинга (ЭС) [26]. Метод ЭС позволяет получать волокнистые трубчатые конструкции из синтетических или природных полимеров, их смесей и смесей полимеров с низкомолекулярными веществами – лекарствами, антибиотиками и т.д. [27]. Структурно получаемы 3Д матриксы похожи на биологические ткани, а введение в состав волокон белков внеклеточного матрикса, таких как желатин (Жл), коллаген, эластин, фибронектин, которые участвуют в регуляции, клеточной адгезии, пролиферации, позволяет получить биосовместимые синтетические 3Д матриксы. Такие матриксы не только имитируют нативные ткани, но и отличаются от матриксов, изготовленных из чистых синтетических полимеров по механическим свойствам [28-32]. Введение в состав волокон внутреннего слоя ПС прямых антикоагулянтов (например, бивалирудина (Бив)), может

повысить гемосовместимость контактирующей с кровью поверхности ПС [33]. Таким образом, ЭС является перспективным методом изготовления ПС.

Тот факт, что ПС, изготавливаемые этим методом из поликарбонатных полиуретанов и полиуретанмочевины (polyurethaneurea elastomers) компаниями Nicast (Израиль) [34] и Bard (США) [35] уже представлены на рынке, свидетельствует о перспективности таких конструкций. Однако, ПС, выпускаемые фирмой NICAST и Bard рекомендованы только для сосудистого доступа при гемодиализе, что косвенным образом свидетельствует о необходимости улучшения их механических и биологических свойств.

В представленной работе описано изготовление и характеристика ПС малого диаметра из белок-наполненного ПУ, изготовленных методом электроспиннинга. Наряду с этим было выполнено сравнительное исследование функционирования таких ПС малого диаметра и ПС из ПТФЭ, имплантированных в брюшную аорту крыс на срок от 1 до 6 месяцев.

НАУЧНАЯ ГИПОТЕЗА

Изготовление протезов сосудов малого диаметра методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного полиуретана, белка внеклеточного матрикса желатина и прямого антикоагулянта бивалирудина, позволит снизить процессы тромбообразования и гиперплазии неоинтимы, тем самым увеличить проходимость таких протезов в раннем и отдаленном послеоперационном периоде.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать технологию изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга, используя в качестве базового синтетического полимера полиуретан, и исследовать механические и биологические свойства таких протезов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработать технологию изготовления методом электроспиннинга 3Д матриц и протезов сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина.

2. Выполнить исследование физических свойств материалов, изготовленных по предлагаемому протоколу, и сравнить их с физическими свойствами протезов сосудов из ePTFE и нативных артерий.
3. Провести исследования, изготовленных ПС из полиуретана *in vitro*, на цитотоксичность, гемосовместимость, способность поддерживать адгезию и пролиферацию эндотелиоцитов человека.
4. Выполнить интраоперационные сравнительные исследования протезов сосудов из полиуретана и e-PTFE в эксперименте *in vivo*. Оценить проницаемость протезов для крови, устойчивость к «разволоknению» краев, формирование анастомозов с нативной артерией, гемостаз мест проколов, биостаbильность при выполнении операции по протезированию инфраренального отдела брюшной аорты крыс линии Wistar.
5. Оценить и сравнить гемо- и биосовместимость, а также проходимость ПС из полиуретана и ePTFE в ближайший и отдаленный послеоперационный период на сроках наблюдения от 1 до 24 недель.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Предложены новые 3Д матриксы, полученные методом электроспиннинга из смеси полиуретана с желатином, и смеси полиуретана с желатином и бивалирудином (слой, экспонированный на контактирующей с кровью поверхности) для изготовления ПС.

2. Установлено, что физико-химические характеристики 3Д матриксов и ПС, изготовленных по предложенному протоколу, обладают высокой прочностью на разрыв, прочностью на прорыв нитью, хорошей податливостью и эластичностью.

3. Показано, что предложенные материалы хорошо совместимы с кровью и клетками эндотелия сосудов: эндотелиоциты связываются и пролиферируют на поверхности таких матриксов, при этом агрегация тромбоцитов снижена не менее, чем в 4 раза по сравнению с матриксами из чистого полиуретана. Исследуемые матриксы показывают низкий процент

гемолиза – порядка 2,5%.

4. Установлено, что ПС, изготовленные по предложенному протоколу, после их имплантации в позицию брюшной аорты крысы обладают высокой проходимостью на сроках наблюдения до 24 недель.

5. Показано, что протезы из полиуретана сохраняют свою функциональную стабильность в артериальной позиции в течение 24 недель наблюдения, способствуют формированию тонкой внутренней выстилки с эндотелиоцит-подобными клетками.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Результаты настоящего исследования демонстрируют новые возможности использования метода электроспиннинга в качестве одного из наиболее перспективных способов изготовления протезов кровеносных сосудов. Использованный в качестве полимера-основы полиуретан, позволяет максимально приблизить био- и гемосовместимость таких протезов к нативной артерии. Разработанный протокол модификации способа производства таких протезов значительно улучшил их биомеханические свойства, что позволяет рекомендовать такие протезы для проведения дальнейших этапов доклинических и клинических исследований.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 114 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 28 отечественных и 186 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 20 рисунками.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Разработанный протокол изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного полиуретана «Текофлекс», желатина и бивалирудина, позволяет создать протезы сосудов малого диаметра, не уступающие по прочности, но, при этом, более эластичные и податливые, чем протезы сосудов из ПТФЭ.

2. Изготовленные протезы сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина методом электроспиннинга, обладают хорошей способностью поддерживать адгезию, пролиферацию первичных эндотелиоцитов человека и гемосовместимость.

3. Исследуемые протезы сосудов, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси полиуретана, желатина и бивалирудина, обладают физическими свойствами, позволяющими интраоперационно легко формировать анастомоз с нативной артерией, осуществлять быстрый и качественный гемостаз.

4. Исследуемые протезы сосудов, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси полиуретана, желатина и бивалирудина являются более тромборезистентными, не вызывают избыточного образования неофиброзной капсулы, неинтимы и кальцификации, по сравнению с протезами из e-PTFE в эксперименте *in vivo* на сроках наблюдения до 24 недель.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

- Форум с международным участием «Биомедицина 2016» (Новосибирск, 2016).
- 10th European Symposium on Vascular Biomaterials (Страсбург, 2017).
- ISBPPB 2018 - 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials (Краков, 2018).

- XXXIV Международная конференция «Перспективы развития сосудистой хирургии в стране и её регионах (Ярославль, 2018)
- XXXV Международная конференция «Внедрение высоких технологий в сосудистую хирургию и флебологию» (Санкт-Петербург, 2019)
- X Научные чтения, посвященные памяти академика РАМН Е.Н. Мешалкина (Новосибирск, 2019)

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликованы 4 печатных работ в журналах из перечня ВАК.

Печатные работы:

- 1) Gostev, A.A. Polyurethanes in cardiovascular prosthetics / A.A. Gostev, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **Polymer Bulletin**. – 2018. – Т. 75. – №. 9. – С. 4311-4325.
- 2) Mechanical properties and biological behavior of 3D matrices produced by electrospinning from protein-enriched polyurethane / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y. Gao, Y.A. Chesalov, A.V. Shutov, E.A. Pokushalov, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **BioMed research international**. – 2018. – Т. 2018. – С. 1-10.
- 3) Study of hemocompatibility and endothelial cell interaction of tecoflex-based electrospun vascular grafts / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y.A. Chesalov, A.A. Karpenko, A.M. Karaskov, P.P. Laktionov // **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. – 2019. – Т. 68. – №. 1-3. – С. 34-43.
- 4) Electrospun polyurethane-based vascular grafts: physicochemical properties and functioning in vivo / A.A. Gostev, V.S. Chernonosova, I.S. Murashov, D.S. Sergeevichev, A.A. Korobeinikov, A.M. Karaskov, A.A. Karpenko, P.P. Laktionov // **Biomedical Materials**. – 2019. – Т. 15. – №. 1. – С. 015010.

ДОСТОВЕРНОСТЬ ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Достаточное количество экспериментальных наблюдений, дизайн исследования, использование высокоинформативных и современных методик, комплексный подход к научному анализу с применением современных методов статистической обработки и программного компьютерного обеспечения свидетельствуют о высокой достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Выводы, представленные в настоящей работе сформулированы на основе данных, опубликованных в рейтинговых международных рецензируемых изданиях.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автором лично изготовлены все исследуемые протезы и проведены испытания их механических свойств *in vitro*, выполнены все операции по имплантации и забору экспериментальных протезов, а также контроль над состоянием животных на протяжении всего срока наблюдения. Автор принимал участие в исследовании протезов на цитотоксичность и гемосовместимость, функциональной оценке протезов с помощью ультразвукового доплеровского сканирования *in vivo*, исследовании послеоперационной морфологической и гистологической картины полученных результатов, анализе и интерпретации полученных результатов. Статистическая обработка данных произведена с применением пакетов программ “Statistica 10” и Excel 2010.

Автор выражает глубокую признательность за организационную помощь, постоянное внимание и ценные советы в выполнении этого исследования своим научным руководителям: доктору медицинских наук, профессору А.А. Карпенко и кандидату биологических наук П.П. Лактионову, а также искренне благодарит за участие В. С. Черноносову, Д.С. Сергеевича, Е. Л. Завьялова, М. П. Мошкина, Е. М. Силкис.

ГЛАВА 1 ПРОТЕЗЫ СОСУДОВ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОЛИУРЕТАНЫ В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Актуальность проблемы

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из главных причин смертности. В последнее время постоянно происходит увеличение числа процедур реваскуляризации пораженных артерий [1, 36].

Лечение сердечно-сосудистых заболеваний можно осуществлять, как с помощью модификации образа жизни и диеты, так и благодаря фармацевтическому и хирургическому вмешательству [37]. При необходимости сосудистая хирургия может включать эндоваскулярные процедуры, такие как ангиопластика, имплантация стента или атерэктомия, выполняемые для дилатации стенозированного сосуда или реканализации окклюзированного сегмента. Так же для замены или обхода стенозированного или окклюзированного сосудов могут быть использованы протезы сосудов (ПС). Несмотря на успехи в эндоваскулярной хирургии и ее повышенную популярность в последние десятилетия, артериальное шунтирование остается распространенной процедурой и считается оптимальным выбором для пациентов, нуждающихся в долгосрочных сроках реваскуляризации (предполагаемая продолжительность жизни более 2 лет) [38-41]. В России общее число периферических артериальных реконструкций по отчетам за 2018 год составило 74145 операций [42].

В настоящее время предпочтительными материалами для сосудистой трансплантации являются аутологичные артерии или вены [4, 43, 44]. При этом большая подкожная вена является наиболее часто используемым сосудистым аутооттрансплантатом [45]. Несмотря на то, что аутовенозное шунтирование является золотым стандартом, показатели проходимости при трансплантации большой подкожной вены в артериальную позицию по-прежнему не являются идеальными, как при АКШ, так и при бедренно-подколенном шунтировании. Стандартная методика аутовенозного бедренно-

бедренного или бедренно-подколенного шунтирования показала свою пятилетнюю эффективность у 66-73.7% больных [46]. Однако эти результаты значительно ухудшаются при бедренно-подколенном шунтировании ниже щели коленного сустава, или бедренно-берцовой реваскуляризации. В данной позиции пятилетняя проходимость шунтов имеет место только у 33-50% пациентов [47]. После АКШ процент первичной десятилетней проходимости так же далек от идеального и приближается к 50% [48]. Весьма проблематичными для хирургии являются и пациенты, у которых собственная вена была ранее использована для аортокоронарного шунтирования, либо имеет незначительный диаметр и обширные боковые ветви.

Синтетические ПС также доступны в качестве альтернативы аутологичным сосудам. Они продемонстрировали удовлетворительные долгосрочные результаты при использовании в артериях большого диаметра (> 8 мм), например, в аорто-подвздошной позиции, где пятилетняя проходимость составляет около 90% [49], и в артериях среднего диаметра (6-8 мм), таких как сонная или общая бедренная артерии [50]. Однако в сосудах малого диаметра (< 6 мм) синтетические ПС имеют ограниченное применение из-за плохой проходимости [51]. Использование ПС из вспененного политетрафторэтилена (ПТФЭ) при АКШ приводило к 1-летнему уровню проходимости $\sim 60\%$ по сравнению с более чем 95% при использовании большой подкожной вены. Через 2 года проходимость протезов из ПТФЭ снизилась до 32%, в то время как аутовенозные трансплантаты оставались проходимы более чем в 90% случаев [52-55]. Показатели пятилетней проходимости ПС из ПТФЭ при проксимальном бедренно-подколенном шунтировании составили $\sim 59\%$, а при использовании аутовены в той же позиции $\sim 78\%$ [56, 57]. Таким образом, синтетический ПС можно предложить только в качестве выбора, если не имеется другого подходящего аутологичного сосуда [55].

Окклюзия ПС чаще всего связана с тромбозом, гиперплазией интимы, атеросклерозом или инфекцией. Тромбоз возникает в результате повреждения или отсутствия эндотелиальных клеток, выстилающих просвет имплантата, что приводит к адсорбции белков крови и активации механизмов свертывания [58-

60]. Гиперплазия интимы вызвана миграцией сосудистых гладкомышечных клеток из меди сосуда в интиму, их пролиферацией и синтезом компонентов внеклеточного матрикса. Гиперплазия интимы чаще возникает в зоне анастомоза между ПС и нативным сосудом.

Существует несколько основных причин, приводящих к нарушению кровотока в ПС [61-67]:

- 1) несоответствие податливости между имплантом и нативным сосудом;
- 2) несоответствие диаметра сосуда;
- 3) повреждение или отсутствие эндотелиальных клеток;
- 4) стрессовое воздействие в области сосудистого шва;
- 5) травма во время операции;
- 6) гемодинамические факторы, вызывающие нарушения кровотока.

Так же, одной из причин окклюзии ПС в отдаленном периоде является атеросклероз [68]. Образование атеромы связано с теми же факторами, что и в нативных артериях, и происходит аналогичным образом. Считается, что моноциты вторгаются в неоинтиму ПС, образуя макрофаги индуцируя воспаление, которое в конечном счете приводит к развитию атеросклеротической бляшки [45, 69-71]. Инфекция ПС чаще встречается в синтетических ПС из-за их пористой структуры, легко колонизируемой бактериями. Инфекции вызывают хроническое воспаление и высвобождают токсины, которые усложняют заживление трансплантата и могут привести к сепсису и аневризме зоны анастомоза, или даже к отрыву трансплантата [72-76].

1.2 Виды протезов сосудов, их достоинства и недостатки

История протезирования сосудов начинается с 1882 г., когда Th. Gliick для соединения концов артерии впервые применил металлические и костяные трубочки [77]. Огромный вклад в развитие сосудистой хирургии внес знаменитый французский хирург Алексис Каррель, который разработал новый метод сосудистого шва, суть которого заключалась в использовании знаменитых «ситуационных нитей» - швов-держалок. Новый метод циркулярного сосудистого шва довольно быстро завоевал признание

хирургов, его начали применять в эксперименте, а затем и в клинике. Вскоре появились многочисленные модификации этого метода. Так, одной из первых его удачно усовершенствовала А.И. Морозова (1909), предложив использовать не три, а только две «ситуационные нити» [78].

Важной вехой, знаменующей начало современного периода в развитии сосудистой хирургии, является сообщение американских исследователей А. В. Voorhees и соавт. (1952) о применении для пластики сосудов пористых трубок текстильного производства, изготовленных из синтетического материала [79]. После работ А. В. Voorhees и соавт. за рубежом, главным образом в США, появилось много исследований и было предложено много различных вариантов ПС из самых разных материалов. В связи с обилием конструкций протезов кровеносных сосудов при американском обществе сосудистых хирургов был создан Комитет по протезам сосудов (1955), в состав которого вошли видные представители сердечно-сосудистой хирургии США: О. Creech, R. A. Deterling, W. S. Edwards, О. С. Julian, R. R. Linton, Н. Shumacker. Комитетом были получены сведения от 27 американских хирургов, применявших в эксперименте и клинике протезы кровеносных сосудов. Было установлено, что к 1957 г. в США разрабатывались 17 типов ПС, из которых только два типа были сделаны из непористых материалов, а остальные — из пористых. В те годы как правило протезы кровеносных сосудов изготавливались самими хирургами и лишь в трех случаях протезы вырабатывались фабричным способом. Для производства ПС использовали 8 материалов: винион-N, орлон, дакрон, тефлон, ивалон, фортизон и нержавеющая сталь. Кроме последнего материала, все они представляли собой синтетические полимеры с различными свойствами, причем наиболее характерными для них являлись высокая химическая и физическая инертность, малая их реактогенность, отсутствие канцерогенных свойств и некоторые другие [80].

По данным О. Creech и соавт. к 1957 г. в США применялись пористые протезы кровеносных сосудов четырех различных конструкций: тканые (Н. В. Schumacker R. A. Deterling), плетеные (А. Н. Blakemore, W. S. Edwards), вязанные (Sanger) и из пористой губки- ивалона (N. E. Shumway) на основе

поливинилового спирта. В отдельных случаях в эксперименте были попытки использовать сосудистые сетчатые протезы из нержавеющей стали (De Takats, Blades). Наиболее часто в этот период использовали плетеные нейлоновые протезы Эдвардса — Тэппа. В экспериментальной и клинической практике американских хирургов некоторое время использовались также сосудистые протезы из орлона. Описаны случаи успешного применения в эксперименте и в клинической практике нейлоновых протезов тканой конструкции, нейлоновых плетеных протезов, покрытых для уменьшения проницаемости виниловым пластиком, и нейлоновых протезов с повышенной гибкостью, достигаемой с помощью специальной текстильной техники [81].

Поиски более подходящего для ПС синтетического материала заставили исследователей остановиться на полиэфирных (дакрон, терилен), а затем на политетрафторэтиленовых (тефлон) волокнах. ПС из дакрона были впервые созданы в США О. С. Julian и соавт. Это были тканые бесшовные трубки с разветвлениями (бифуркациями), изготовленные из фабричного дакронового материала типа тафты [82]. Такой ПС не гофрировался, но для того, чтобы его можно было применять в виде шунта, имел изогнутые концы. Особенно широкое распространение дакроновые протезы артерий получили после их изготовления в виде вязаных трубочек и бифуркаций. Это было сделано в текстильном институте г. Филадельфии (США, 1957) Де Бэки (М. Е. De Bakey) в сотрудничестве с инженером Эдманом. Вязаные протезы обладали рядом существенных преимуществ, что позволило у многих больных получить хорошие непосредственные и отдаленные результаты. Дакроновые вязаные протезы Де Бэки — Эдмана были гофрированными, гибкими, эластичными, имели пористость, обеспечивающую достаточное и быстрое прорастание стенок соединительной тканью. Они были изготовлены из биологически инертного синтетического волокна, обладающего высокой прочностью и практически не меняющего свойств при длительном пребывании в тканях живого организма [83].

Однако, как уже было сказано, ПС из Дакрона и Тефлона

продемонстрировали удовлетворительные долгосрочные результаты при использовании в артериях большого и среднего диаметра (> 6 мм), а в сосудах малого диаметра (< 6 мм) показали неудовлетворительную проходимость. В связи с этим, продолжились поиски ПС, которые были лишены этих недостатков. Ткане-инженерный ПС представляет собой привлекательное потенциальное решение для будущего сосудистой хирургии.

Еще в 1950 г. Cumberland и Scales сформулировали 8 критериев идеального материала для изготовления протезов сосудов [84]:

1. Не должен физически размягчаться тканевыми жидкостями
2. Должен быть химически инертным
3. Не должен вызывать воспаления или отторжения
4. Не должен обладать канцерогенными свойствами
5. Не должен вызывать аллергию или сенсибилизацию
6. Должен обладать механической прочностью
7. Должен быть пригоден для фабричного изготовления
8. Должен быть пригоден для стерилизации

Чтобы быть пригодным для имплантации, ПС тоже должен удовлетворять ряду механических требований [10, 85, 86]. По сути, ПС является каналом для поддержания потока крови, поэтому он должен выдерживать давление, оказываемое этим потоком, без разрыва или формирования аневризм. Не должно наблюдаться изменения давления, по длине ПС, внутренняя поверхность не должна запускать механизмы образования тромбов. Трансплантат должен обладать подходящей эластичностью, чтобы предотвратить образование линий напряжения вокруг анастомоза и иметь геометрию, которая не вызывает изменения характеристик потока крови, поскольку оба этих фактора приводят к его окклюзии [87-89]. ПС также должен быть нецитотоксичным и не должен вызывать иммунные реакции, такие как инициирование каскада комплемента и хроническое воспаление. Кроме того, с точки зрения клинического применения продукта, ПС должен обладать хорошими манипуляционными свойствами, т.е. быть удобен при имплантации; а также

достаточно дешев, т.е. мог бы производиться промышленно в необходимом диапазоне наменклатур, т.е. длин и диаметров.

Первый тканеинженерный ПС был фактически произведен в середине 1980-х годов Вайнбергом и Беллом [90]. На коллагеновой матрице были культивированы бычьи эндотелиальные клетки, фибробласты и гладкомышечные клетки, а затем эти матрицы свернуты в трубчатые структуры. Хотя при этом и была достигнута тканевая архитектура аналогичная естественным кровеносным сосудам, однако конструкция требовала укрепления Дакроном. При этом, механические свойства этих ПС оставались неудовлетворительными.

С тех пор был сформирован ряд различных подходов к созданию клинически жизнеспособных ПС. Все они широко варьируются в отношении материалов, методов производства, источника клеток и протокола культивирования. Их можно классифицировать на основании различных методов производства, а также материалов.

1.3 Методы производства тканеинженерных протезов сосудов

В физиологических условиях пульсирующего кровотока тонкостенные ПС могут подвергаться растяжению или образованию аневризмы [91]. Увеличение толщины стенки графта предотвращает эти процессы, но может приводить к снижению гибкости и эластичности. Этого можно избежать, если увеличить пористость изготавливаемых ПС и использовать новые подходы и материалы для их изготовления. Были предложены различные методы изготовления полимерных матриц и ПС, такие как выщелачивание [92], инверсия фаз [93, 94], самосборка молекул полимеров на матрице [95], газовое вспенивание [96-98], полимеризация гидрогелей [99], погружение и экструзия [100], электроспрей [101], электроспиннинг [102].

В промышленном производстве на данный момент чаще всего используются методы фазовой сепарации, спекания гранул и растягивания. Фазовая сепарация может основываться на удалении растворителя (evaporation induced phase inversion (EIPS)), разделе фаз в растворе (diffusion

induced phase inversion (DIPS)) [103] и термоиндуцированном разделе фаз (temperature induced phase inversion (TIPS)) [104-108]. Принцип метода спекания заключается в формовании из сыпучего материала необходимой формы изделия, с последующим спеканием частиц. Пористость мембран обусловлена зазорами между соединенными частицами, а размер пор - размерами частиц. Растягивание полимерной композиции используется преимущественно для получения протезов из ПТФЭ.

Наиболее перспективным методом изготовления протезов сосудов из нановолокон является электроспиннинг (рис. 1). Процесс основан на использовании электростатического поля, в которое вводят раствор полимера [109]. Когда кулоновская сила превышает силу поверхностного натяжения, из капли начинает формироваться полимерная нить, которая вытягивается и истончается в процессе вытягивания между электродами. Полимер затвердевает из-за испарения растворителя и нановолокно осаждается на электроде-коллекторе.

Благодаря простоте этого метода, ЭС широко используется различными исследовательскими группами. Для ЭС можно использовать широкий набор полимерных материалов - биodeградируемых и недеградируемых, синтетических и природных [110-112]. Этот метод позволяет контролировать толщину, состав и пористость нановолоконных скаффолдов, относительно просто модифицируя дизайн эксперимента. Диаметр волокон может варьировать от нескольких микрометров до ~ 20 нм [113]. Размеры пор, получаемого матрикса, также могут варьировать от нескольких до десятков микрон. Пористость способствует эффективной клеточной инфильтрации, обеспечивает диффузию питательных веществ и метаболитов, как в клетки, так и из них [114, 115]. Смеси различных материалов могут использоваться для улучшения, как механических, так и биологических свойств матриксов [116].

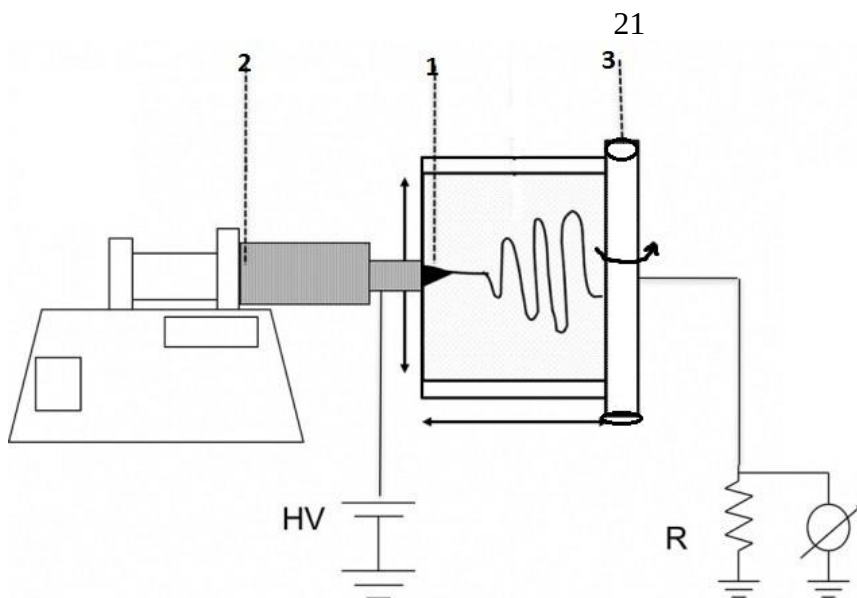


Рисунок 1. Схема электроспиннинга

1.4 Применение полиуретанов в сердечно-сосудистой хирургии

Полиуретаны представляют собой класс полимеров с широким набором свойств, который делает их перспективными материалами для медицинского использования. Они используются как для изготовления элементов медицинского инструмента [117], так и для имплантируемых изделий [118], отличаются хорошей прочностью, эластичностью, био и гемосовместимостью [119] и, в зависимости от строения мягкого и жесткого сегментов, могут иметь разную скорость биodeградации [120, 121]. Известно, что биodeградация полиуретанов происходит в результате гидролиза сложноэфирных и полиуретановых групп, или окисления алифатических фрагментов, содержащих простые эфирные связи [16]. В целом стабильность термопластичных ПУ в биологических системах и механизмы их деградации хорошо исследованы, однако эти исследования выполнены преимущественно для пленок, листов или непористых монолитных изделий, полученных преимущественно литьем под давлением (cast- molding) [122]. Лишь в нескольких работах исследована стабильность ПУ в составе пористых изделий [20, 123], а именно такие материалы рассматриваются в настоящее время в качестве перспективных материалов для тканевой инженерии тканей и органов [9, 15, 124].

Биостабильность и биосовместимость полимера имеет важное значение для медицинских имплантатов, предназначенных для долгосрочного использования, таких как ПС и искусственные клапаны сердца. Предыдущие исследования показали, что полиэфирные ПУ не подходят для этих целей из-за их плохой гидролитической стабильности [125]. Эта проблема была в значительной степени устранена при использовании полиэфирных макродиолов, таких как политетраметиленоксид (ПТМО), который является наиболее используемым макродиолом в обычных медицинских изделиях.

Однако полиуретаны, основанные на ПТМО, оказались в большой степени подвержены окислительной деградации [126]. Хотя точные механизмы полностью не поняты, считается, что "растрескивание" изделий из таких полиуретанов вызвано именно окислительной деградацией [127]. Szycher в своем исследовании показал, что мягкие ПУ более склонны к окислительной деградации [16]. Другие исследователи показали, что ПУ на основе ароматических дисукцинатов оказались более биостабильными, чем алифатические ПУ, которые были подвержены окислительной деградации и растрескиванию [121, 128]. Повышенная стабильность ПУ, основанных на ароматических дисукцинатах, объясняется их способностью образовывать жесткий сегмент в кристаллической решетке, в результате молекулярной симметрии и сильного межмолекулярного притяжения через р-электронное взаимодействие [129].

1.4.1 Термопластичные полиэфирные полиуретаны

Термопластичные ПУ, появившиеся на мировом рынке в начале 60 годов прошлого века, уже успели завоевать прочное признание. В качественном отношении термопластичные ПУ являются уникальным материалом, объединяющим лучшие свойства каучука и пластмасс. Причем характеристиками можно управлять в процессе изготовления изделий из термопластичных ПУ [130].

Термопластичные ПУ обладают целым множеством отличных характеристик:

- эластичность и устойчивость к изгибу;

- износостойкость;
- малые радиусы перегиба у трубчатых конструкций;
- устойчивость к воздействию микробов и гидролизу;
- высокая прочность на разрыв;
- устойчивость к старению.

Основными представителями термопластичных ПУ, используемых в биомедицинской промышленности, являются полимеры таких торговых марок, как Chronoflex™, Tecoflex™, Pelletane™ и др.

Ряд исследований показывает возможность биodeградации таких ПУ *in vivo* [17-19]. Однако группа исследователей из Австрии, подробно занимающихся изучением термопластичных ПУ ПС, изготовленных методом электроспиннинга не нашли никаких признаков их биodeградации в своих экспериментах *in vitro* и *in vivo* [14, 20, 21]. Данные исследования опишем подробнее. В 2009 году Grasl и соавторы [20] из Венского Медицинского Университета опубликовали исследование *in vitro* механических и биологических свойств ПС малого диаметра, изготовленных методом электроспиннинга из термопластичного ПУ Pelletane™. ПС изготавливались из 5% раствора Pelletane™ (вес/вес). Растворителем являлся 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол. Результаты исследования показали, что ПС обладают хорошими механическими свойствами, отсутствием цитотоксичности, хорошей совместимостью с эндотелиальными клетками, т.е. качествами, необходимыми для успешного протезирования мелких сосудов. В 2012 году Bergmeister и соавторы [14] опубликовали *in vivo* исследование ПС, изготовленных методом электроспиннинга из ПУ Pellethane™ на 40 крысах. ПС с внутренним диаметром 1,5 мм и длиной 15 мм имплантировали в инфраренальный сегмент брюшной аорты крыс по типу конец-в-конец. Период наблюдения составил 1, 4, 12 и 24 недели. Результаты этого исследования показали хорошую биосовместимость и биостабильность ПС. Процент проходимости составил 95%. Микропористая структура матрикса способствовала миграции эндотелиальных клеток в стенки ПС малого диаметра. Графты показали способность поддерживать адгезию, и пролиферацию эндотелиальных клеток.

В 2013 году та же группа ученых [21] опубликовала результаты исследования ПС из Pellethane™ *in vivo* с различной пористостью на 84 крысах. Низкопористые ПС (коэффициент пористости 53%) и высокопористые ПС (коэффициент пористости 80%) так же имплантировали в инфраренальную аорту крыс. Период наблюдения составил 1, 4, 12 и 24 недели. Анализ биомеханических свойств ПС показал, что увеличение диаметра волокна и пористости не приводит к значимому снижению прочности на растяжение или силы на порыв ниткой. Оба вида ПС показали пределы прочности на разрыв более 10,0 МПа до и после 6 месяцев эксплуатации, что значительно выше, чем у нативных сосудов, у которых средняя сила на разрыв составляет 1-2 МПа. До имплантации высокопористые ПС обладали более высокой эластичностью, чем низкопористые аналоги ($P < 0,01$). На стадии *in vivo* оба вида ПС не показали никаких различий при имплантации и показали достаточно хорошую прочность на порыв ниткой. Сразу же после реперфузии стенки высокопористых графтов пропитывались кровью, а низкопористых - оставались белыми. Тем не менее, не было никакой утечки крови через высокопористые протезы. Оба вида ПС показали одинаковую степень проходимости - 100%. Гистологические исследования показали лучшую эндотелизацию и клеточную пролиферацию у высокопористых графтов, чем у низкопористых.

Таким образом, ПС, изготовленные из термопластичного ПУ Pellethane™ - показали отличные механические свойства и биосовместимость, при этом показали высокую резистентность к биodeградации. Эти результаты так же подтверждаются и рядом других долгосрочных исследований *in vivo*, в которых период наблюдения доходил до 580 дней [131, 132].

1.4.2 Полиуретаны с силоксановым сегментом

Другим подходом для улучшения устойчивости к окислению и увеличению биостабильности мягкого сегмента в простых ПУ, явилась замена некоторых или всех полиэфиров на более устойчивый к

окислительной деградации силоксановый сегмент. Встраивание силоксановой группы в жесткий сегмент приводило к комбинации хорошей биостабильности силоксановых полимеров и прекрасных механических свойств ПУ. Так появилась абсолютно новая генерация материалов, таких как Elast-EonTM, которые, как представляется, в значительной степени преодолели проблему биodeградации [122], обладая в то же время отличными механическими свойствами: сердечные клапаны, изготовленные из Elast-EonTM, проходят 500 миллионов циклов [133]. Также эти исследования показали, что мягкий, гибкий ПУ, синтезированный с использованием силоксанового сегмента, имеет отличную долгосрочную биостабильность по сравнению с полиэфирными ПУ, такими как Pellethane 80ATM и BionateTM. Однако в своем исследовании Hunt и соавторы [134] приходят к выводу, что биостабильность искусственных сердечных клапанов из Elast-EonTM - может быть повышена только за счет увеличения биосовместимости материала. В последние 10-15 лет был достигнут значимый прогресс в улучшении биоустойчивости материалов из ПУ, однако до сих пор идет поиск их разновидностей, обладающих необходимой гемосовместимостью, устойчивостью к кальцификации и долговечностью. Недавно проведенные исследования показали, что недостатками полимерных клапанов сердца, в том числе и из Elast-EonTM, - являются их склонность к тромбообразованию и минерализации. Долгосрочные результаты экспериментов *in vivo* говорят о том, что кальцификация - может ограничить длительное функционирование таких полимерных клапанов [135, 136].

1.4.3 Поликарбонатные полиуретаны

Еще одним подходом для увеличения устойчивости к окислению ПУ является замена их восприимчивых к деградации полиэфирных звеньев на поликарбонатные [137]. Ряд проведенных ранее исследований ПС из поликарбонатных ПУ показал их хорошие механические свойства, такие как гибкость и соответствие податливости между ПС и артерией. Так же эти ПС обладали хорошей биосовместимостью, так как на их поверхности были

слабо выраженные процессы гиперплазии неоинтимы и тромбообразования [138, 139]. Christenson E. M. и соавторы изучали механизмы окислительной биodeградации поликарбонатных и полиэфирных ПУ в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [17]. Авторы показали, что деградация матриксов, полученных методом электроспиннинга, замедлялась при добавлении антиоксидантов. Это подтверждает гипотезу об окислительных механизмах биodeградации. Степень биodeградации поликарбонатных ПУ ограничивалась более тонким поверхностным слоем и была значительно меньше, чем у полиэфирных ПУ. Однако при исследовании отдаленных результатов его биостабильность оказалась недостаточной для дальнейшего клинического применения [140-142].

1.4.4 Нанокompозитные полимеры

Недавно центр нанотехнологий и сердечно-сосудистой инженерии Лондонского Университета разработал и запатентовал новейший нанокompозитный ПУ полимер с поликарбонатным звеном и олигомерным силсесквиоксаном (ПОСС) [143, 144]. Этот материал показал отличную биосовместимость и биостабильность [145, 146]. Было доказано, что группа ПОСС защищает мягкий сегмент ПУ от окисления и гидролиза, в то же время последний отвечает за гибкость и эластичность [62]. Более того полимер не является токсичным и обладает лучшей тромборезистентностью, по сравнению с ПТФЭ. Полимер показал высокую резистентность к ферментативной деградации в исследованиях *in vitro*. В исследованиях *in vivo*, при оценке биосовместимости и биостабильности нанокompозитного полимера, было обнаружено, что он индуцирует минимальный воспалительный ответ тканей на имплантацию и минимальную инкапсуляцию. В течение 36 месяцев после имплантации овцам в мягкие ткани [144] не было обнаружено признаков биodeградации полимера. Более того все тот же центр нанотехнологий Лондонского Университета разработал ПС для АКШ, который выиграл Medical Futures Innovation Award в 2007 году. В исследованиях *in vivo* ПС показал хорошие свойства поверхности, высокую биосовместимость и биостабильность. Уже сейчас

проводятся клинические исследования этих ПС [147].

В 2009 году Kiddane и соавторы [148] опубликовали исследование, в котором изучали механические и поверхностные свойства искусственных клапанов сердца, сделанных из ПУ с добавлением ПОСС. Авторы приходят к выводу, что ПОСС обладает отличной механической прочностью, хорошими поверхностными свойствами и низкими показателями адгезии тромбоцитов. Материал показал такую же твердость и прочность на разрыв, как EstaneTM, ChronoflexTM и Elast EonTM, сравнимое удлинение с Elast EonTM, но при этом, более высокую прочность на растяжение, чем выше перечисленные полимеры. Таким образом, авторы приходят к выводу, что механические характеристики этого полимера делают его идеальным кандидатом для использования в производстве синтетических клапанов сердца.

В 2009 году Sarkar и соавторы [147] из Лондонского Университета провели исследование ПС внутренним диаметром 5 мм из ПОСС, приготовленных методом электроспря с фазовой инверсией на растяжимость, разрыв, а также податливость в условиях пульсирующего потока.

Протезы с толщиной стенки 250-270 мкм оказались более эластичными при низком уровне стресса, чем ПС из ПТФЭ или нанокompозитные литые листы. Так же они показали низкую растяжимость и истончение в условиях пульсирующего потока, что позволило включить эти ПС в клиническое исследование в качестве кондуита для гемодиализа.

В 2014 году Ahmed и соавторы [149] из Лондонского Университета опубликовали результаты исследования, в котором ПОСС протезы с внутренним диаметром 5 мм, приготовленные методом электроспря с фазовой инверсией имплантировали в сонную артерию 12 овец. Период наблюдения составил 9 месяцев. Процент проходимости ПС составил 64%, в них не было обнаружено гиперплазии неоинтимы, кальцификации и аневризм анастомозов. ПС показали функциональные качества, сопоставимые с нативными артериями.

В 2009 году Raghunath и соавторы [150, 151] из Лондонского Университета впервые сравнили ПС, приготовленные методом электроспря

и электроспиннинга из нанокompозитного полимера UCL-NanoBio™, запатентованного ими ранее, на цито- и гемосовместимость и цитотоксичность к стволовым клеткам человека. Новый полимер состоит из смеси ПОСС (20%) и капролактона (80%) и является частично биodeградируемым.

Исследование показало, что нанокompозит способствует адгезии, росту и пролиферации стволовых клеток человека. Жизнеспособность клеток на поверхности скэффолдов, изготовленных электроспиннингом, не отличалась от культивируемых на поверхности скаффолдов, изготовленных методом электроспрея, однако клетки более эффективно заполняли (инфильтрировали в) матриксы, изготовленные методом электроспиннинга.

1.5 Способы улучшения биосовместимости и биостабильности полиуретановых тканеинженерных сосудистых протезов

Для ПУ одним из основных способов улучшения биосовместимости материала является введение удлинителей цепей, таких как производные поликапролактона, алифатические диисоцианаты или биополимеры. Это также необходимо для улучшения биостабильности полиуретановых матриксов, полученных методом электроспиннинга после имплантации [119]. Для повышения стабильности материала также используют сшивку полиуретанов сшивающими агентами, такими как глутаровый альдегид [152], введение эластина [153], и N, N'-метиленисакриламида [154]. Биосовместимость и биостабильность матриксов могут быть увеличены путем смешивания или ко-электроспиннинга ПУ с натуральными белками, такими как коллаген [155], желатин [156], бычий сывороточный альбумин или фибриноген [155]. Увеличение гидрофильности поверхности матриксов также приводит к увеличению адгезии и пролиферации клеток. Для этого также может быть использован электроспиннинг смесей полимеров или ко-электроспиннинг полиуретанов с другими полимерами, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ) [157].

1.6 Резюме

Анализ литературных данных показал, что существует проблема долгосрочной проходимости имеющихся на данный момент на рынке ПС малого диаметра, функционирующих в артериальной позиции. Одним из перспективных направлений создания протезов малого диаметра является электроспиннинг. Этот метод позволяет синтезировать волокнистые структуры из растворов различных полимеров, которые впоследствии будут являться матрицами для заселения клетками собственного организма, и формирования новых тканей. Электроспиннинг позволяет контролировать толщину, состав и пористость нановолоконных матриксов, создавать многослойные ПС, максимально приближенные к нативным сосудам по своим физическим и биологическим свойствам. В качестве полимера-основы могут использоваться, как биodeградируемые вещества, так и стабильные. Плюсом биodeградируемых полимеров является постепенное полное замещение собственными тканями организма, однако нет долгосрочных наблюдений, позволяющих оценить механическую прочность таких сосудов в отдаленном периоде и устойчивость к формированию аневризм и стенозов. Биологически стабильные полимеры позволяют гарантированно сохранять структуру ПС длительное время, но их стенозирование остается нерешенной проблемой. Для повышения гемо- и биосовместимости могут быть использованы новые полимеры и их композиции с биополимерами. Несмотря на большое количество исследования, проводимых в этой области, данные разных работ трудно сопоставить и получить полное понимание преимуществ или недостатков того или иного типа экспериментальных ПС.

Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая структура эксперимента

Для достижения цели и решения поставленных задач был намечен дизайн экспериментального исследования (см. рис. 2).



Контрольные точки наблюдения: 1 неделя (n=6), 12 неделя (n=6), 24 неделя (n=6).

Рисунок 2. Дизайн экспериментального исследования

Протокол изготовления ПС, процесс ЭС, обзорную микроскопию, исследование физико-механических параметров ПС осуществляли на базе ФГБУ науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук под руководством кандидата биологических наук Лактионова П.П.

Оперативное вмешательство, содержание животных, ультразвуковую доплерографию выполняли на базе ФГБУ "НМИЦ им.ак. Е.Н.Мешалкина» Минздрава России в лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии под руководством доктора медицинских наук,

профессора Карпенко А.А. и кандидата биологических наук Сергеевича Д.С, а также на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010).

Гистологическое исследование, окраску, иммуногистохимический анализ препаратов протезов выполняли на базе отделения патоморфологии ФГБУ "НМИЦ им. ак. Е. Н. Мешалкина" Минздрава России под руководством д.м.н., Кливер Е. Э. совместно с Мурашовым И. С.

2.2 Разработка протокола изготовления протезов

2.2.1 Реактивы:

- полиуретан Tecoflex EG-80A (Lubrizol Advanced Materials, США)
- желатин (Sigma-Aldrich, США)
- бивалирудин (Sigma-Aldrich, США)
- 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП), (P&M-Invest, Россия)
- фосфатный буфер (Sigma, США)
- среда IMDM (Sigma, США)
- эмбриональная телячья сыворотка (ICN, США)
- трипсин (Sigma, США)
- коллагеназа IV типа (Sigma-Aldrich, США)
- Alamar Blue реагент (Thermo Fisher Scientific, США)
- Cell Tracker Orange CMRA (Thermo Fisher Scientific, США)
- SYBR Green I (Sigma-Aldrich, США)
- глутаровый альдегид (Sigma-Aldrich, США)
- краска гематоксилин-эозин (Biovitrum, Санкт-Петербург)
- первичные моно- и поликлональные антитела (ThermoScientific, США)
к collagen-4 (клон PHM-12+CIV22), α -SMA (клон 1A4/asm-1), Factor VIII (кроличье, поликлональное) меченые пероксидазой хрена
- Протез кровеносного сосуда из ПТФЭ (Экофлон, Санкт-Петербург)

2.2.2 Оборудование:

- Аппарат для электроспиннинга (MECC electrospinning setup NF-103, Япония)
- Разрывная машина Z100 (Zwick/Roell, Германия)
- Весы (Ohaus Corp. Pine Brook, NJ США)
- Шейкер (Heidolph TITRAMAX 1000, США)
- Прибор для определения краевого угла смачивания Drop Shape Analyzer – DSA25 (Kruss GmbH, Германия)
- Планшетный спектрофотометр Multiscan FS (Thermo Scientific, США)
- Микрометр электронный MICROMASTER (TESA, Швейцария)
- Микроскоп JSM-6460 (LV, Япония)
- Стереомикроскоп Discovery V12 (Zeiss, Германия)
- Операционный микроскоп Opmi Pico (Zeiss, Германия)
- Электронный микроскоп JSM-6460 LV (Jeol, Япония)
- Центрифуга Pico (Thermo, Германия)
- микроскоп Axiovert 200 M (Zeiss, Германия)
- криомикротом «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия)
- диагностическая ультразвуковая система DC7 (Mindray, КНР)
- иммуностейнер LabVision Autostainer 720 (Thermo Scientific, США)
- система UltraVision Quanto HRP DAB Protocol

2.3 Методы:

2.3.1 Изготовление растворов для электроспиннинга из полиуретана

Растворы для электроспиннинга готовили путем смешивания стоковых растворов полиуретана Tecoflex EG-80A™ (Тек) (7%), желатина (Жл) (5%) и бивалирудина (Бив) (1%) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (ГФИП), как показано в таблице 1.

Таблица 1. Состав растворов для электроспиннинга

№ смеси	Концентрация компонентов	Объем 7% р-ра Тек, мл	Объем 5% р-ра Жл, мл	Объем 1% р-ра Бив, мл	Объем ГФИП, мл
1	3% Тек (вес:объем)	2,57	0,00	0,00	3,43
2	3% Тек (вес:объем) + 15% Жл (вес:вес)	2,57	0,77	0,00	2,66
3	3% Тек (вес:объем) + 1,5% Бив (вес:вес)	2,57	0,00	0,27	3,16
4	3% Тек (вес:объем) + 15% Жл (вес:вес) + 1,5% Бив (вес:вес)	2,57	0,77	0,27	2,39

2.3.2 Получение матриксов и протезов сосудов методом электроспиннинга

Трехмерные матриксы готовили с помощью устройства для электроспиннинга NF-103 (МЕСС, Япония), используя цилиндрические стальные коллекторы диаметром 40 мм и длиной 55 мм для матриц и диаметром 2,7 мм и длиной 190 мм для ПС. Параметры электроспиннинга для 3Д-матриксов были следующими: скорость подачи, 1–1,15 мл / ч; капиллярно-коллекторное расстояние 19–20 см; напряжение 18,5–24 кВ; Скорость вращения коллектора, 300 об / мин. ПС без антикоагулянта с толщиной стенки 120–130 мм готовили при следующих параметрах: скорость подачи 1–2 мл/ч; напряжение 18,5–25 кВ, частота вращения коллектора 300

об/мин; расстояние между барабанным коллектором и фильерой, 19 см. ПС с антикоагулянтами состояли из внутреннего и наружного слоев толщиной 25–30 мм и 100–105 мм соответственно, которые последовательно наносились на цилиндрический коллектор. После изготовления 3Д матриксов, их высушивали в вакууме для удаления остаточного растворителя и хранили в герметичных контейнерах с молнией.

2.3.3 Обработка матриксов и протезов сосудов глутаровым альдегидом

ПС и трехмерные матриксы обрабатывали глутаральдегидом (ГА) для сшивания белка в волокне. ПС или трехмерный матрикс помещали в 10 мл 50 мМ NaHCO_3 (pH 9,0) в чашку Петри. После инкубации смеси в течение 20 минут буфер удаляли, ПС или матрикс инкубировали в 2% ГА (10 мл) в течение 2 часов и дважды промывали 10 мл 50 мМ NaHCO_3 (pH 9,0) в течение 3 минут. Затем трехмерные матриксы инкубировали с 10 мМ глицина, pH 9,0 (8 мл) в буфере NaHCO_3 в течение 30 минут, с последующим добавлением свежеприготовленного водного раствора NaBH_4 или NaBH_3CN (70 мл, 4 мг/мл). Через 15 мин 3Д матрикс или ПС отмывали с несколькими сменами воды в течение 6 часов, далее помещали в 0,5% раствор глицерина в воде и высушивали под ламинарным потоком воздуха.

2.3.4 Исследование механических свойств матриксов и протезов сосудов

Материал, изготовленный электроспиннингом, разрезали на полоски шириной 10 мм и длиной 35–40 мм. Толщину материала определяли при помощи микрометра, зажимая матрикс в измерительной щели. Образцы материалов толщиной 160–200 мкм использовали в эксперименте. Полоску материала закрепляли между двумя зажимами, которые, затем, вертикально подвешивали за подвесы разрывной машины и измеряли усилие при растяжении со скоростью 10 мм/мин согласно ГОСТ Р ИСО 7198-2013. В результате получали экспериментальные данные, которые использовали для определения прочности на разрыв и удлинения в области упругой/эластичной деформации.

Для каждого образца были определены значения удлинения образца и максимальное усилие в точке разрыва образца. Используя данные из

диаграмм растяжения материала, была определена прочность матрикса по формуле 1: $\sigma = P_{\max} / F_0$, где σ – предел прочности (МПа), $P_{\max}$ – максимальное усилие при разрыве (Н), F_0 – площадь сечения материала (м²).

Для расчета относительного удлинения материала при разрыве использовали формулу 2: $\epsilon = (L_g - L_0) / L_0$, где L_g – длина образца перед разрывом, L_0 – начальная длина образца.

2.3.5 Прочность материалов на прорыв нитью

Прочность материалов на прорыв нитью измеряли, как описано в литературе [130]. Для этого один край ПС фиксировали, второй край на расстоянии 2 мм от конца протеза прошивали монофиламентной полипропиленовой нитью с диаметром 15 микрон (диаметр иглы 170 микрон) и к петле прикладывали увеличивающееся усилие (с шагом 10 г). Максимальную нагрузку, при которой еще не наблюдается деформация/прорыв протеза, считали его прочностью.

2.3.6 Проницаемость протезов

Проницаемость ПС определяли на испытательном стенде. Протез сосуда зажимали между капиллярами, прикладывали избыточное давление (120 мм.рт. ст), фиксировали объем воды проходящей через стенку протеза в течение 1 мин при помощи взвешивания на микровесах с точностью 0,1 мг (Ohaus, PioneerTM, Швейцария).

2.3.7 Исследование податливости и давления разрыва протезов сосудов в условиях гидродинамической нагрузки

Для исследования податливости ПС использовали стенд, позволяющий моделировать перепады давления, и снабженный бесконтактным микрометром, записывающий 64 показания в секунду. Для эмуляции систолического/диастолического давления использовали два резервуара с физраствором, снабженные на выходе/входе электромагнитными клапанами, между которыми устанавливали ПС. Управление клапанами осуществлялось с помощью программируемого контроллера по заданной программе. По результатам измерения строили график изменения диаметра ПС изготовленных методом электроспиннинга и ПС из ПТФЭ, а также свежей

брюшной аорты крыс линии Wistar.

Податливость (комплаинс) рассчитывалась по формуле: $C_{(compliance)} = \Delta d \times 10^4 / d_{dias} \times \Delta P$, где Δd - изменение диаметра ПС во время цикла; ΔP – разница между систолическим и диастолическим давлением, d_{dias} – диаметр ПС во время диастолы. Показатель представлен как $(\%/mmHg^{-1} \times 10^{-2})$.

Для измерения максимального давления разрыва ПС, мы использовали баллон для ангиопластики большего диаметра (8 мм). После опустошения, баллон помещался внутрь ПС, после чего в него медленно нагнетали стерильную воду, увеличивая давление внутри баллона со скоростью 0.5 МПа/мин) до 2 МПа (20 атм) или до разрыва, исследуемого ПС. Параметр представлен в виде мм рт. ст.

2.3.8 Определение области упругой деформации у материалов, изготовленных методом электроспиннинга

Материал, изготовленный ЭС, разрезали на полоски шириной 10 мм и длиной 35-40 мм. Толщину материала определяли при помощи микрометра, зажимая матрикс в измерительной щели. Образцы материалов толщиной 160-200 мкм использовали в эксперименте. Полоску материала помещали между двумя зажимами, которые затем вертикально закрепляли. К нижнему зажиму подвешивали груз, увеличивая вес груза начиная с 10 г. Усилие прилагали в течение 10 сек по три раза, после чего оценивали длину материала. Массу груза изменяли в диапазоне 10÷500 гр. Усилие, при котором длина образца увеличивалась на 10% относительно исходной длины считали пределом прочности в области упругой деформации.

2.3.9 Исследование стабильности матриксов в физиологических условиях *in vitro*

Из матрикса вырезали насечкой кружки диаметром 10 мм и помещали их в 48-луночный планшет. Кружки из волокнистых матриксов инкубировали в 1 мл PBS в течение различного времени (3, 7, 14, 21 и 28 дней) при 37°C и 5% CO₂ с заменой буфера PBS каждые 3 дня. После инкубации матриксы отмывали дважды водой в течение 15 мин и сушили на воздухе в течение 1 ч. Поверхность матриксов, инкубированных различное время в PBS,

анализировали методом сканирующей электронной микроскопии в Институте Катализа СО РАН на микроскопе JSM-6460 LV (Jeol, Япония).

2.3.10 Культивирование клеток

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека культивировали на чашке Петри в среде IMDM с 10% эмбриональную телячью сывороткой при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 дней. Для диссоциации клеток, их отмывали 2 раза фосфатным буфером, затем обрабатывали 0.1% раствором коллагеназы IV типа в фосфатном буфере в течение 2 мин до полного удаления слоя клеток. Клетки отмывали от фермента при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об/мин.

2.3.11 Исследование клеточной пролиферации на матриксах

Из матриксов вырезали высечкой диски диаметром 10 мм, которые помещали в 48-луночный планшет. По краю диски прижимали специальными тефлоновыми уплотнительными кольцами. Эндотелиоциты и фибробласты рассаживали в лунки планшета с матриксами в количестве $6 \div 12 \times 10^3$ клеток на лунку. Для построения калибровочной кривой фибробласты и эндотелиоциты рассаживали в лунки в диапазоне от 0 до 15×10^3 клеток на лунку. Каждый образец исследовали в двух повторах.

После 24 ч после засева клеток в лунки вносили по 15 мкл Alamar Blue реагента и через 8-11 ч измеряли оптическую плотность раствора на 570 нм и 620 нм, используя спектрофотометр (Multiskan FC-Thermo scientific, USA) По полученным данным строили калибровочный график зависимости оптического сигнала (570 нм – 620 нм) от количества клеток в образце, затем определяли количество клеток на исследуемых матриксах исходя из данных калибровочного графика.

2.3.12 Флуоресцентная микроскопия клеток на матриксах

Эндотелиоциты предварительно инкубировали с 15 мкМ раствором Cell Tracker Orange CMRA в культурной среде в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе. Из матриксов вырезали диски диаметром 10 мм, которые помещали в 48-луночный планшет и фиксировали кольцами на дне как описано выше.

Окрашенные клетки рассаживали в лунки планшета с матриксами из расчета 104 клеток на лунку за 2 дня до микроскопии. Перед микроскопией часть препаратов клеток инкубировали 10 мин в растворе SYBR Creen I (Sigma, USA) (10нг/мл), затем клетки дважды отмывали культуральной средой и анализировали на микроскопе Axiovert 200 M (Zeiss, Germany) при помощи флуоресцентной микроскопии.

Для микроскопии использовали следующие фильтры: возбуждение – 450-490 нм, испускание – 500-550 нм для SYBR Creen I; возбуждение – 540-552 нм, испускание – 575-640 нм для Cell Tracker Orange CMRA.

2.3.13 Подготовка матриксов с клетками для сканирующей электронной микроскопии

Из матриксов вырезали диски диаметром 10 мм, которые помещали в 48-луночный планшет и фиксировали на дне лунки кольцами. В подготовленный планшет рассаживали эндотелиоциты или фибробласты из расчета 5×10^3 клеток на лунку и инкубировали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубации удаляли среду, клетки фиксировали добавлением в лунку 2.5% раствора глутарового альдегида в среде IMDM с последующей инкубацией в течение 15 мин, после чего матрикс отмывали 3 раза фосфатным буфером. С помощью фильтровальной бумаги из матрикса удаляли излишки воды, замораживали матриксы на металлической подложке в жидком азоте. Затем образцы высушивали в лиофильной сушке в течение 8 часов и анализировали образцы после напыления слоя золота и получали изображения с помощью электронного микроскопа JSM-6460LV.

Диаметр волокна и размер пор оценивали по изображениям SEM в соответствии с ISO 7198: 1998. Пористость матриц была рассчитана по формуле: $[\text{площадь пор} / (\text{площадь матрицы} + \text{площадь пор})] \times 100\%$.

2.3.14 Исследование влияния 3Д матриксов на гемостаз крови

Матриксы, изготовленные на основе исследуемых полиуретанов и содержащие гепарин и бивалирудин (гепарин был введен в состав раствора для электроспиннинга в виде трет-бутиламмонийной соли) были использованы для оценки влияния на гемостаз крови. Исследование было выполнено в

соответствие с рекомендациями, изложенными в ГОСТ Р ИСО 7198-2013. Было исследовано влияние инкубации крови с матриксами на такие параметры гемостаза как фибриноген, активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) и Д-димер. Для исследования были использованы стандартные наборы реактивов, используемые в клинической лаборатории НМИЦ, а именно, для измерения фибриногена использовался реактив «Тромбин реагент» (кат. № 10445721), АПТВ – «Патромтин SL» (кат. № OQGS29) и Д-димера «Д-димер иннованс» (кат. № 10445980, все реагенты производства Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Германия). Данные получали при помощи автоматического анализатора Sysmex CS-2100i (Япония).

Из матриксов были сделаны образцы квадратной формы (10x10мм) (толщина 110 мкм) и помещены в 2 мл пластиковые пробирки. Предварительно 3Д матриксы были вымочены в физиологическом растворе в течение 30 мин и затем высушены. Далее в каждую пробирку с соответствующим образцом добавляли по 750 мкл донорской крови, смешанной с цитратом натрия, и медленно перемешивали на мешалке Overhead (3 оборота/мин) в течение 30 мин. После этого кровь из пробирок с образцами центрифугировали, а полученную плазму использовали для анализа. В качестве первого контроля брали плазму крови этого же донора после контакта с пластиковой пробиркой. В качестве второго контроля брали плазму крови этого же донора после контакта с пластиковой пробиркой в течение 30 минут. Все измерения были повторены 3 раза, использовалась кровь от 3-х разных здоровых добровольцев – доноров.

Для исследования адгезии тромбоцитов к поверхности матриксов 3Д матриксы инкубировали с фракцией, обогащенной тромбоцитами плазмы и оценивали количество адсорбированных тромбоцитов при помощи СЭМ.

Для исследования гемолиза крови при контакте с матриксами, из последних были сделаны образцы округлой формы, диаметром 10 мм (толщина 110 мкм) и помещены в 48-луночный планшет в дублях. Образцы вымочены в физиологическом растворе в течение 30 мин и затем высушены. У 3-х разных доноров в условиях процедурного кабинета была взята венозная кровь в вакутейнеры с антикоагулянтом ЭДТА. 2,5 мл крови из каждой

пробирки были смешаны с 2,5 мл физиологического раствора. В каждую лунку с матриксом добавили по 200 мкл разбавленной крови от каждого донора. В качестве отрицательного контроля к 1 мл физиологического раствора добавили 100 мкл донорской крови. В качестве положительного контроля к 1 мл воды добавили 100 мкл донорской крови. Систему инкубировали в течение 60 мин. Инкубированную кровь помещали в отдельные пластиковые пробирки, которые центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму помещали в 96-луночный планшет. Для определения гемолиза определяли оптическую плотность плазмы на длине волны 445 нм (Multiscan FC, Thermo Fisher, США). Процент гемолиза рассчитывался по следующей формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = (A_{\text{образца}} - A_{\text{отр.контроль}}) * 100 / (A_{\text{пол.контроль}} - A_{\text{отр.контроль}})$$

2.3.15 Оценка высвобождения бивалирудина из матриксов in vitro

Чтобы оценить высвобождение бивалирудина из трехмерных матриксов, их инкубировали в фосфатном буфере при комнатной температуре в течение десяти дней, промывали апиrogenной водой, сушили на воздухе и анализировали с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии. Инфракрасные спектры ослабленного полного отражения для матриксов регистрировали в диапазоне 4000–350 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹, собирая 40 сканов в инфракрасном Фурье-анализаторе Cary 660 (Agilent Technologies, США). Спектр каждого образца измеряли, по меньшей мере, дважды. Частоты полос и их интенсивности были полностью воспроизведены.

2.3.16 Измерение угла смачивания матриксов

Для оценки гидрофильности трехмерных матриксов угол контакта оценивали методом сидячей капли с использованием анализатора формы капли DSA25 (Kruss GmbH, Германия) при комнатной температуре. Угол контакта был рассчитан после 4 повторов измерений для каждого типа трехмерных матриц.

2.3.17 Набор животных для исследования

Работа была выполнена на 36 лабораторных крысах линии Wistar, имеющих SPF-статус со средним возрастом $6,7 \pm 0,46$ месяцев и средней массой тела $498 \pm 38,8$ г.

2.3.18 Контроль содержания и использования животных

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами («Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123» от 18 марта 1986 г. Страсбург, 1986; «Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации» № 267 от 19.06.2003 г., ГОСТ 10993-2-2011).

Крысы содержались в SPF-виварии ИЦИГ СО РАН в соответствии с регламентом «Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes». Для содержания использовались клетки из пластика с автономной системой вентиляции, кормушкой и поилкой (рис. 3). Уборка загрязненных клеток и дезинфекция проводилась согласно требованиям нормативной документации.



Рисунок 3. Общий вид блока содержания животных SPF-вивария ИЦИГ СО РАН

Животные имели свободный доступ к корму и воде. Предоставлялся полнорационный экструдированный брикетированный корм «ПроКорм» (ГОСТ Р 50258-92; ЗАО «Компания «БиоПро», Новосибирск). Подготовка корма осуществлялась согласно требованиям нормативной документации. Идентификация животных производилась по бирке на клетке.

Согласно регламенту санитарно-эпидемиологического и ветеринарного законодательства, животные находились на карантине не менее 2 недель от момента поступления в виварий до введения в экспериментальное исследование. Перед экспериментом животные проходили адаптацию в течение 5 дней. В этот период проводится ежедневный ветеринарно-клинический осмотр животных согласно требованиям нормативной документации. Действия в отношении животных, находящихся в агональной стадии, или умерших во время исследования, определялся соответствующими нормативными документами. Если животное умирало в течение исследования, устанавливалось и документировалось время гибели с максимально возможной точностью. Животное подвергалось вскрытию как можно раньше. Умиравшие животные подвергались эвтаназии, взвешиванию и вскрытию.

Всем животным выполняли хирургическое вмешательство - "Резекция с протезированием инфраренального отдела аорты» в стерильных условиях операционной (см. рис. 3, 4). На каждый срок наблюдения (1; 12 и 24 недели) были имплантированы по шесть образцов одного из типов ПС. Для профилактики тромбоза ПС в течение 3-х суток после операции животным выполняли инъекцию клексана подкожно из расчета 1 мг/кг - 1 раз в сутки. Последующее время наблюдения животные не получали каких-либо лекарственных препаратов.

По истечению срока наблюдения выполняли повторную операцию - "Релапаротомия, эксплантация протеза", используя наркоз. Выделение и иссечение протеза производилось с захватом 5 мм аорты от анастомозов,

таким же образом, как описано в разделе 2.3.19.

Выведение животных из эксперимента осуществляли сразу после забора ПС (не дожидаясь окончания действия наркоза) путем ингаляции CO₂ в специальной камере.

2.3.19 Процедура имплантации экспериментального протеза сосуда

В качестве премедикации (для уменьшения секреции слюнных и бронхиальных желез) использовали 0,1% - 0,1 мг/кг атропин, внутримышечно. Введение в наркоз осуществляли путем внутримышечной инъекции смеси растворов КсилаВет (Pharmamagist Ltd, Венгрия), Золетил100 (Virbac Sante Animale, Франция) и 0.9% раствор NaCl (Красфарма, Россия), из расчета: 4 мг Ксилазина и 20 мг Золетила на кг веса и 0,5 мл физ. раствора. Затем после наступления действия препаратов и введения в наркоз, животное фиксировалось на операционном столе в положении на спине. С помощью бритвенного станка удаляли шерсть с передней брюшной стенки.

Обработав операционное поле антисептическим средством (10% раствором «Бетадин»), доступ к брюшной аорте выполняли посредством срединной лапаротомии.

При использовании 6 – кратного увеличения операционного микроскопа OPMI PICO (Carl Zeiss, Германия) выделяли инфраренальный отдел аорты.

Перед пережатием аорты подкожно однократно вводили 100 ЕД гепарина. После наложения зажимов на 2-3 мм ниже устьев почечных артерий и на 2-3 мм выше бифуркации аорты (рис. 4А) выполняли резекцию инфраренального участка аорты (рис. 4 Б). С помощью атравматичной нити Prolene 8-0 формировали проксимальный, а затем дистальный анастомозы 8-10 узловыми швами (рис. 4В). После запуска кровотока осуществляли контроль гемостаза.

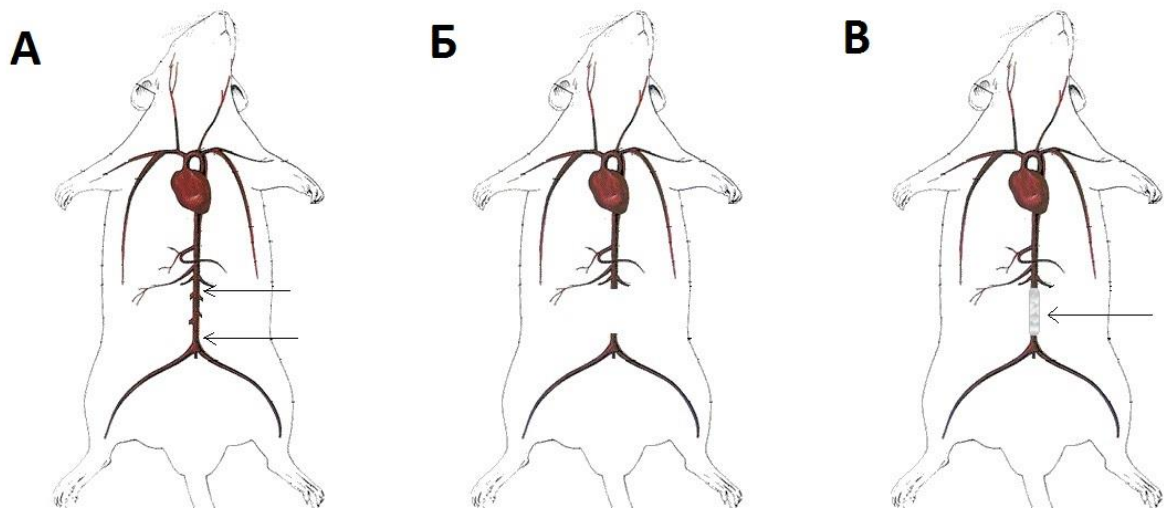


Рисунок 4. Схематичное изображение этапов операции. **А** – выделение инфраренальной аорты крысы (стрелками указаны места наложения зажимов); **Б** – резекция участка инфраренального отдела аорты; **В** – имплантация ПС (стрелкой указан протезированный участок инфраренального отдела аорты).

На заключительной стадии выполняли послойное ушивание операционной раны с последующей обработкой швов антисептическим средством (рис. 5).

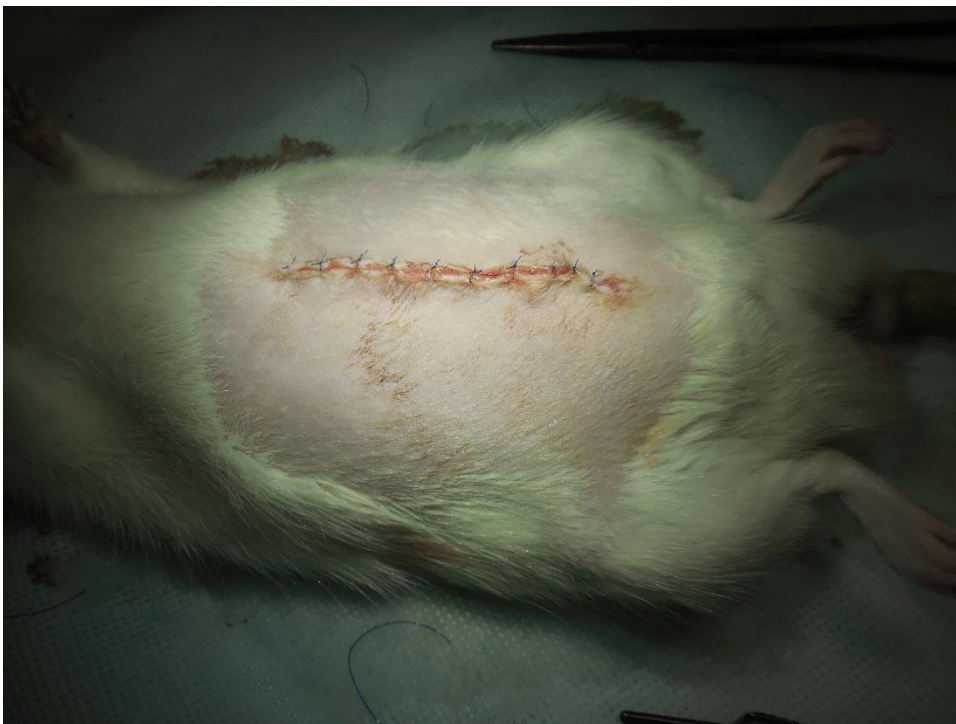


Рисунок 5. Финальный вид операции

2.3.20 Оценка проходимости протезированного участка аорты

Пройодимость ПС оценивали клинически и методом ультразвукового

дуплексного сканирования при помощи аппарата DC7 (Mindray, КНР) на 1, 12 и 24 неделе от хирургического вмешательства.

Оценку средней линейной скорости кровотока (ЛСК) в протезе выполняли так же с помощью аппарата DC7 (Mindray, КНР) на 1, 12 и 24 неделе от хирургического вмешательства. При этом дополнительно были определены показатели ЛСК у контрольной группы животных (6 крыс линии Wistar, которым не был имплантирован протез). Точками исследования были: зона перед проксимальным анастомозом между аортой и ПС, середина ПС и зона сразу после дистального анастомоза. Контрольное обследование проводилось с использованием средства для ингаляционного наркоза - 2% изофлуран в сочетании с кислородом, подача которого животному была через маску. Осложнений во время исследования не было.

2.3.21 Исследование морфологического строения протеза сосуда

Макроскопический анализ, а именно состоятельность анастомозов, наличие деформаций ПС и изменение окружающей его ткани анализировали интраоперационно в момент забора исследуемого материала под операционным микроскопом OPMI PICO (Carl Zeiss Surgical GmbH, Германия), при 6- и 10-кратном увеличении. Эксплантированные ПС промывали при помощи инсулинового шприца небольшим количеством физиологического раствора, после чего фиксировали в 4% формалине на фосфатном буфере (Sigma, США, № P4417-100TAB).

Обзорную микроскопию и обзорную флуоресцентную микроскопию выполняли с помощью бинокулярного микроскопа Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия). На всех сроках наблюдения оценивали внешний и внутренний диаметр/площадь просвета исследуемых ПС. Для оценки неоинтимы измеряли толщину стенки протеза в 4 точках (в области максимальной толщины неоинтимы, и на равноудаленном друг от друга расстоянии) с использованием бинокулярного стереомикроскопа Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision. В качестве оценочной величины использовали среднее значение толщины стенки (среднее значение толщины = сумма 4-х измерений толщины/4).

Для гистологического и иммуногистохимического анализа эксплантированных ПС изготавливали серийные поперечные криосрезы с толщиной 10 мкм, используя криомикротом «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия). Гистологическое исследование препаратов проводили с помощью окраски гематоксилином-эозином (Biovitrum, Санкт-Петербург).

Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартному протоколу в иммуностейнере LabVision Autostainer 720 (Thermo Scientific, США) при помощи системы UltraVision Quanto HRP DAB Protocol с первичными моно- и поликлональными антителами (ThermoScientific, США) к collagen-4 (клон PHM-12+ClV22), α -SMA (клон 1A4/asm-1), Factor VIII (кроличье, поликлональное) мечеными пероксидазой хрена.

Морфометрический анализ включал изучение планиметрических и стереологических количественных показателей. Количественным и полуколичественным методом оценивали содержание клеточных и структурных элементов в стенке экспериментальных протезов и неоинтимальном слое. Кальцифицированную площадь среза определяли в каждом исследуемом случае методом прямой планиметрии на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином. Для этого изображение поперечного среза протеза с помощью видеокамеры светового микроскопа (AxioCam Erc5s) выводили на экран монитора и, используя систему обработки и анализа изображения (ZEN 2.3), определяли площадь стенки протеза и новообразованной интимы и отдельно – площадь кальцификатов. Затем рассчитывали относительную величину кальцификации среза в процентах по отношению ко всей площади протеза.

Объемную плотность (в %) иммуногистохимически окрашенных участков внеклеточного матрикса оценивали с использованием программы «ZEN 2.3» при увеличении в 400 раз с помощью закрытой тестовой системы из 100 точек. В каждом срезе исследовали все поля зрения новообразованной интимы (не менее 10 полей зрения) и в каждом из них измерения проводили при 5 различных произвольно выбранных положениях окулярной сетки. Экспрессию коллагена 4-го типа оценивали полуколичественным методом по объемной плотности окрашенного внеклеточного матрикса как выраженную

«3+» (при окрашивании $>50\%$ внеклеточного матрикса), умеренную «2+» (при окрашивании $25-50\%$ внеклеточного матрикса), слабую «1+» (при окрашивании $<25\%$ внеклеточного матрикса), отсутствие окрашивания «—». Экспрессию ASM оценивали по доле позитивно окрашенных гладкомышечных клеток. Экспрессию фактора VIII оценивали также по доле позитивно окрашенной цитоплазмы эндотелиоцитов. В каждом случае подсчитывали не менее 100 клеток.

2.3.22 Исследование экспериментального протеза сосуда на биостабильность

Для того чтобы определить молекулярную массу полученного полимера, мы определяли вязкость растворов разных концентраций полимера. Характеристическую вязкость определяли, используя уравнение Шульца-Блашке после измерения вязкости растворов и растворителя. Далее с использованием уравнения Марка-Куна-Хаувинка и справочных значений коэффициентов k и α из уравнения Марка –Хаувинка вычисляли значение мол массы гидролизованного.

Далее от ПС, эксплантированных на разных сроках наблюдения, отрезали прямоугольный фрагмент длиной 10 мм, удаляли биологические ткани и помещали на 1 неделю в стерильную апиrogenную дистиллированную воду, которую меняли 7 раз. После завершения диализа фрагмент ПС сушили в стерильном ламинарном потоке воздуха в течение 48 часов и взвешивали с точностью до 0,1 мг. Высушенные фрагменты ПС помещали в пробирки вместе со стеклянными шариками и 0,5 мл тетрагидрофурана (ТГФ) и инкубировали в шейкере Eppendorf 5432 (Германия) в течение 7 дней до полного разрушения образцов. Остатки биологической ткани, нерастворенные в ТГФ, осаждали с помощью центрифугирования при $12000 \times g$ в течение 10 мин. Супернатант использовали для исследования молекул ПУ методами гелъпроникающей хроматографии и ИК-Фурье спектроскопии. В качестве контроля, использовали матриксы, изготовленные методом ЭС из таких же полимерных смесей, что и ПС. Прочность протезов на разрыв оценивали при

помощи разрывной машины Zwick/Roell Z10 (Германия).

2.3.23 Статистическая обработка данных

Для накопления данных и их первичной сортировки использовали Microsoft Excel 2010. Результаты исследований были обработаны с использованием пакета программ для статистической обработки “Statistica 10” в среде Windows 7 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены в виде медианы с (интерквартильным размахом), а качественные - в виде общего количества и доли в процентах. Статистическая значимость различия между двумя группами по количественным данным определялась с помощью U критерия Манна – Уитни, а по качественным признакам - с помощью точного двустороннего теста Фишера. Уровень отклонения нулевой гипотезы об отсутствии различий между группами принимали при $p < 0,05$.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование механических свойств и цитотоксичности матриксов из Tecoflex.

Для получения 3 Д-матриксов при помощи метода электроспиннинга были приготовлены растворы, состоящие из смеси полиуретана Тек (3-7%) с желатином (5-20% относительно полиуретана) в ГФИП, и подобраны оптимальные условия электроспиннинга для каждого раствора (таблица 2).

Таблица 2. Условия электроспиннинга для изготовления матриксов из различных смесей ПУ Тес с Жл.

Состав матрикса	Параметры электроспиннинга		
	Напряжение, кВ	Скорость подачи раствора, мл/ч	Расстояние между фильерой и барабаном-коллектором, см
3% Тек + 5% Жл	19.0	1.3	20
3% Тек + 10% Жл	18.5	1.3	20
3% Тек + 15% Жл	18.5	1.2	19.5
3% Тек + 20% Жл	20.0	1.2	19.5
5% Тек + 5% Жл	19.5	1.3	20
5% Тек + 10% Жл	22.5	1.4	20
5% Тек + 15% Жл	21.0	1.4	18.5
5% Тек + 20% Жл	20.0	1.3	18.5
7% Тек + 5% Жл	21.0	1.5	20
7% Тек + 10% Жл	22.1	1.3	20
7% Тек + 15% Жл	24.0	1.2	19
7% Тек + 20% Жл	24.0	1.0	19

Микроструктура полученных матриксов была исследована с помощью СЭМ (рис. 6). По данным СЭМ все полученные матриксы образованы микроволокнами диаметром в диапазоне $0.60 \pm 0.21 \div 1.52 \pm 0.40$ мкм и размером пор $1.21 \pm 0.53 \div 7.42 \pm 3.51$ мкм. Обнаружено, что повышение концентрации ПУ в растворе для электроспиннинга приводит к увеличению диаметра волокон полученных матриксов (рис. 6).

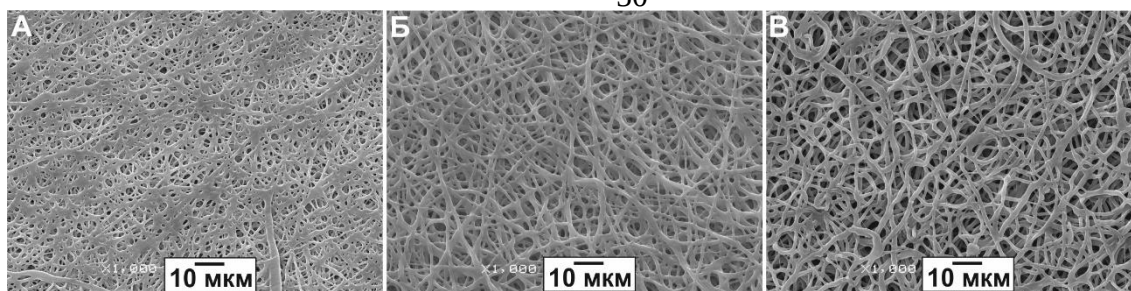


Рисунок 6. Поверхность матриксов по данным сканирующей электронной микроскопии ($\times 1000$ увеличение). Матриксы изготовлены методом электроспиннинга из растворов в ГФИП: 3% Тек + 5% Жл (А), 5% Тек + 5% Жл (Б), 7% Тек + 5% Жл (В).

Пористость матриксов варьирует в диапазоне от 10.14 до 47.29% в зависимости от концентрации полиуретана в растворе для электроспиннинга (см. табл.3). Наибольшая пористость наблюдается у матриксов, изготовленных из 5 или 7 % ПУ с добавлением 15% желатина.

Матриксы, изготовленные электроспиннингом из чистого Тек и смесей Тек с Жл не сильно отличаются и по гидрофильности. Например, для матриксов из чистого 3% ПУ Тес угол смачивания составляет $101.95 \pm 1.23^\circ$, для матрикса с 5% Жл $104.28 \pm 1.23^\circ$, для матрикса с 10-15 % Жл $109.03 \pm 1.65^\circ$, а для матрикса с 20% Жл 115.63 ± 1.04 .

Увеличение концентрации белка с 5 до 20% в смеси для электроспиннинга при 3% концентрации ПУ приводит к сильной усадке матриксов после увлажнения от 16 ± 0.8 до $61 \pm 4.9\%$ (аналогично ведут себя матриксы на основе 5 и 7% ПУ Тес с белком). Следует отметить, что коэффициент усадки для материалов, состоящих из чистого 3% ПУ Тес и 3% ПУ Тес с 5% Жл, практически не зависит от увлажнения образцов и составляет 16-18%.

Для всех тестируемых материалов были определены механические свойства (табл. 3). Из данных, представленных в таблице 2 видно, что концентрация Жл в растворе для электроспиннинга влияет на прочность материалов и максимальное удлинение образцов. Для матриксов с концентрацией 7% ПУ Тес характерны низкие значения прочности на разрыв от 4.5 ± 0.4 до 6.6 ± 0.4 МПа по сравнению с матриксами на основе 3% ПУ Тес,

для которых минимальное значение прочности на разрыв составляет 8.9 ± 0.6 МПа. Следует отметить, что матриксы с 5% Жл независимо от концентрации ПУ Тес в растворе для электроспиннинга имеют наименьшее удлинение при разрыве, а при повышении концентрации Жл (10-20%) в растворах для электроспиннинга наблюдается удлинение матриксов как минимум на 50%. Поскольку матриксы 3% ПУ Тес + 15% Жл, 3% ПУ Тес + 10% Жл и 5% ПУ Тес + 15% Жл, отличаются повышенной прочностью и эластичностью, они представляют собой наиболее подходящие материалы для протезирования тканей, прочность и эластичность которых являются принципиально важными свойствами для реализации их биологической функции.

Таблица 3. Структурные характеристики и механические свойства полученных 3Д матриксов

Состав матрикса	Структурные характеристики матриксов			Механические свойства матриксов	
	Диаметр волокон, мкм	Размер пор, мкм	Пористость, %	Прочность на разрыв, МПа	Предельное удлинение, %
3% Тек + 5% Жл	0.73 ± 0.26	$1,52 \pm 0,67$	11,78	8.9 ± 0.6	238 ± 39
3% Тек + 10% Жл	0.60 ± 0.21	$1,24 \pm 0,44$	10,38	14.9 ± 1.6	398 ± 20
3% Тек + 15% Жл	0.66 ± 0.24	$1,21 \pm 0,53$	10,14	15.6 ± 0.8	392 ± 51
3% Тек + 20% Жл	0.64 ± 0.22	$1,33 \pm 0,91$	11,76	9.8 ± 0.5	319 ± 37
5% Тек + 5% Жл	1.31 ± 0.55	$3,07 \pm 1,62$	27,68	6.9 ± 1.1	261 ± 56
5% Тек + 10% Жл	1.30 ± 0.29	$2,81 \pm 1,38$	21,73	7.5 ± 0.4	318 ± 63
5% Тек + 15% Жл	1.52 ± 0.40	$7,42 \pm 3,51$	38,36	10.8 ± 0.3	376 ± 54
5% Тек + 20% Жл	1.3 ± 0.42	$4,31 \pm 1,89$	32,88	3.4 ± 0.1	393 ± 67
7% Тек + 5% Жл	1.15 ± 0.28	$4,81 \pm 2,64$	39,71	4.5 ± 0.4	260 ± 12
7% Тек + 10% Жл	1.28 ± 0.49	$5,13 \pm 2,45$	39,80	5.5 ± 0.4	323 ± 67
7% Тек + 15% Жл	1.2 ± 0.38	$6,42 \pm 4,53$	47,29	6.6 ± 0.4	357 ± 61
7% Тек + 20% Жл	1.32 ± 0.64	$3,67 \pm 1,42$	31,35	4.6 ± 0.9	310 ± 38

3.2 Исследование стабильности исследуемых 3Д матриксов в условиях *in vitro*

Стабильность свойств матриксов в кратковременной или долговременной перспективе определяет круг возможного применения матриксов в качестве тканезаменяющих конструкций. В связи с этим была исследована стабильность структуры и механических свойств матриксов в

фосфатном буфере при 37°C и 5% CO₂ в течение 28 дней. На рис. 7 приведены изображения для матрикса 5% Тек + 15% Жл, полученные при помощи СЭМ. Из данных видно, что через 3 дня и 21 день в результате инкубации в буфере у матрикса наблюдаются изменения в структуре волокон и в размере пор (рис. 7). Аналогичная тенденция наблюдалась и у матриксов, состоящих из 3% Тек + 10% Жл и 3% Тек + 15% Жл. Эти данные согласуются с данными других авторов, полученными для матриксов, изготовленных из смеси Тесорphilic™ с желатином в соотношении 70:30 по весу [158].

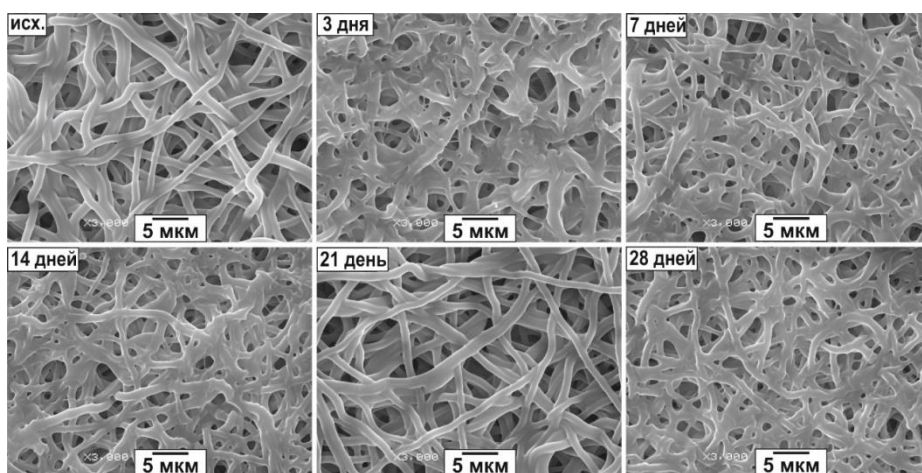


Рисунок 7. Стабильность матрикса, изготовленного электроспиннингом из раствора 5% Тек + 15% Жл, по данным СЭМ (×3000 увеличение).

Для выявления причины изменения микроструктуры волокон во время инкубации матриксов в фосфатном буфере белок матриксов, контактирующий с водной фазой, был зафиксирован при помощи поперечно-сшивающего реагента - глутарового альдегида.

Из полученных с помощью СЭМ данных видно, что обработка глутаровым альдегидом матрикса из 3% Тек + 15% Жл стабилизирует структуру матрикса (рис. 8Б), по сравнению с необработанным матриксом (рис. 8А). Таким образом, изменение микроструктуры матриксов из Тек с добавлением Жл связано с перераспределением белка из состава волокон во время инкубации матриксов в водных средах. Следует отметить, что во время инкубации матриксов потеря массы составляет не более 1% для всех исследуемых матриксов.

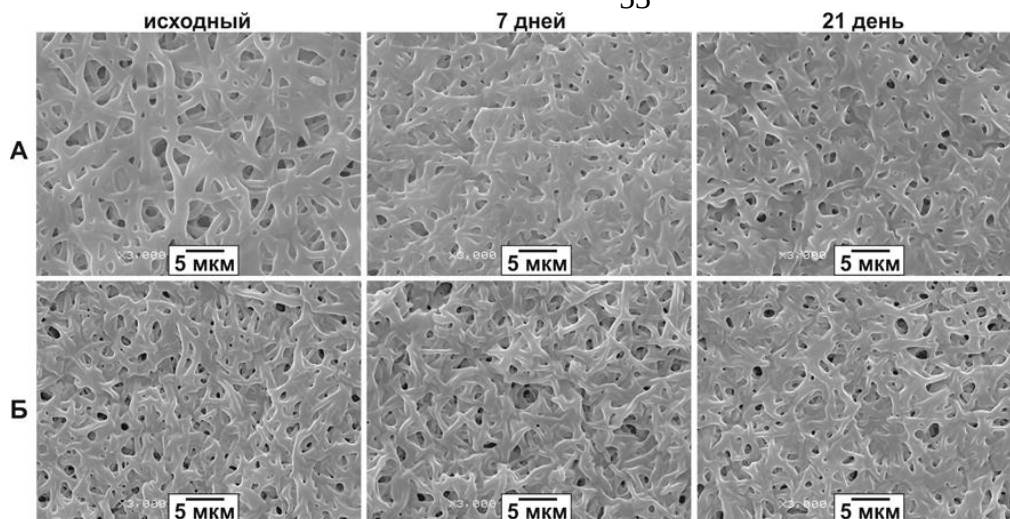


Рисунок 8. Стабильность необработанного (А) и обработанного (Б) глутаровым альдегидом матрикса из 3% Тек + 15% Жл, по данным СЭМ ($\times 3000$ увеличение).

3.3 Изменение механических свойств матриксов при инкубации их в фосфатном буфере

В соответствие с данными СЭМ, что белок может частично высвобождаться из волокна, была исследована зависимость изменения прочности матриксов от времени их инкубации в водных растворах (см. табл. 4). Результаты демонстрируют, что инкубация матриксов, не обработанных глутаровым альдегидом, в фосфатном буфере приводит к увеличению прочности после 7 дней инкубации, а после 21 дня инкубации прочность матриксов уменьшается по сравнению с ее значениями после 7 дней инкубации, но превышает значение прочности исходных материалов. При этом прочность матриксов с добавлением 15% Жл при инкубации в физрастворе возрастает на 30%, в то время как прочность матриксов с 10% Жл только на 5-15%. Следует отметить, что инкубация в физрастворе приводит к уменьшению диаметра волокна на 7-10% и увеличению количества контактов между волокнами как минимум в три раза и площади контакта волокон. Следует отметить, что инкубация в физрастворе приводит к уменьшению диаметра волокна на 7-10% и увеличению количества контактов между волокнами как минимум в три раза и площади контакта волокон.

Таблица 4. Значение прочности на разрыв* и удлинения** необработанных и обработанных глутаровым альдегидом матриксов после инкубации в физрастворе.

Матрикс	Механические характеристики	Время инкубации матрикса в фосфатном буфере		
		Исходный	7 дней	21 день
3% Тек + 10% Жл	Прочность матрикса на разрыв	14.9±1.6	15.7±0.5	16.8±0.9
	Удлинение матрикса	398±20	296±38	298±25
3% Тек + 15% Жл	Прочность матрикса на разрыв	15.6±0.8	20.4±1.7	17.0±1.2
	Удлинение матрикса	392±51	293	383
5% Тек + 15% Жл	Прочность матрикса на разрыв	10.8±0.3	14.2±1.3	13.8±1.2
	Удлинение матрикса	376±54	379	527
3% Тек + 10% Жл обработанный ГА	Прочность матрикса на разрыв	15.1±1.8	17.3±2.8	18.1±0.8
	Удлинение матрикса	298±31	323	304±41
3% Тек + 15% Жл обработанный ГА	Прочность матрикса на разрыв	9.2±0.5	7.7±1.2	9.9±0.8
	Удлинение матрикса	346±27	477	472±64
5% ПУ Тек + 15% Жл обработанный ГА	Прочность матрикса на разрыв	9.5±1.6	11.0±2.1	12.0±1.1
	Удлинение матрикса	287±39	343	530±69

* значение прочности на разрыв представлено в МПа,

** значение максимального удлинения представлено в %.

Изменение диаметра волокна может свидетельствовать о гидратации внутренней сферы волокон (гидратации белка), что может приводить к формированию дополнительных взаимодействий между гидратирующимися полипептидными цепями. Матриксы с 15% Жл содержат в полтора раза больше белка, чем с 10% Жл, имеют больший внутренний гидратируемый объем и, по-видимому, способны формировать большее количество межбелковых контактов. Выход части белка из волокна в процессе инкубации, которое было обнаружено при помощи СЭМ, приводит к изменению строения волокна и контактов между волокнами, что влияет на прочность матриксов. Вероятно, в процессе нагружения матриксов, ориентации волокон вдоль вектора силы, в волокнах формируются новые межмолекулярные

взаимодействия, которые наряду с формированием дополнительных контактов между волокнами и приводят к упрочнению матриксов.

Эти соображения подтверждают данные о прочности матриксов, обработанных ГА. В таких матриксах подвижность молекул белка ограничена формированием внутри- и межмолекулярных ковалентных связей, и инкубация таких матриксов в водной среде меньше влияет на прочность материала. Тем не менее, инкубация матриксов, обработанных глутаровым альдегидом в течение 21 дня в фосфатном буфере так же приводит к небольшому увеличению прочности, как и в случае матриксов, не обработанных поперечно-сшивающим реагентом.

Обработка матриксов ГА приводит к незначительному изменению прочности матриксов, состоящих из 3% Тек + 10% Жл и 5% Тек + 15% Жл, а матриксы, изготовленные из 3% Тек + 15% Жл в результате такой обработки, теряют до 40% прочности. При этом, такие матриксы не склонны к изменению структуры в процессе инкубации в физрастворе по данным СЭМ (см. рис. 8Б). Очевидно, что фиксация белка приводит к ограничению его свободы в волокне и на границе волокон, что минимизирует возможность реорганизации взаимного расположения молекул и возникновения новых межмолекулярных взаимодействий в процессе нагружения волокон, и, в конечном счете, влияет на прочность матриксов.

На основании полученных данных для дальнейшей работы были выбраны следующие материалы с наилучшими показателями: 3%Тек+10%Жл, 3%Тек+15%Жл, 5%Тек+15%Жл.

Для выбранных трех типов материалов (3%Тек+10%Жл, 3%Тек+15%Жл, 5%Тек+15%Жл) исследовали прочность в области упругой деформации в сухом и влажном состояниях образцов. Для этого каждый матрикс был закреплен в вертикальном положении за верхний конец образца. Нижний конец образца последовательно нагружали весом с шагом 10 г до конечной массы 300 г. Область упругой деформации определяли в точке, когда длина образца увеличивалась более чем на 10% относительно исходной длины материала. В таб. 5 приведены средние значения области упругой деформации, полученные для трех повторов.

Таблица 5. Значение области упругой деформации материалов в сухом и влажном состояниях.

Материал	Сухое состояние (мПа)	Влажное состояние (мПа)	p
3% Тек+10% Жл	1.35±0.29	0.94±0.09	0,005
3% Тек+15% Жл	0.84±0.2	0.5±0.08	0,005
5% Тек+15% Жл	0.85±0.04	0.54±0.06	0,005

На основании полученных результатов, можно сделать вывод о том, что прочность в области упругой деформации матриксов во влажном состоянии уменьшается, относительно прочности матриксов в сухом состоянии, что необходимо учитывать, поскольку подразумевается, что матриксы будут функционировать в водной среде.

Полученные матриксы обладают механическими характеристиками схожими с характеристиками нативных сосудов, учитывая это для использования наших матриксов, в качестве протезов сосудов, необходимо было оценить их стабильность в физиологических условиях и исследовать их взаимодействие с клетками.

3.4 Взаимодействие эндотелиальных клеток с поверхностью исследуемых матриксов

Известно, что химический состав поверхности, шероховатость и пористость матриксов являются основными факторами, определяющими взаимодействие клеток с материалами, а именно прикрепление клеток, их пролиферацию и миграцию во внутренний объем тканевых конструкций [159, 160]. В ряде работ показано, что эндотелиальные клетки человека лучше прикрепляются и пролиферируют на гладких поверхностях по сравнению с шероховатыми. При этом шероховатость в диапазоне 10-135 нм незначительно влияет на способность клеток прикрепляться к поверхности матриксов, в то время как к поверхностям с шероховатостью более 287 нм клетки прикрепляются плохо [161]. В соответствии с другими данными, изменение диаметра волокон в диапазоне от 0,3 до 1,3 мкм у матриксов, изготовленных

из ПКЛ методом электроспиннинга, не оказывало влияния на адгезию и пролиферацию, а также миграцию фибробластов в матриксы [162]. Матриксы с существенно большим диаметром волокон ведут себя совершенно иным способом; обнаружено, что изменение диаметра стеклянных волокон в более широком диапазоне от 1 до 85 мкм приводило к изменению миграции эпителиальных клеток. При диаметре волокна менее 40 мкм наблюдалась круговая ориентация эпителиальных клеток вокруг волокон, что способствовало их коллективной миграции [163]. При диаметре волокон более 40 мкм наблюдалась морфология клеток характерная для плоских поверхностей с отсутствием коллективной миграции. Таким образом, было продемонстрировано, что способность клеток к обертыванию волокон является ключевым фактором, влияющим на их миграцию в материалах.

Другим фактором, определяющим заселение внутреннего пространства матриксов, является размер пор, который влияет на механизм взаимодействия клеток с матриксом [164]. По литературным данным для эффективного заселения клетками требуются поры размером не менее 5-12 мкм в зависимости от типа клеток [165]. При размере пор меньше 6 мкм наблюдалось эффективно размножение и проникновение фибробластов внутрь матрикса по данным флуоресценции, в то время как при увеличении диаметра пор от 12 до 23 мкм наблюдалось изменение морфологии клеток, расположению клеток вокруг/вдоль отдельных волокон, и неэффективному заселению матриксов клетками. Полученные матриксы 3% ПУ Тес + 15% Жл, 3% ПУ Тес + 10% Жл и 5% ПУ Тес + 15% Жл различаются диаметром волокон в диапазоне 0.6- 1.52 мкм и размером пор в диапазоне 1,21-7,42 мкм, т.е. должны эффективнее заселяться клетками преимущественно по поверхности, однако учитывая высокую эластичность матриксов даже при невысоких механических напряжениях, они могут менять форму, а значит и размер пор. Все перечисленное позволяет предположить возможность миграции клеток внутрь матриксов, подвергающихся периодическим механическим деформациям под действием пульсовой волны крови.

Ранее было показано, что эндотелиальные клетки эффективно взаимодействуют с поверхностью матриксов, изготовленных из смеси ПУ Тек

с добавлением коллагена и хитозана [152]. Для того, чтобы оценить возможность использования матриц из ПУ Тек с добавлением Жл для изготовления ПС было исследовано взаимодействие первичных эндотелиальных клеток из пупочной вены человека с такими матрицами. Известно, что образование эндотелия на внутренней поверхности протеза играет важную роль в его дальнейшем функционировании [51]. Способность эндотелиальных клеток прикрепляться к поверхности матриц исследовали при помощи СЭМ (рис. 9). Данные представленные на рис. 9 демонстрируют, что эндотелиальные клетки человека прикрепляются к поверхности исследуемых матриц с сохранением клеточной морфологии, которая характерна для морфологии эндотелиоцитов на культуральном пластике.

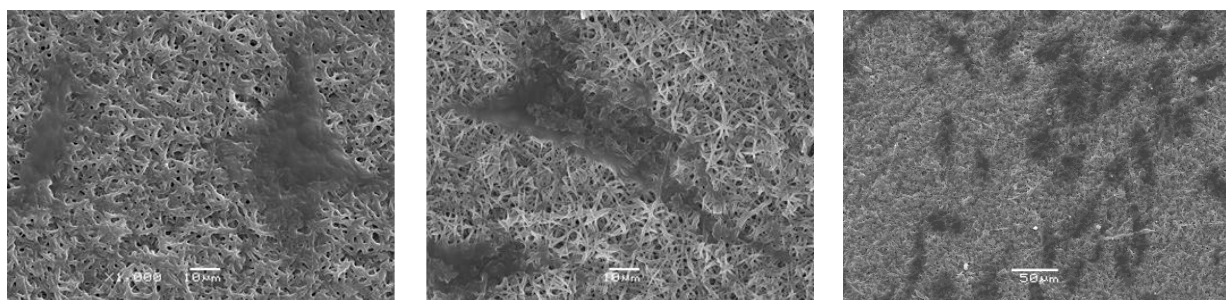


Рисунок 9. Изображения, полученные при помощи СЭМ для матриц, после их инкубации с эндотелиальными клетками ($\times 1000$ увеличение).

Количество жизнеспособных клеток на поверхности матриц определяли через 48 часов после начала культивирования клеток на матрицах с помощью коммерческого реагента AlmarBlue®. Поскольку известно, что клетки от разных биологических доноров различаются между собой по способности пролиферировать на культуральном пластике, для этого эксперимента были использованы клетки, полученные от трех биологических доноров.

На рис. 10 представлены результаты определения жизнеспособности эндотелиальных клеток на поверхности различных матриц. Обнаружено, что эндотелиальные клетки от разных доноров отличаются по способности пролиферировать на поверхности одного и того же матрикса. Показано, что увеличение концентрации Жл в смеси для электроспиннинга приводит к

повышению способности эндотелиальных клеток прикрепляться и пролиферировать на поверхности матриксов из 3% Тек + 15% Жл, по сравнению с матриксами, состоящими из 3% Тек + 10% Жл. Обработка матриксов глутаровым альдегидом в целом повышала эффективность культивирования эндотелиальных клеток на поверхности матриксов, вероятно, это связано с отсутствием изменения структуры волокон в результате гидратации. Однако из полученных данных видно, что наиболее универсальным матриксом для эндотелиальных клеток человека является матрикс, содержащий 3% Тек + 15% Жл и обработанный глутаровым альдегидом.

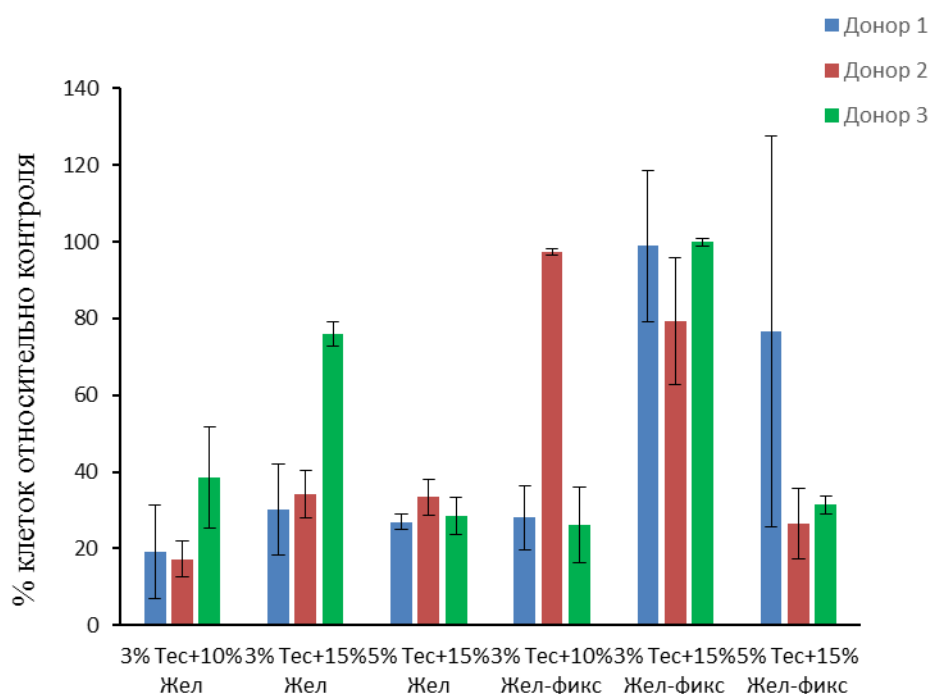


Рисунок 10. Жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности различных матриксов через 48 часов их культивирования с матриксами. Данные представлены как среднее трех повторов $\pm$ стандартное отклонение.

Таким образом, полученные в работе данные демонстрируют, что концентрация желатина, введенного в раствор для электроспиннинга влияет на механические свойства матриксов, а именно прочность и удлинение. Кроме того, данные, полученные с помощью СЭМ, указывают на изменение структуры матриксов в результате их инкубации в фосфатном буфере, которое связано с перераспределением белка в составе волокон относительно полиуретана в результате гидратации матриксов. Фиксация белка при

помощи глутарового альдегида в составе волокон приводит к формированию более стабильной белковой поверхности, уменьшает растворимость белка, т.е. фактически переводит белок в состояние близкое к биологическим поверхностям из нерастворимых коллагенов и/или эластинов, которые и получают из растворимых предшественников. Изготовленные из смеси 3% ПУ Тес с добавлением 15% Жл и обработанные глутаровым альдегидом матриксы имеют поверхность, с которой наилучшим образом связываются первичные эндотелиоциты человека вне зависимости от донора клеток.

Резюме

С помощью электроспиннинга изготовлены 12 вариантов матриксов, содержащих различную концентрацию ПУ (3-7%) и Жл (5-20%, вес: вес, ПУ: Жл). Показано, что наилучшими механическими характеристиками обладают 3Д матриксы, изготовленные из 3% Тек+10% Жл, 3% Тек+15% Жл, 5% Тек+15% Жл. В результате исследования стабильности матриксов *in vitro* показано, что с течением времени они теряют белок, однако после обработки глутаровым альдегидом такой потери не наблюдается. Потеря белка не приводит к существенному изменению прочности матриксов. Исследовано взаимодействие фибробластов и эндотелиоцитов с поверхностью выбранных материалов сканирующей электронной микроскопией, флуоресцентной микроскопией и при помощи теста на жизнеспособность клеток Alamar Blue. Полученные данные демонстрируют, что клетки хорошо прикрепляются и пролиферируют на поверхности матриксов, при этом их обработка глутаровым альдегидом приводит к более эффективной локальной адгезии и пролиферации клеток.

3.5 Исследование матриксов на гемосовместимость и тромбогенность поверхности

Чтобы оценить элиминацию антикоагулянта бивалирудина (Бив), мы инкубировали матриксы в физрастворе, после чего оценивали количество Бив, экспонированного на поверхности матриксов, методом ИК-Фурье спектроскопии. Из данных представленных на рис. 11 видно, что инкубация матриксов, содержащих ПУ с Бив приводит к 2-х кратному снижению

интенсивности полосы в области 1650 см^{-1} , отвечающей валентному колебанию связи $\text{C}=\text{O}$ в белке. Следует отметить, что в результате 10 дневной инкубации матрикса в физиологическом растворе количество оставшегося на поверхности матриксов Бив не зависит от концентрации Бив в диапазоне от 0.5-5%, введенного в состав раствора для электроспиннинга. Такое экспонирование Бив на поверхности матриксов позволяет надеяться на то, что такие матриксы будут обладать атромбогенными свойствами длительное время.

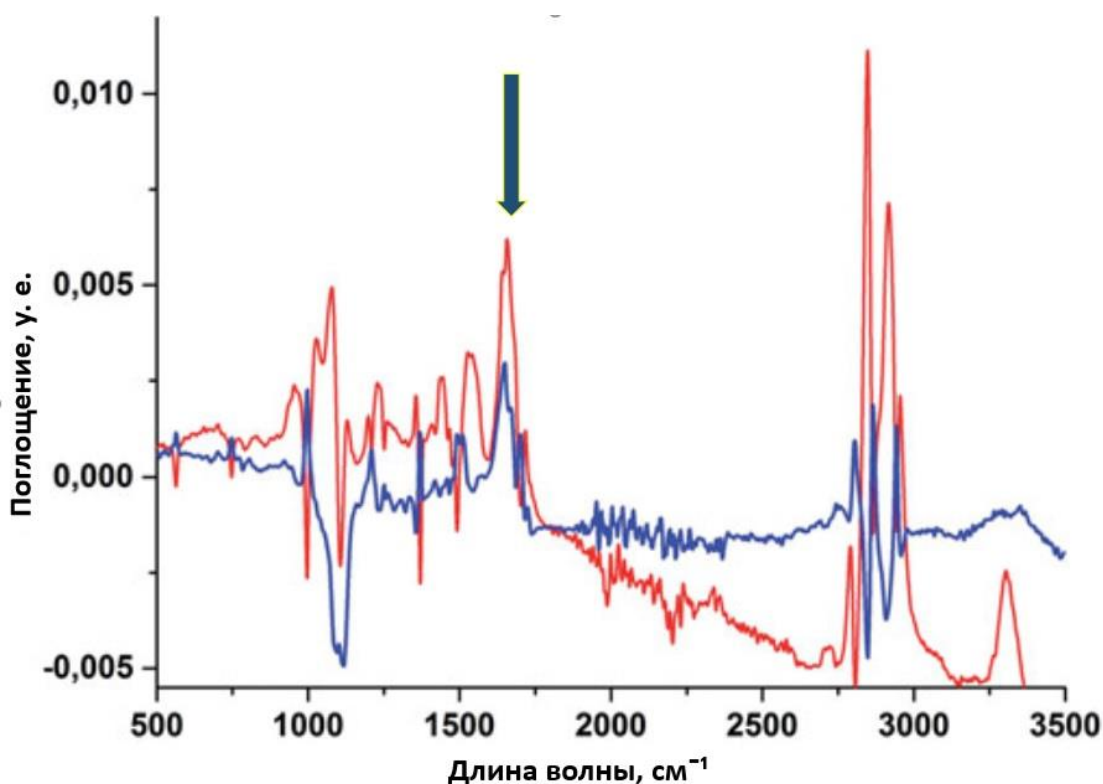
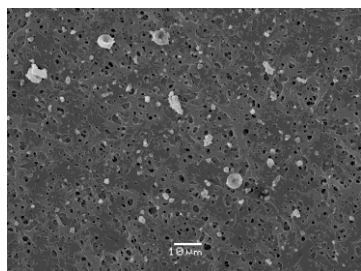


Рисунок 11. ИК-Фурье спектры матриц, изготовленных из 3%Тек+1,5%Бив без инкубации (красная линия) и после десятидневной инкубации в физиологическом растворе (синяя линия). Стрелкой указана длина волны, соответствующая пептидной связи бивалирудина.

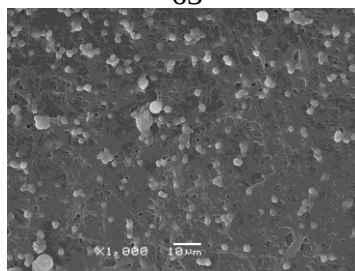
Адгезия тромбоцитов на поверхности материалов является одним из главных тестов в оценки гемосовместимости биоматериалов. Для оценки взаимодействия тромбоцитов с поверхностью матриксов использовали обогащённую тромбоцитами плазму крови с последующей оценкой эффективности адгезии тромбоцитов при помощи СЭМ. Из рис. 12 и таб. 6 видно, что введение желатина в состав матрикса приводит к увеличению количества, связанных с поверхностью матрикса тромбоцитов, при этом

возрастает количество агрегатов тромбоцитов. Обработка глутаровым альдегидом матрикса, содержащего 3% Тек + 15% Жл, приводит к уменьшению количества тромбоцитов на поверхности матриксов как минимум в 3 раза, по сравнению с необработанным матриксом и уменьшению количества агрегатов (см. таб. 6).

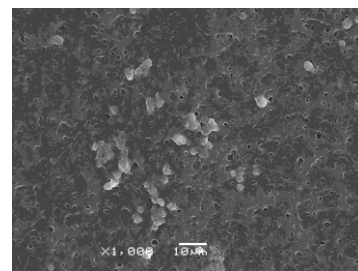
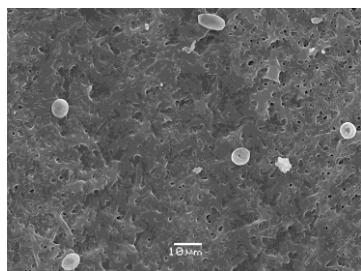
Фиксация желатина ГА и уменьшение его подвижности, по-видимому, осложняет связывание желатина с рецепторами тромбоцитов и уменьшает их связывание с поверхностью матриксов. Введение бивалирудина в состав матриксов приводит к 10-кратному уменьшению количества тромбоцитов на поверхности матриксов по сравнению с матриксом из чистого ПУ, однако на поверхности таких матриксов и детектируются единичные эритроциты. Одновременное введение в состав матриксов на основе полиуретана бивалирудина и желатина на 35% увеличивает количество связанных тромбоцитов относительно матрикса из ПУ с бивалирудином, а с поверхностью таких матриксов, обработанных глутаровым альдегидом, связывается еще на треть больше тромбоцитов. Поскольку из матриксов с бивалирудином может высвобождаться до 50% бивалирудина, свободный бивалирудин, связывая тромбин, может влиять на агрегацию и связывание тромбоцитов с поверхностью матриксов. Фиксация матриксов ГА уменьшает кол-во свободного бивалирудина, что, по-видимому, и приводит к некоторому повышению связывания тромбоцитов с поверхностью таких матриксов. Матриksы с бивалирудином и желатином, обработанные глутаровым альдегидом хоть и отличаются несколько более высоким связыванием тромбоцитов по сравнению с матриксами с нефиксированным бивалирудином, тем не менее, связывают не менее, чем в 4 раза меньше тромбоцитов, чем матриksы из чистого полиуретана. По-видимому, экспонированный на поверхности волокон бивалирудин тем не менее способен связывать и инактивировать тромбин и индуцируемые им реакции, в том числе активацию тромбоцитов.



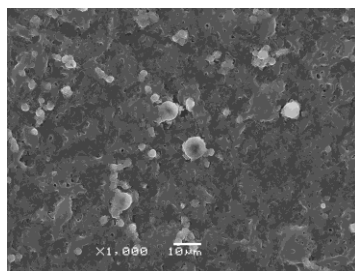
3% Тек



3% Тек + 15% Жл

3% Тек + 15% Жл +
1.5% Бив

3% Тек + 1.5% Бив



3% Тек + 15% Жл_ГА

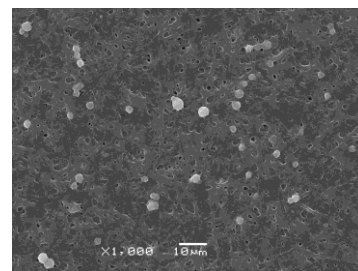
3% Тек+15%Жл+1.5%
Бив_ГА

Рисунок 12. Фотографии исследуемых матриц, полученные при помощи СЭМ (увеличение $\times 1000$), после их инкубации с тромбоцит-обогащенной плазмой

В клинической практике активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) является важным показателем, указывающим на изменение свертывания крови по «внутреннему» пути. Фибриноген является кофактором в агрегации тромбоцитов и предшественником фибрина, который участвует в тромбообразовании. Содержание фибриногена в крови *in vivo* повышается при возникновении острых воспалительных заболеваний, инсультов, инфарктов миокарда, гипотиреоза, амилоидоза, пневмонии и развитие злокачественных опухолей. Однако снижения уровня фибриногена в закрытой системе *in vitro* говорит об активации процессов тромбообразования. Оценка выше перечисленных параметров в крови определяет гемосовместимость биоматериалов в условиях *in vitro*. Из данных представленных в таблице 8 видно, что концентрация фибриногена в крови практически не зависит от химического состава матриц и варьируется в диапазоне от 1.98 до 2.27 г/л. Введение бивалирудина в состав матриц приводит к статистически значимому

увеличению времени коагуляции относительно контрольного образца. Следует отметить, что обработка глутаровым альдегидом матриц, содержащих бивалирудин, снижает значение АПТВ в крови и это значение сопоставимо со значением АПТВ крови без контакта с биоматериалами. Т.е. за уменьшение свертывания крови ответственен высвобождающийся из матриц бивалирудин.

Таблица 6. Показатели гемосовместимости 3Д матриц *in vitro*

Состав образца	Фибриноген, г/л *	АПТВ, сек *	Гемолиз, %	Количество тромбоцитов на 1 мм ² , × 10 ³ *
Контрольный образец крови	2.22 [2.18; 2.29]	29.2 [27.2; 34.8]	-	-
3% Тек	2.22 [2.19; 2.24]	29.1 [28.2; 34.4]	2.79 [2.36; 3.37]	15.67 [10.90; 20.25]
3% Тек + 1.5% Бив	2.27 [2.21; 2.32]	63.5 [58.3; 75.4]	3.76 [2.34; 4.88]	1.43 [1.31; 1.59]
3% Тек + 15% Жл	2.25 [2.24; 2.32]	31.1 [27.6; 35.0]	3.36 [2.22; 4.87]	17.72 [17.25; 18.81]
3% Тек + 15% Жл + 1.5% Бив	1.98 [1.96; 1.98]	126.7 [100.4; 133.4]	2.55 [2.27; 4.36]	2.23 [1.97; 2.41]
3% Тек + 15% Жл обработанный ГА	2.17 [2.15; 2.27]	28.5 [26.9; 33.9]	2.74 [1.94; 3.12]	5.74 [5.02; 6.06]
3% Тек + 15% Жл + 1.5% Бив обработанный ГА	2.27 [2.19; 2.27]	30.3 [28.0; 35.2]	3.13 [2.39; 4.93]	3.79 [2.69; 4.24]

Примечание: Данные представлены в виде медианы с межквартильным диапазоном. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Крускала – Уоллиса ANOVA. Значения вероятности $p < 0,05$ считались значимыми и помечены «*».

Контакт крови с поверхностью ПС может влиять на стабильность эритроцитов, поэтому определение гемолитической активности является необходимым этапом характеристики материалов, постоянно контактирующих с кровью. Свободный гемоглобин, высвобождающийся из эритроцитов с нарушенной мембраной и появляющийся в результате контакта крови с исследуемыми матриксами, был измерен с помощью спектрофотометрии. Из данных таблицы 6 видно, что состав матриц практически не влияет на стабильность эритроцитов. Показано, что обработка глутаровым альдегидом матриц с добавлением желатина и

комбинации биополимеров приводит к незначительному снижению скорости гемолиза относительно необработанных матриксов с аналогичным составом.

Резюме:

Обобщая результаты проведенных экспериментов, показано, что введение биополимеров (желатина и бивалирудина) в состав волокна в процессе электроспиннинга, приводит к модификации свойств поверхности ПС, что свидетельствует о влиянии как на гемосовместимость материала при непосредственном контакте с кровью, так и на его способность поддерживать адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток, повышая гемосовместимость материала в ближайшей и длительной перспективе.

Введение бивалирудина в состав матрикса на основе полиуретана с добавлением желатина приводит к улучшению его гемосовместимости. Наилучшими свойствами обладают материалы из 3% тес + 15% Жл + 1.5% Бив и обработанные ГА.

3.6 Сравнение механических свойств экспериментальных протезов сосудов и протезов сосудов из ПТФЭ

В таблице 7 приведены механические свойства ПС на основе 3%Тек с 15%Жл и 1,5%Бив и ПС из ПТФЭ. Согласно СЭМ все матрицы состояли из волокон диаметром около $1,81 \pm 0,31$ мкм и имели поры $2,28 \pm 0,92$ мкм (таб. 7; рис. 13, Панель 1).

Прочность на разрыв по продольной оси ПС Тек-Жел-Бив была близка к таковой у ПС из ПТФЭ (таб. 7). Однако ПС из Тек-Жел-Бив были почти в три раза более устойчивым к прорезыванию нитью ($470 \pm 35,0$ г против $170 \pm 5,7$ г для ПТФЭ).

Давление разрыва ПС Тек-Жел-Бив составило $19,6 \pm 0,4$ атм (14 896 мм рт. ст.). Это в 11 раз больше по сравнению ПС из ПТФЭ (таб. 7). Модуль Юнга ПС Тек-Жел-Бив был в четыре раза ниже, чем у ПС из ПТФЭ (0,84 против 3,98 МПа).

Податливость (комплаинс) ПС была исследована в пульсирующем потоке физиологического раствора с перепадом давления 120/80 мм рт.ст. с мониторингом (измерением) изменения диаметра ПС. Брюшная артерия крысы при таком перепаде давления меняет свой диаметр на 13–17% (рис. 13,

панель 2А). С (комплаинс) = $29,9 \pm 0,13\% / \text{мм рт.ст.}^{-1} \times 10^{-2}$. ПС Тек-Жел-Бив примерно в два раза менее податливы и изменяют свой диаметр на 6–8% (Рисунок 13, Панель 2С). С (комплаинс) = $18,6 \pm 0,11\% / \text{мм рт.ст.}^{-1} \times 10^{-2}$. ПС из е-PTFE практически никак не изменяли свой диаметр при перепаде давления 120/80 мм рт.ст. (Рис. 13, панель 2В).

Таблица 7. Физико-химические свойства исследуемых ПС

Вид протеза сосуда	Угол смачивания поверхности, °	Сила разрыва (продольно), МПа	Сила прорезывания шва, г	Модуль Юнга, (МПа)	Давление разрыва (мм рт. ст.)	Податливость (комплаинс) $\% / \text{мм рт. ст.}^{-1} \times 10^{-2}$
Тек+Жел+Бив	87.10 ± 2.20	15.60 ± 0.80	470.00 ± 35.00	0.84 ± 0.20	14896 ± 304	18.6 ± 0.11
ПТФЭ	125.00 ± 3.10	16.00 ± 0.90	170.00 ± 5.70	3.98 ± 0.37	1327 ± 289	3.26 ± 0.08
р	0,005	0,37	0,005	0,005	0,005	0,005

*среднее $\pm$ стандартное отклонение

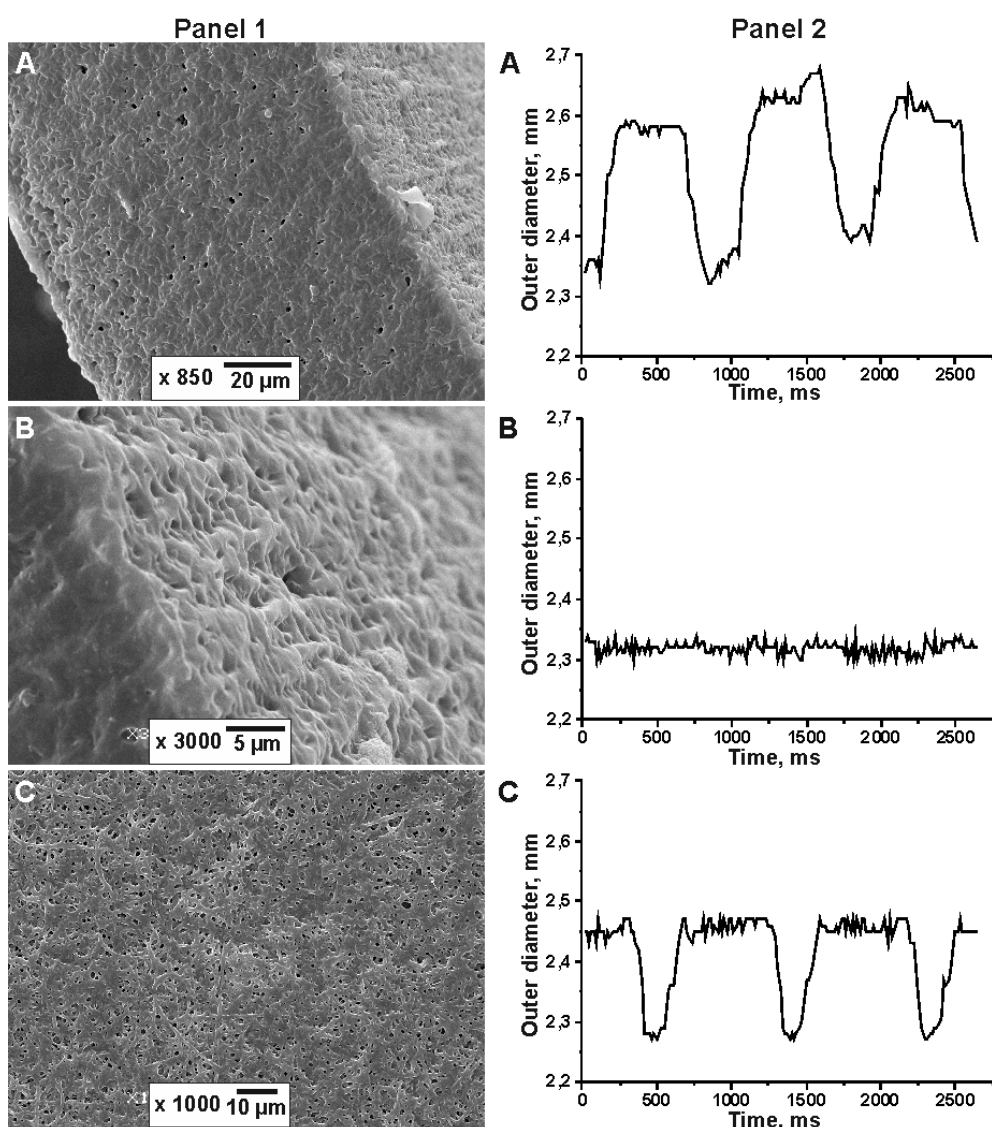


Рисунок 13. Панель 1. СЭМ исследуемого протеза сосуда (ПС) из полимерной смеси, изготовленного методом электроспиннинга: (А) поперечное сечение

стенки; (В) вид сбоку внутренней поверхности ПС; (С) перпендикулярный вид внутренней поверхности ПС. Панель 2. Сравнение податливости ПС. Изменение внешнего диаметра ПС и брюшной аорты крысы контролировали в пульсирующем потоке жидкости с перепадом давления 120/80 мм рт.ст. : (А) брюшная аорта крысы; (В) e-PTFE; (С) ПС из полимерной смеси. Ось Х, время, мс и ось Y, внешний диаметр ПС, мм.

3.7 Экспериментальная часть *in vivo*

3.7.1 Интраоперационные показатели

Имплантация экспериментальных протезов была выполнена 36 самцам крыс линии wistar, имеющих spf-статус. Для двух типов ПС (экспериментального, изготовленных в рамках исследования и контрольного из ПТФЭ) были сформированы две группы наблюдения. Первой группе животных была выполнена имплантация протезов из ПУ Тек с Жл и Бив во внутреннем слое, обработанных с помощью 2% раствора глутарового альдегида; второй группе - были имплантированы протезы из ПТФЭ (Экофлон™, Россия). Животные в группах наблюдения не отличались по весу, полу и возрасту. Группы были полностью сопоставимы по количеству Ксилазина и Золетила, используемых для инъекционного наркоза. Диаметр аорты крыс в двух группах интраоперационно составил от 1,7 до 2,1 мм (медиана 2,0 мм, интерквартильный размах [1,9; 2,0]). Внутренний диаметр полученных протезов сосудов составлял от 2,0 мм до 2,2 мм (медиана 2,1 мм, интерквартильный размах [2,0; 2,2]), и хорошо соответствовал диаметру инфраренального отдела брюшной аорты крыс. Длина имплантированного протеза (в зависимости от анатомической особенности животного) составила от 15 до 20 мм (медиана 20 мм, интерквартильный размах [18,0; 20,0]) и в группах статистически значимо не отличались (см таб. 8).

Интраоперационная оценка качества изготовленных протезов показала их хорошую устойчивость к разволокнению при отрезании части ножницами, высокую 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.

Таблица 8. Характеристика животных по морфологическим показателям и количеству введенных наркотических препаратов.

Показатель	Группа Тек-Жл-Бив, n=18	Группа ПТФЭ, n=18	P
Вес (г)	498,9±50,6/ 481,0[470; 510]	498,7±40,2/ 491,5 [472;510]	0,59
Мужской пол, n (%)	18 (100)	18 (100)	1,00
Возраст (мес)	6,7±0,5/ 7,0[6,0; 7,0]	6,8±0,4/ 7,0[7,0; 7,0]	0,38
Кол-во Золетила для наркоза (мг)	10,0±1,0/ 9,6[9,4; 10,2]	10,0±0,8/ 9,8[9,4; 10,2]	0,60
Кол-во Ксилазина для наркоза (мг)	2,0±0,2/ 1,9[1,8; 2,0]	2,0±0,2/ 1,9[1,8; 2,0]	0,59
Диаметр аорты крысы (мм)	1,9±0,1/ 1,9[1,8; 2,0]	2,0±0,1/ 2,0[1,9; 2,1]	0,30
Внутренний диаметр протеза (мм)	2,1±0,1/ 2,1[2,1; 2,1]	2,0±0,03/ 2,0[2,0; 2,0]	0,1
Длина имплантируемого участка (мм)	18,8±1,6/ 20,0[18,0; 20,0]	19,0±1,5/ 20,0[18,0; 20,0]	0,89

Примечание: в таблице количественные данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение / медиана [интерквартильный размах].

После запуска кровотока по имплантированному протезу, не наблюдалось пропитывания кровью стенки протеза ни в одной группе (рис. 14). В группе протезов из ПТФЭ время местного гемостаза (время от снятия зажимов с аорты до прекращения кровотечения из области анастомозов и отверстий после проколов иглой) варьировало от 20,0 до 28,0 мин (медиана 24,5 мин, интерквартильный размах [23,0; 25,0]), в группе протезов из Тек-Жл-Бив - от 14,0 до 20,0 мин (медиана 18,5, интерквартильный размах [17,0; 20,0]). Различные показатели времени хирургического гемостаза связаны с разными механическими и эластическими свойствами протезов. Протезы из ПТФЭ оказались наиболее жесткими, по сравнению с исследуемыми.

А

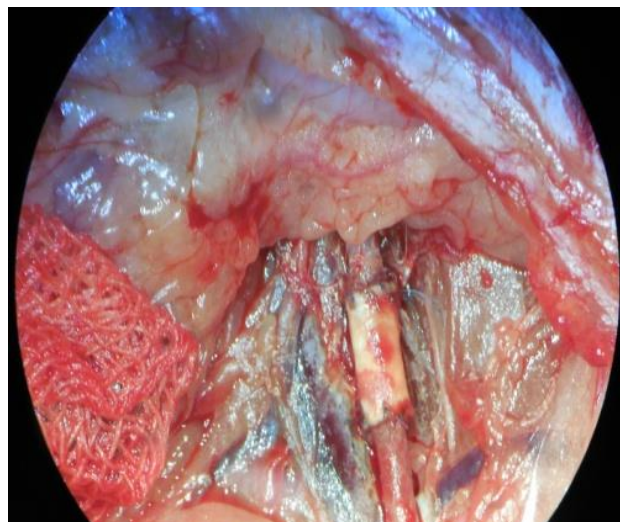


Рисунок 14. Внешний вид ПС непосредственно после имплантации в инфраренальный сегмент брюшной аорты крысы: ПС из Тек-Жл-Бив (А); протез из ПТФЭ (Б). Микроскоп Carl ZEISS OPMI Pico, увеличение x 6.

Это приводило к меньшей коаптации между краями протеза и аорты, а также с более длительным кровотечением из мест вколов. Различное время хирургического гемостаза влияло и на длительность операции соответственно. Данные представлены в таб. 9.

Таблица 9. Время операции, окклюзии аорты и хирургического гемостаза в группах

Показатель	Группа Тек-Жл-Бив, n=18	Группа ПТФЭ, n=18	p
Общее время операции (минут)	101,27 ± 4,28/ 101[95;110]	106,89 ± 3,77/ 108[98;113]	0,0004
Время окклюзии аорты (минут)	40,77 ± 1,93/ 40[37;45]	40,77 ± 1,95/ 40[40;42]	1,0000
Время гемостаза (минут)	18,11 ± 1,81/ 18,5(14,0;20,0)	24,16 ± 2,09/ 24,5[20;28]	0,0000

Примечание: в таблице представлено среднее значение ± стандартное отклонение / медиана [интерквартильный размах].

В условии пульсирующего кровотока отмечалась хорошая растяжимость протезов, в поперечных направлениях соответствуя фазе систолического давления в аорте и возвращение в исходное состояние в фазу диастолы.

3.7.2 Проходимость протезов сосудов

В послеоперационном периоде не наблюдалось диастаза, нагноений или других осложнений послеоперационной раны, окружающих тканей и самих протезов. На 1-й неделе, у 3 животных с имплантированным протезом из ПТФЭ произошел острый тромбоз протеза с развитием клиники острой ишемии задних конечностей, подтвержденных результатами УЗИ и вскрытия после эвтаназии (на 3, 4 и 5 сутки соответственно). При этом у животных с имплантированными протезами из Тек-Жл-Бив случаев ранних тромбозов не наблюдалось. Так же не наблюдалось значимых стенозов в области анастомозов или протезов.

На 12 недельном сроке наблюдения, у 2 животных с имплантированным протезом из ПТФЭ произошла окклюзия протеза с развитием клиники острой ишемии задних конечностей, подтвержденных результатами УЗИ и вскрытия после эвтаназии (на 41 и 65 сутки соответственно). У оставшихся животных из этой группы максимальная степень стеноза в протезах составила 60-70%. При этом у животных с имплантированными протезами из Tescoflex, случаев окклюзии протезов и гиперплазии неоинтимы не наблюдалось. Однако в этой группе одно животное погибло на 80 сутки вследствие разрыва аневризмы проксимального анастомоза, что, возможно, связано с дефектом хирургической техники при формировании анастомоза, ведь других случаев формирования аневризм выявлено не было.

На 24 недельном сроке наблюдения летальных исходов не было, однако во всех группах по данным УЗИ было зафиксировано по одному случаю окклюзии протеза (без развития клиники острой ишемии задних конечностей), что было подтверждено результатами осмотра и обзорной микроскопии, а также данными гистологического исследования, проведенного после эксплантации протезов. Характерные УЗ-картины исследуемых протезов на разных сроках наблюдения представлены на рис. 15.

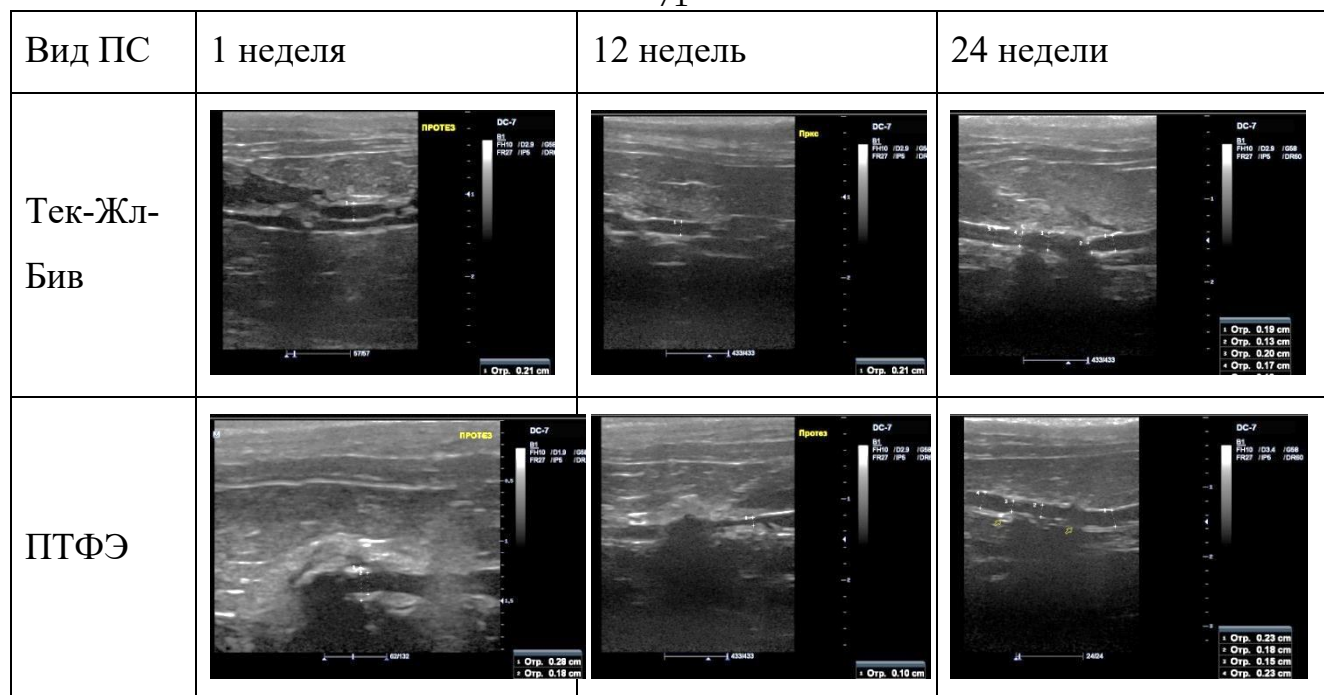


Рисунок 15. УЗИ инфраренального отдела аорты крысы с имплантированным ПС из Тек-Жл-Бив и ПТФЭ на разных сроках наблюдения.

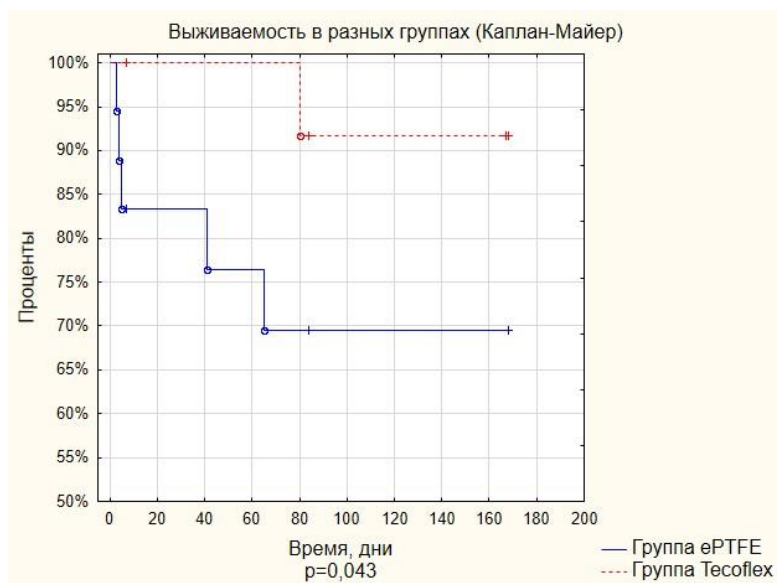
Данные выживаемости животных и причины смерти представлены в таблице 10.

Таблица 10. Значимые события в исследуемых группах за весь период наблюдения

Показатель	Группа Тек-Жл-Бив, n=18	Группа ПТФЭ, n=18	p
Смертность, n(%)	1 (5,5)	5 (27,7)	0,0887
Аневризма анастомоза, n(%)	1 (5,5)	0 (0,0)	0,89
Окклюзия протеза, n(%) из них:	1 (5,5)	6 (33,3)	0,0438
Ранняя окклюзия (срок до 7 сут), n(%)	0 (0,0)	3 (16,7)	0,228
Отсроченная окклюзия (срок более 7 сут), n(%)	1 (8,3)	3 (25,0)	0,2950

Таким образом, свобода от окклюзии ПС за весь период наблюдения составила: для ПС из группы Тек-Жл-Бив 94,5%; для ПС из группы ПТФЭ - 66,6% ($p=0,0438$). Кривые выживаемости животных, а также свободы от окклюзии трансплантантов (Каплан-Майер) представлены на рисунке 16.

А



Б

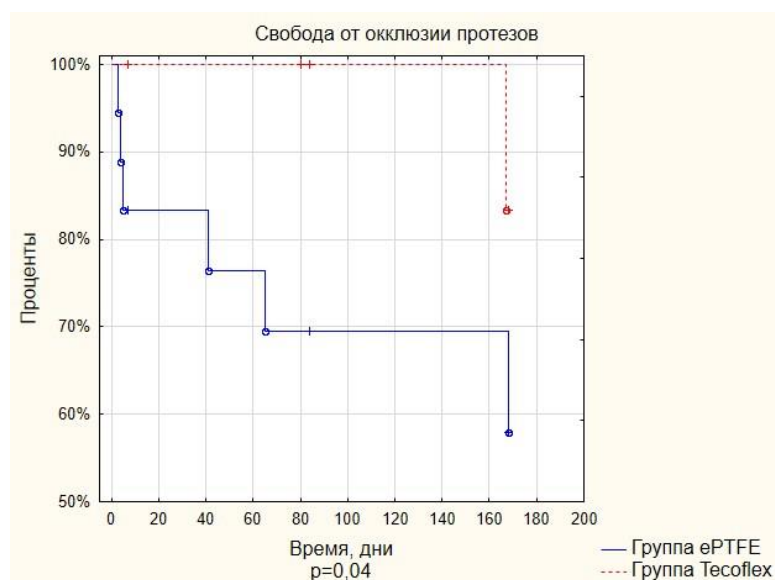


Рисунок 16. Кривые выживаемости (А) и свободы от окклюзии ПС (Б) Каплан-Майер в исследуемых группах

3.7.3 Исследования протезов сосудов на разных сроках наблюдения и обзорная микроскопия

Внешний вид протезов во время эксплантации на разных сроках наблюдения представлен на рис. 17. На 24 неделе наблюдения была выявлена некоторая деформация стенки протеза из ПТФЭ, возможно вызванная процессами кальциноза с плотным срастанием протеза с окружающими тканями. При этом у ПС из Тек-Жл-Бив подобных признаков не было выявлено. Во всех группах не было обнаружено признаков инфицирования

или воспаления, гематом, как в зоне самого трансплантата, так и окружающих его тканей.

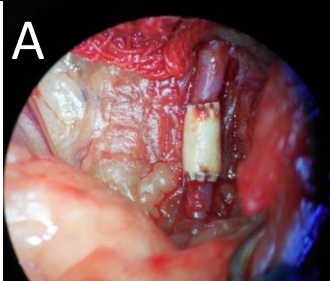
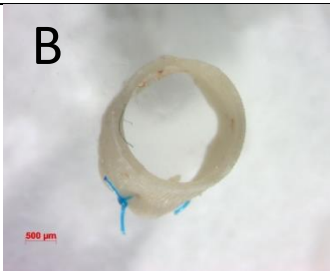
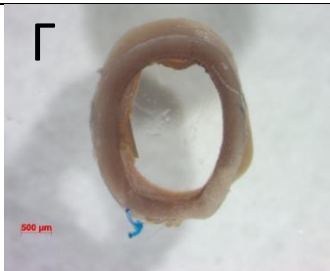
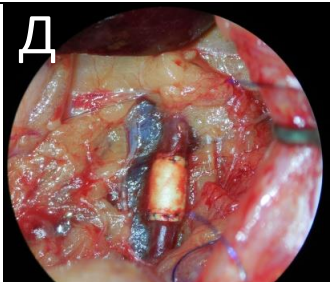
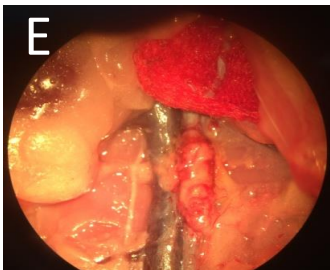
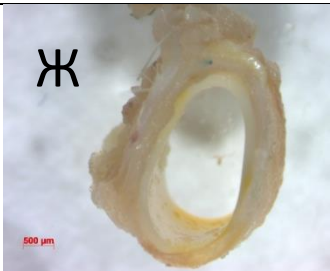
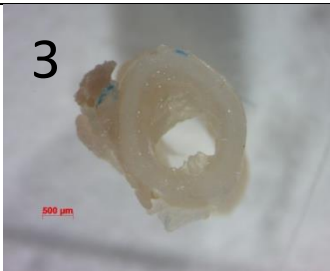
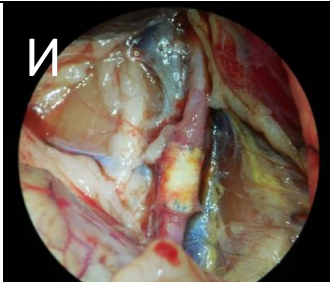
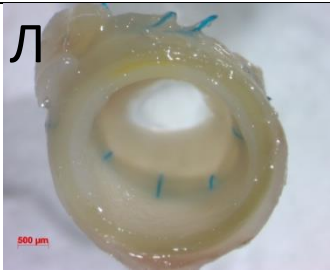
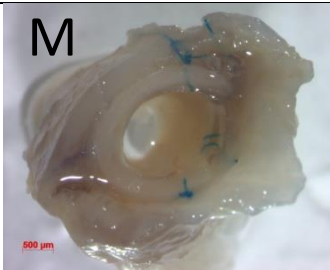
	ТекЖЛБив	ПТФЭ
1 неделя	А 	Б 
	В 	Г 
12 недель	Д 	Е 
	Ж 	З 
24 недели	И 	К 
	Л 	М 

Рисунок 17. Внешний вид протезов на разных сроках наблюдения. А, Б, Д, Е, И, К – обзорная микроскопия (хирургический микроскоп ОРМІ Рісо, увеличение $\times 6$); В, Г, Ж, З, Л, М – обзорная микроскопия поперечных срезов эксплантированных протезов (микроскоп Stereo Discovery V 12, масштабная линейка = 500 мкм).

По данным обзорной микроскопии поперечных срезов ПС и УЗИ-исследования (Рис. 17 и таб. 11) видно, что в обоих исследуемых группах имеется тенденция к увеличению толщины неоинтимального слоя с течением времени. Для протезов из ПТФЭ эти процессы выражены в большей степени. При этом, при межгрупповом сравнении, статистически значимой разницы толщины неоинтимального слоя в различных протезах на всех сроках наблюдения, получено не было. Однако прижизненное УЗ-исследование области оперативного вмешательства показало статистически значимое увеличение скорости кровотока в группе ПТФЭ по сравнению с группой Тек-Жл-Бив на 12-й и 24-й неделе (таб. 11). При этом скоростные характеристики в области операции группы Тек-Жл-Бив значимо не отличались от группы животных без оперативного вмешательства, которым дополнительно было выполнено УЗИ. Отдельно можно отметить диффузное пропитывание стенок протезов из ПТФЭ эритроцитами, наблюдаемое уже на 1-й неделе после имплантации. Так же в этой группе отмечается более выраженное нарастание неоадвентициального слоя, особенно спустя 24 недели после имплантации.

Таблица 11. Скорость кровотока в протезе по данным прижизненного УЗИ исследования и толщина неоинтимы эксплантированных протезов по данным обзорной микроскопии на разных сроках наблюдения.

Вид протеза	1 неделя		12 недель		24 недели	
	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с	Толщина неоинтимы, мкм	Скорость кровотока, м/с
Тек-Жл-Бив	5,18 $\pm$ 2,26	0,93 $\pm$ 0,10	31,29 $\pm$ 8,32	1,03 $\pm$ 0,18	47,71 $\pm$ 7,46	1,16 $\pm$ 0,09
ПТФЭ	6,29 $\pm$ 3,32	1,07 $\pm$ 0,11	44,57 $\pm$ 14,84	1,72 $\pm$ 0,1	59,86 $\pm$ 12,22	1,74 $\pm$ 0,08
p	0,532	0,401	0,378	0,014	0,128	0,012

3.7.4 Гистологическое исследование эксплантированных протезов

Из данных гистологического исследования (рис. 18) видно, что после первой недели имплантации на внутренней поверхности части протезов, как Тек-Жл-Бив, так и ПТФЭ отмечалось формирование фибринозно-эритроцитарных тромбов.

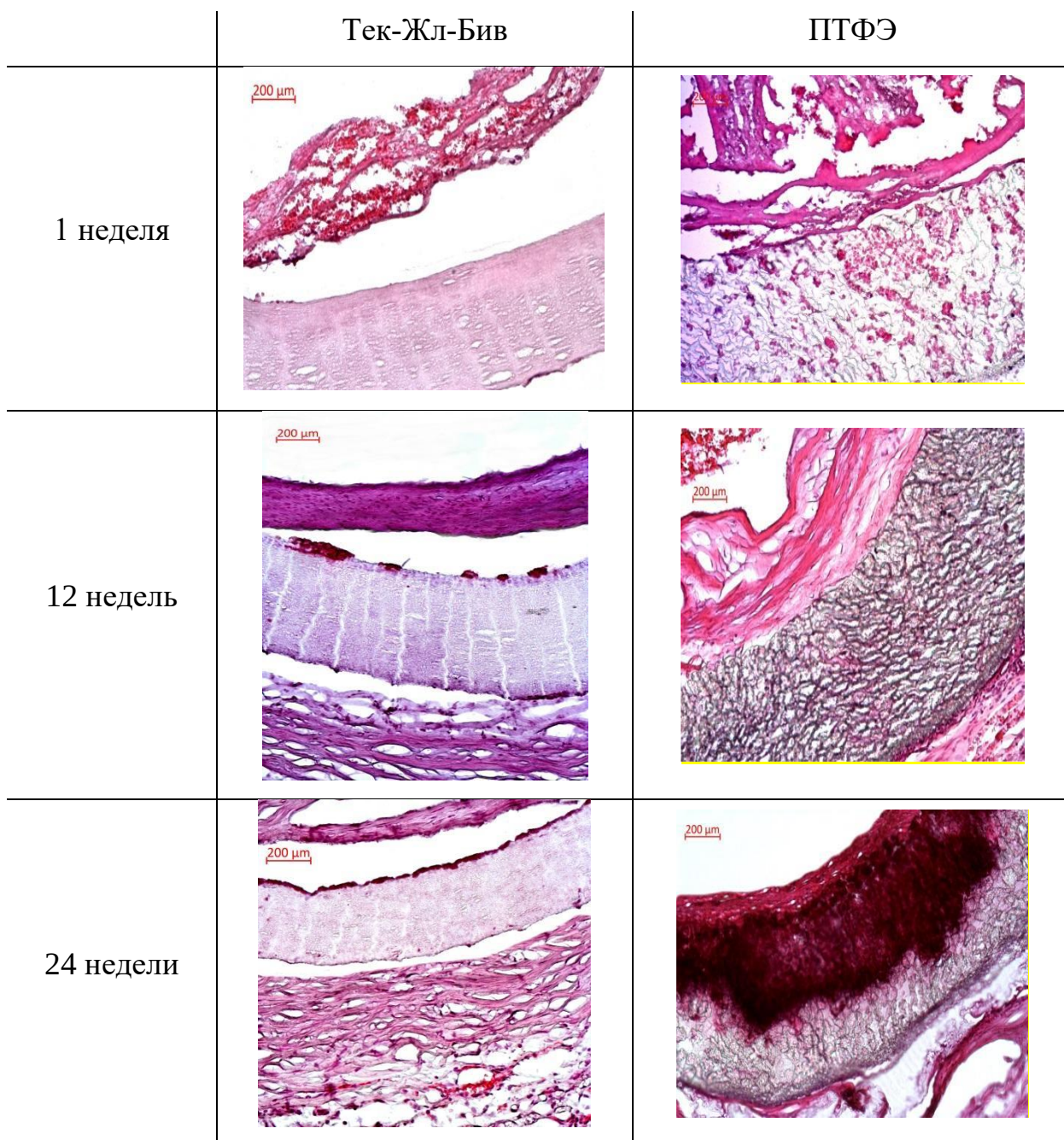


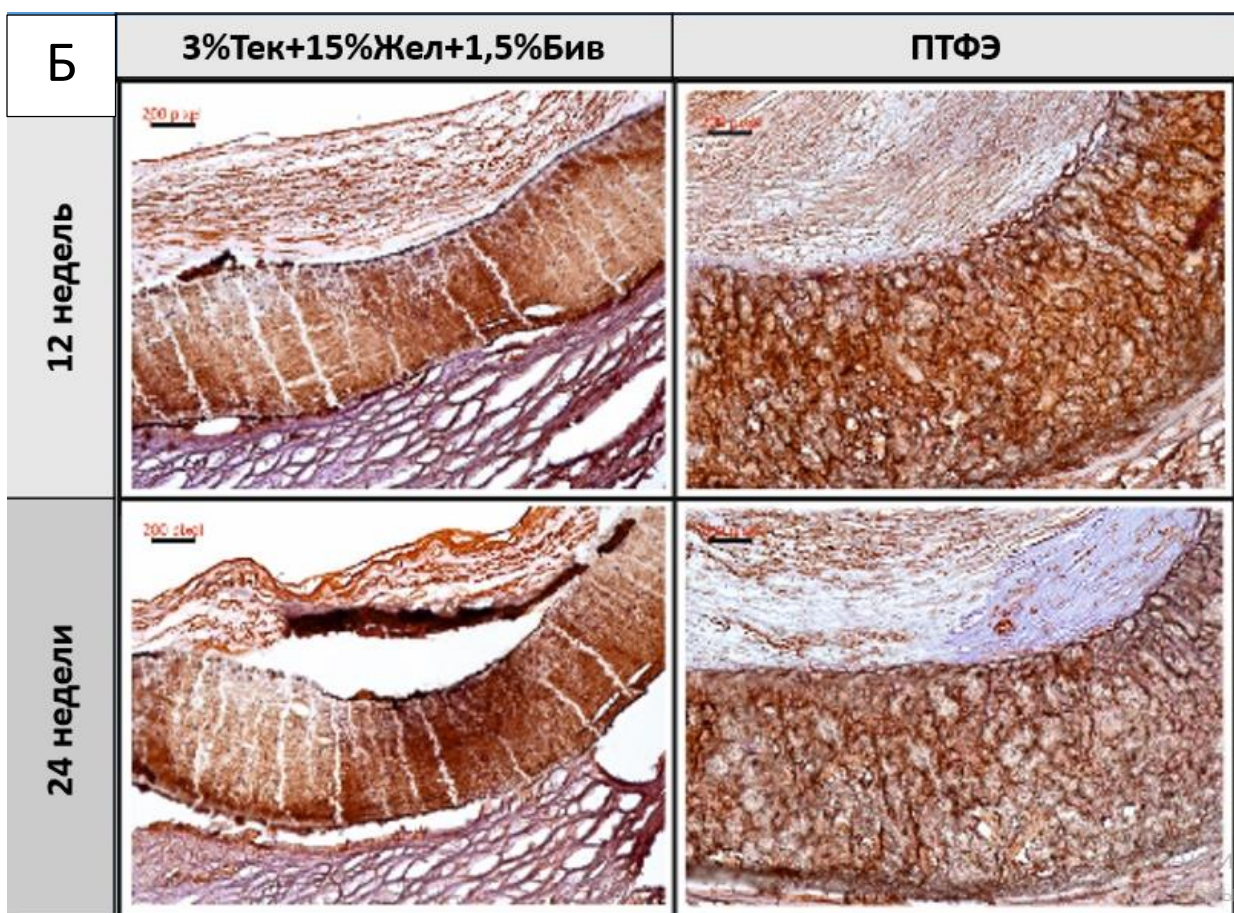
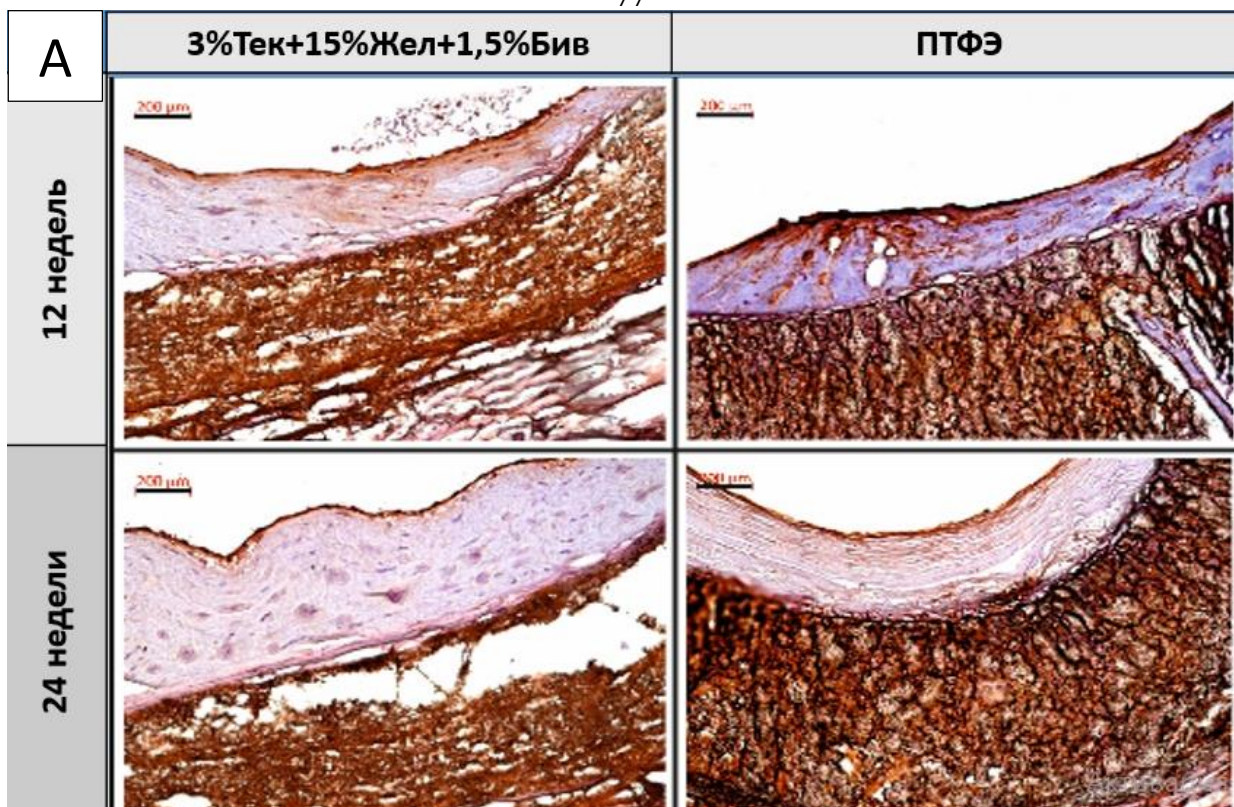
Рисунок 18. Микроскопия поперечных срезов протезов сосудов на разных сроках наблюдения. Окраска гематоксилин-эозин. Световой микроскоп AxioCam Erc5s с программным пакетом ZEN 2.3. Увеличение x200.

При этом в протезах из ПТФЭ такие тромбы занимают больший объем и характеризуются более рыхлой структурой (это может быть связано с тем,

что эти протезы менее податливы). В протезах ПТФЭ отмечается набухание и диффузная инфильтрация стенки протеза эритроцитами. Стенка протезов Тек-Жл-Бив сохраняла свою целостность и строение. Признаков формирования неоинтимального и адвентициального слоя в этот период не наблюдается (рис. 18). Во всех протезах на 3-м и 6-м месяце имплантации наблюдается формирование неоинтимального слоя, который соответствует в целом нормальному строению интимы сосуда (рис. 18, 19). Это подтверждалось наличием эндотелиальной выстилки, в которой обнаружена положительная экспрессия фактора 8 (рис. 19А), наличие коллагена 4 типа как в пределах базальной мембраны, так и в толще сформированной интимы (рис. 19Б). При этом экспрессии α -SMA в сформированной неоинтимае обнаружено не было (рис. 19В).

В стенках ПС отмечалась преимущественно «пылевидная» кальцификация (рис. 18) различной степени выраженности. Интенсивность накопления кальция отличается как между типами ПС, так и между ПС, имплантированными на разные сроки. Так, в ПС эксплантированных на 7 суток не было обнаружено очагов кальцификации ни в одном из типов ПС. Протезы сосудов из ПТФЭ, эксплантированные спустя 12 недель, содержат в 10 раз больше кальцификатов, чем ПС из Тек-Жл-Бив, имплантированные на тот же срок (таб. 12). Спустя 24 недели после имплантации ПС из ПТФЭ существенно сильнее кальцифицируются – площадь кальцифицированных участков выше в 4,5 раза чем в ПС из Тек-Жл-Бив (таб. 12, рис. 18).

Площадь кальцифицированных участков возрастает приблизительно в 4 раза в группе Тек-Жл-Бив и в 2 раза в группе ПТФЭ в период между 12 и 24 неделями после имплантации ПС.



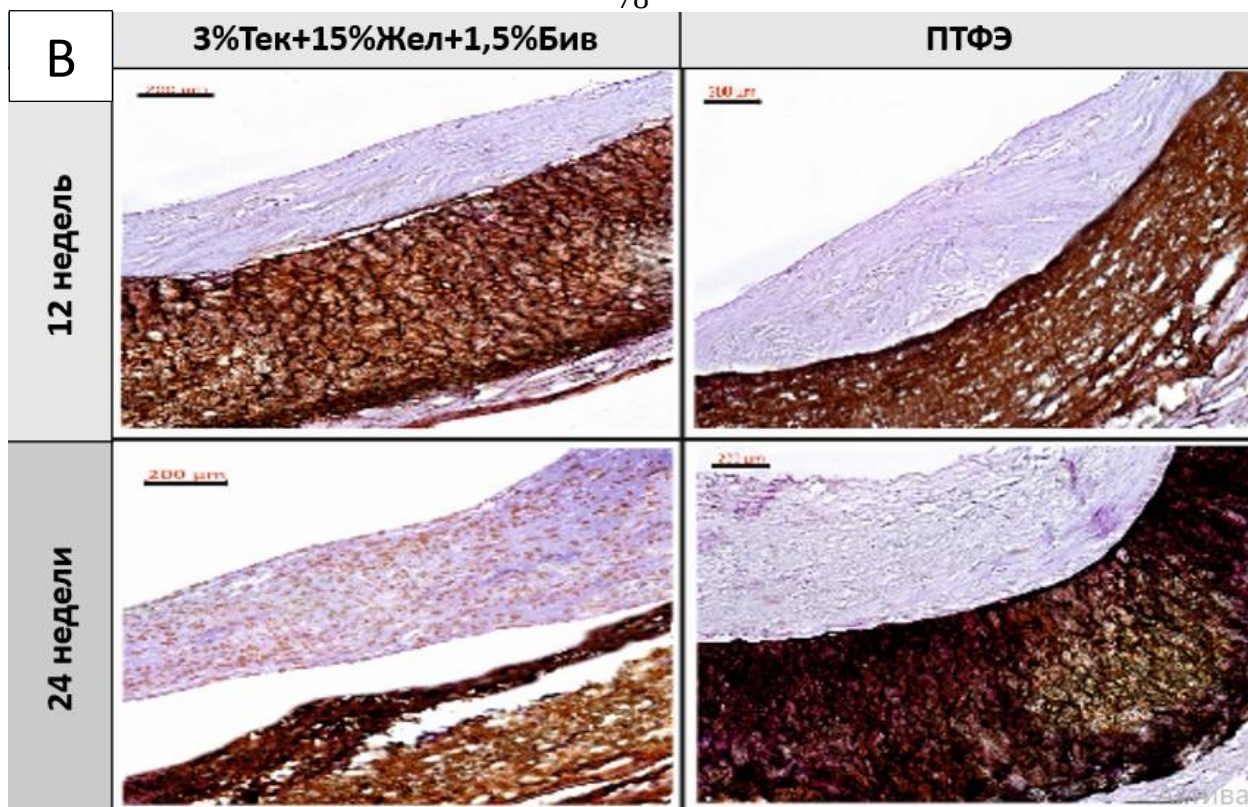


Рисунок 19. Иммуногистохимическое исследование протезов сосудов на больших сроках наблюдения. ИГХ окраска с антителами к Фактору VIII (А), к Коллагену IV типа (Б) и к α -SMA (В). Световой микроскоп AxioCam Erc5s с программным пакетом ZEN 2.3. Увеличение x200.

Таблица 12. Процент кальциноза стенок ПС

Вид протеза	12 недель	24 недели	p(12, 24)
Тек-Жл-Бив	0,6 [0,30; 1,10]	2,85 [1,10; 5,20]	0,028
ПТФЭ	6,55 [5,80; 6,60]	13,65 [12,20; 15,50]	0,027
p	0,005	0,005	

*Сравнение по горизонтали p (12, 24) - сравнение показателей внутри одной группы на 12 и 24 неделе наблюдения;

В неоадвентициальном слое всех ПС отмечалось формирование фиброзной ткани различной плотности, с наличием сосудов синусоидного (капиллярного) типа и очаговой мононуклеарной инфильтрацией (рис. 18).

Анализ клеточного состава стенок эксплантированных ПС выявил статистически достоверную большую клеточную плотность в стенках ПС из

ПТФЭ, по сравнению с ПС из Тек-Жл-Бив, как после 12, так и после 24 недель функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс (таблица 13). Наблюдаемые различия могут быть объяснены повышенной проницаемостью ПС из ПТФЭ для крови и её форменных элементов, что подтверждается также и повышенной их эритроцитарной инфильтрацией на 1 неделе эксплантации (рис. 18).

Морфометрическое исследование новообразованной интимы и стенок ПС выявило ряд отличий между контрольными и исследуемыми протезами. На 12 неделях наблюдения плотность клеток в неоинтима ПС из Тек-Жл-Бив в 1.5 раза выше, чем в ПС из ПТФЭ. На 24 недели наблюдения эта разница несколько сокращается, однако общая тенденция остается прежней. Клеточный состав интимы ПС представлен как небольшими веретенообразными клетками с различными цитоплазматическими отростками, так и клетками с мелкими мономорфными ядрами и слабо выраженной цитоплазмой (рис. 18, табл. 13). Экспрессия эндотелиального маркера Фактор VIII более ярко и плотно выражена на поверхности неоэндотелиального слоя в протезах Тек-Жл-Бив, в то время как в ПС из ПТФЭ отмечается его более «рыхлое», диффузное распределение. Экспрессия коллагена IV типа присутствует во всех типах ПС, но в группе Тек-Жл-Бив сконцентрирована более плотно, сразу под неоэндотелиальным слоем, в отличие от протезов из ПТФЭ, где распределение более диффузное по всей толще неоинтимы. Экспрессия гладкомышечного актина (α -SMA) в неоинтима обоих типов ПС практически отсутствует.

Таблица 13. Количество клеток в неоинтимальном слое и толщине стенок ПС

Вид протеза	Количество клеток в неоинтимальном слое			Количество клеток в толщине стенок		
	12 недель	24 недели	Р (12,24)	12 недель	24 недели	Р (12,24)
Тек-Жл-Бив	157.00 [113.00; 180.00]	33.00 [15.00; 41.00]	0.021	1.00 [1.00; 2.00]	2.00 [1.00; 5.00]	0.109
ПТФЭ	100.00 [88.00; 107.00]	26.00 [19.00; 34.00]	0.028	16.00 [12.00; 23.00]	17.00 [4.00; 30.00]	0.916
Р	0.05	0.32		0.005	0.031	

*Сравнение по горизонтали Р (12, 24) - сравнение показателей внутри одной группы на 12 и 24 неделе наблюдения.

3.7.5 Исследование биodeградации эксплантированных протезов сосудов

После подготовки образцов, как указано в пункте 2.3.22, была проведена ИК-спектроскопии для анализа окислительной и гидролитической деградации полиуретанов в организме животных. Основные полосы поглощения в ИК-спектре, которые используются для оценки биостабильности полиуретанов - 1730 см^{-1} (nonhydrogen-bonded urethane carbonyl (NH-CO-O-)), 1703 см^{-1} (nonhydrogen-bonded urethane carbonyl (NH-CO-O-)), 1220 см^{-1} (urethane C-N, Amide III), 1110 см^{-1} (ether C-O-C в мягком сегменте), 1075 см^{-1} (urethane ether C-O-C). Окисление мягких блоков отражается на изменении интенсивности полосы поглощения 1110 см^{-1} , а процессы гидролиза уретановых связей на изменении интенсивности полос поглощения при 1220 , 1075 , 1703 и 1730 см^{-1} [129]. Для сравнительного анализа деградации полиуретанов методом ИК-спектроскопии используют соотношение интенсивностей полос поглощения (табл. 14). Следует отметить, что в ИК-спектрах полиуретанов, эксплантированных из крыс, не было отмечено появление новых полос поглощения по сравнению с контрольными образцами.

Таблица 14. Зависимость соотношения интенсивностей полос поглощения в ИК-Фурье спектрах полиуретана Tecofex-80A™, от времени функционирования протезов сосудов, в инфракрасной позиции.

Длительность эксплантации	I_{1703}/I_{1730}	I_{1110}/I_{1220}	I_{1075}/I_{1220}	I_{1110}/I_{1075}
контроль	0.84 ± 0.03	2.86 ± 0.21	0.75 ± 0.06	3.81 ± 0.12
1 неделя	0.87 ± 0.05	2.38 ± 0.19	0.88 ± 0.07	2.70 ± 0.16
12 недель	0.77 ± 0.03	2.10 ± 0.17	0.80 ± 0.07	2.63 ± 0.14
24 недели	0.85 ± 0.04	2.28 ± 0.17	0.80 ± 0.05	2.90 ± 0.10

Как видно из представленных данных, для Tecoflex-80A™ наблюдается уменьшение соотношений интенсивностей поглощения I_{1110}/I_{1220} и I_{1110}/I_{1075} при увеличении продолжительности нахождения в организме крысы. Это говорит о незначительной окислительной деградации

полиуретана. На незначительный гидролиз уретановых связей в Tescoflex-80A™ указывает изменением соотношений интенсивностей полос поглощения I1075/I1220 ИК-спектрах.

Молекулярно-массовые характеристики полиуретанов, выделенных из матриксов до и после имплантации, приведены в табл. 15. Молекулярная масса Tescoflex-80A™ уменьшилась незначительно, что говорит о слабой деградации полиуретана, и при этом не наблюдалась корреляция между молекулярной массой и продолжительностью нахождения сосуда в организме крысы. Индекс полидисперсности при этом увеличивался, что указывает на протекание процесса гидролиза по закону случая.

Таблица 15. Молекулярно-массовые характеристики (среднечисленная M_n , среднемассовая M_w молекулярная масса, индекс полидисперсности n) полиуретана Тес-80А, выделенного из протезов сосудов, эксплантированных из крыс на разных сроках наблюдения

№	Время имплантации	M_n , kDa	M_w , kDa	n
1	0 (контроль)	102 ± 2.4	152 ± 3.6	1.49 ± 0.02
2	1 неделя	90 ± 1.7	137 ± 2.5	1.52 ± 0.04
3	12 недель	81 ± 3.3	130 ± 4.9	1.60 ± 0.02
4	24 недели	91 ± 3.2	138 ± 4.7	2.13 ± 0.01

*Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение

Для того, чтобы оценить влияние времени имплантации и изменения молекулярной массы Tescoflex-80A™ на прочность была измерена прочность эксплантированных ПС. Из табл. 16 и рис. 20 следует, что прочность ПС падает приблизительно на 28% после 3-х месяцев функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс. Однако к 6 месяца прочность ПС восстанавливается и даже на 14% превышает прочность исходных протезов. При этом все ПС имеют приблизительно одинаковое относительное удлинение при разрыве, ПС после 3-х мес практически не отличаются по «жесткости/эластичности» от исходных ПС, в то время как после 6 мес ПС становится более жестким и прочным. Вполне вероятно, что на начальном

периоде (3 мес) происходит нарушение контактов между волокнами полимера (жесткость – близкая к исходной), а после 6 мес протез прорастает *de novo* синтезированной тканью, которая уменьшает подвижность волокон относительно друг друга, повышает прочность и жесткость стенки ПС.

Таблица 16. Зависимость прочности ПС на основе Tescoflex-80A™ от времени функционирования в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс

Время имплантации	Прочность на разрыв (МПа)	% удлинения до разрыва
исходный	$6.6 \pm 0,64$	$308 \pm 9,3$
3 месяца	$4.76 \pm 0,71$	$304 \pm 10,2$
6 месяцев	$7.65 \pm 0,68$	$290 \pm 12,5$

*Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение

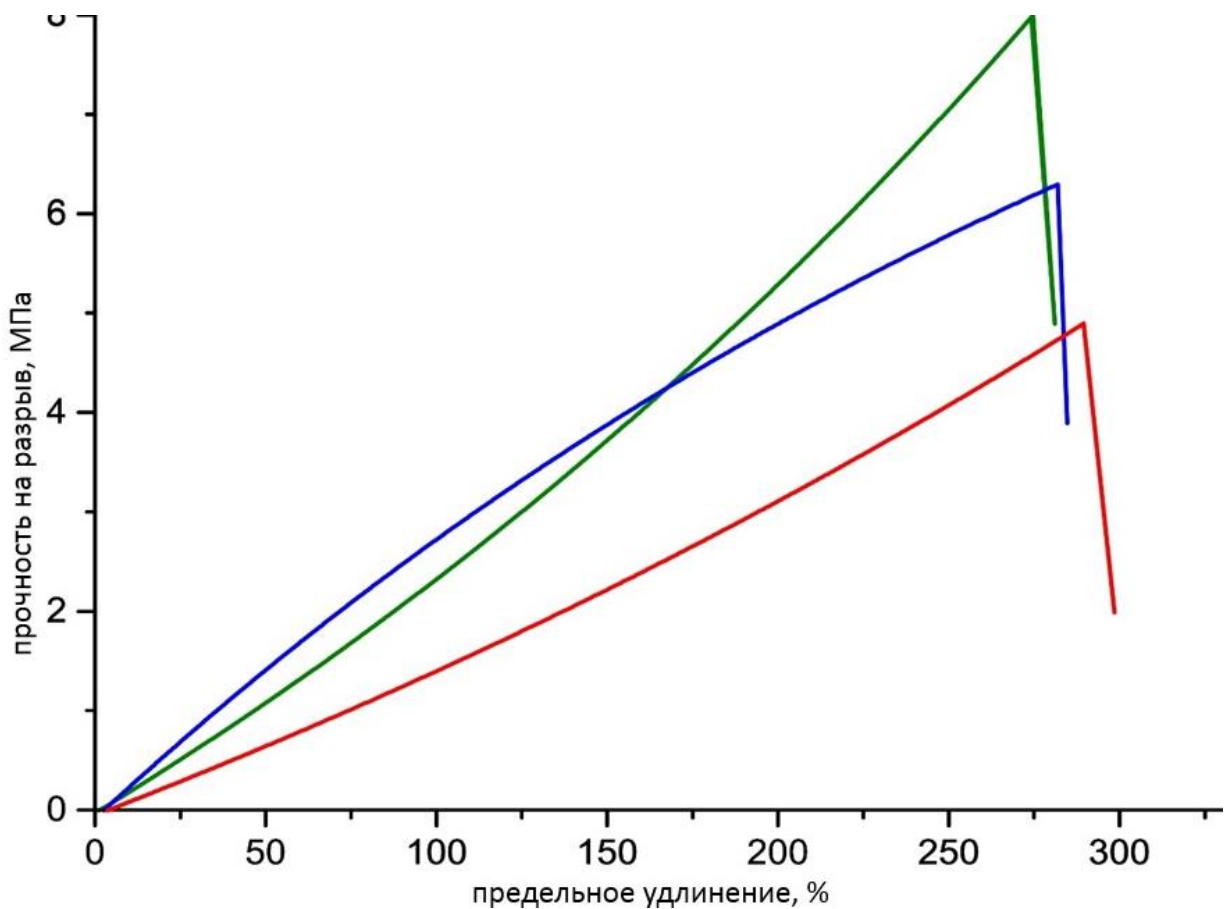


Рисунок 20. Типичные диаграммы растяжения ПС из ПУ Tescoflex-80A™ на разных сроках наблюдения. Голубая линия – контроль; Красная линия – 3 месяца; Зеленая линия – 6 месяцев.

Резюме

Проведенные исследования показали, что молекулы ПУ Tescoflex-80A™ демонстрируют незначительное снижение их средней молекулярной массы через 3 месяца после имплантации. Однако эти изменения не влияют на прочность и растяжимость ПС. Таким образом, ПС из полиуретана Tescoflex-80A™ с желатином и бивалирудином во внутреннем слое являются биостабильными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной литературе описано много вариантов изготовления ПС методом электроспиннинга из синтетических полимеров. В качестве полимеров были использованы как более-менее стабильные (например, биостабильные полиуретаны [20, 166-168]), так и биodeградируемые полимеры, такие как поликапролактон [58, 169-171], полилактид-ко-гликолид [111, 172], триметилкарбонат [173, 174]. Наряду с этим предпринимались попытки модифицировать ПС добавлением факторов роста эндотелия [175-182], факторами, которые способствовали бы клеточной адгезии [183-190], лекарственными средствами [191, 192], и т.д. Для улучшения биомеханики были предложены многослойные ПС [193, 194]. Например, ранее разработанные тканеинженерные ПС из поликапролактона с добавлением желатина и малопроницаемым внутренним слоем в эксперименте показали хорошие механические свойства и биосовместимость [195, 196]. Однако отсутствуют данные по биостабильности таких протезов в отдаленном послеоперационном периоде, ведь поликапролактон является биodeградируемым полимером, с периодом деградации около 0,5-2-х лет [197, 198].

Механические характеристики полимеров, таких как полигликолид и полилактид, обычно используемых в тканевой инженерии, не совсем подходят для создания ПС [199, 200]. Пионерами создания искусственного ПС методом электроспиннинга с использованием сегментированного полиуретана была команда ученых из Университета Ливерпуля. Они провели серию биологических и биомеханических исследований ПС, которые потенциально могут быть использованы в технологии замены артерий [131, 201]. Полиуретаны - это биоматериалы, широко используемые для изготовления имплантируемых изделий, и, в том числе искусственных клапанов сердца, сосудистых протезов. Используемые в медицине полиуретаны, представляют собой биосовместимые полимеры, которые не вызывают воспалительных реакций тканей [202-204]. Механические и биологические свойства ПУ определяются строением твердых и мягких сегментов ПУ, что позволяет

подобрать полимеры, изделия из которых близки по свойствам к натуральным тканям [205-207].

В соответствие с современными представлениями, основными причинами стенозирования ПС является несоответствие механических свойств ПС и нативного сосуда, а также недостаточная эффективность эндотелизации внутренней поверхности ПС [208, 209].

Для улучшения эндотелизации было предложено модифицировать поверхность ПС лигандами рецепторов клеточной адгезии [152]. Однако известно, что экспрессия таких лигандов может приводить и к повышенному связыванию иммунокомпетентных клеток, что в конечном счете инициирует стеноз [210].

В нашей работе, для повышения эффективности связывания эндотелиальных клеток и их предшественников мы использовали желатин - недорогой лизат коллагенов, который часто используется для повышения адгезии эндотелиоцитов [158, 211, 212]. Желатин был введен в раствор для ЭС, поскольку, как мы показали ранее, в этом случае он не только экспонирован на поверхности волокон длительное время, и значительно улучшает адгезию эндотелиоцитов, но и увеличивает прочность матриксов [28]. Кросс-сшивка желатина глутаровым альдегидом существенно улучшает адгезию первичных эндотелиоцитов, что вероятно связано с уменьшением подвижности экспонированного на поверхности желатина [28]. Для того, чтобы уменьшить связывание с экспонированным на поверхности желатином клеток крови и в том числе тромбоцитов в состав раствора для ЭС дополнительно вводили бивалирудин [33] и с целью уменьшить расход бивалирудина из такого раствора изготавливали только внутренний слой ПС. Как было показано ранее (см. пункт 3.4), такие типы поверхности легко заселяются эндотелиальными клетками пупочной вены человека и, таким образом, обеспечивают хорошую поверхность для неоэндотелизации и низкой адгезии тромбоцитов *in vitro* (см. пункт 3.5).

Экспозиция бивалирудина во внутреннем слое экспериментального ПС (см. рис. 11) позволило снизить количество тромбозов и окклюзий как на ранних сроках наблюдения (0 в исследуемой группе ПС из Тек-Жл-Бив против 3 в группе ПС из ПТФЭ), так и на отдаленных сроках (1 в группе Тек-Жл-Бив против 3 в группе ПТФЭ). При этом окклюзии в группе ПТФЭ не были связаны с дефектами хирургической техники или инфекцией.

Схожее количество клеток в неоинтима Тек-Жл-Бив и ПТФЭ было обнаружено через 24 недели функционирования. Клетки интимы протезов представлены как небольшими веретенообразными клетками с различными цитоплазматическими отростками, так и клетками с мелкими мономорфными ядрами и слабо выраженной цитоплазмой, причем соотношение этих клеток отличается в протезах из ПТФЭ и Тек-Жл-Бив. Учитывая тот факт, что на сроке 12 недель в неоинтима ПС обоих типов было в 4-5 раз больше клеток, причем в ПС из Тек-Жл-Бив в полтора раза больше, чем в протезах из ПТФЭ, можно предположить, что состав и механические свойства ПС влияют на длительность фибробластической фазы. При этом в податливых ПС из Тек-Жл-Бив количество клеток уменьшается быстрее, что может отражать тенденцию к замедлению роста неоинтимального слоя в ПС способных изменять линейные размеры в ответ на пульсовую волну. Маленький диаметр пор в ПС из Тек-Жл-Бив и их податливость, по-видимому, приводят к менее интенсивному развитию адвентициального слоя и врастания в окружающие ткани. При этом надо отметить, что это не влияет на формирование *vas vasorum*, развитие которой не отличается у ПС обоих типов.

Иммуногистохимическое исследование демонстрирует, что внутренняя поверхность ПС из Тек-Жл-Бив более плотно заселены эндотелиоцитами, о чем свидетельствует круговая экспрессия Фактора VIII. Экспрессия коллагена IV типа между клетками и стенкой протеза свидетельствует о формировании необазальной мембраны, т.е. формировании структуры, способной поддержать образование нормально функционирующего эндотелия.

Важно отметить, что податливость материала и маленький диаметр пор, предотвращают пропитывание протеза кровью и попадание клеток крови в

стенку, что наблюдается в протезах из ПТФЭ. Чрезмерное пропитывание стенки протезов форменными элементами является дополнительным фактором риска тромбообразования и кальцификации [213, 214]. Это подтверждается и результатами гистологического исследования, при помощи которого была обнаружена более выраженная кальцификация стенок протезов из ПТФЭ, по сравнению с Тек-Жл-Бив.

На данный момент проведено не так много *in vivo* исследований тканеинженерных протезов из ПУ. Ряд исследований показывает возможность биodeградации таких полиуретанов *in vivo* [17-19]. Однако группа исследователей из Австрии, подробно занимающихся изучением термопластичных полиуретановых протезов, изготовленных методом электроспиннинга не нашли никаких признаков их биodeградации в своих экспериментах *in vitro* и *in vivo* [14, 20, 21]. Такие ПС, выполненные на основе термопластичного полиуретана Pellethane™, показали отличные механические свойства и биосовместимость, при этом обладали высокой резистентностью к биodeградации. Проходимость этих ПС была сопоставима с нашими результатами. Эти результаты так же подтверждаются и рядом других долгосрочных исследований *in vivo*, в которых период наблюдения доходил до 580 дней [131, 132]. Ahmed и соавторы [149] из Лондонского Университета опубликовали результаты исследования, в котором POSS PCU™ протезы с внутренним диаметром 5 мм, приготовленные методом электроспрея с фазовой инверсией имплантировали в сонную артерию 12 овец. Период наблюдения составил 9 месяцев. Процент проходимости ПС составил 64% (что значительно меньше, чем у наших протезов), хотя в них так же не было обнаружено гиперплазии неоинтимы, кальцификации и аневризм анастомозов. Протезы показали функциональные качества, сопоставимые с нативными артериями. Возможно, невысокая проходимость была связана с отсутствием биофункционального, гемосовместимого внутреннего слоя, содержащего антикоагулянт, как в нашем случае, с другой моделью животного, или по каким-либо другим причинам, требующим дальнейшего изучения. Таким образом, данные о физических свойствах ПС из Тек-Жл-Бив, их биологических

свойствах, удобство манипулирования с этими ПС при их установке, отсутствие стенозов и аневризм демонстрируют их применимость в клинической практике.

Исследования биостабильности экспериментальных ПС показали, что полиуретан Тесoflex-80А™ в составе обогащенных белками трехмерных матриц, изготовленных с помощью ЭС, демонстрирует хорошую биостабильность в течение 6 месяцев функционирования *in vivo* в инфраренальной позиции брюшной аорты крыс. Несмотря на то, что Тесoflex-80А™, с циклогексильными остатками в жестком сегменте, показал слабые признаки деградации после длительной имплантации, исследование механических свойств показало, что контакт между волокнами полимера нарушается в начальный период (3 месяца) с сохранением жесткости, близкой к начальной; однако ткань *de novo* врастает в ПС, тем самым уменьшая подвижность волокон относительно друг друга и увеличивая прочность и жесткость стенки ПС через 6 месяцев. Данное предположение подтверждается данными других авторов, которые тоже исследовали механические характеристики ПС из полиуретанов, изготовленных методом электроспиннинга, после имплантации в брюшную аорту крыс на сроках 180 и 365 дней после операции. Как и в нашем случае, авторы работы наблюдали увеличение прочности протеза на 20% на сроке 180 дней по сравнению с неимплантированным протезом [21].

Дальнейшее исследование ПС из Тек-Жл-Бив на крупных животных позволит оценить возможность клинического использования этих ПС для протезирования сосудов малого диаметра у пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол изготовления двуслойных протезов сосудов методом электроспиннинга из раствора термопластичного полиуретана Tecoflex EG-80A™ в гексафторизопропанол. Для улучшения биосовместимости и механических свойств протезов предложено вводить в состав раствора базового полимера 15% желатин. Для улучшения гемосовместимости контактирующей с кровью поверхности предложено введение в состав волокон внутреннего слоя ПС прямых антикоагулянтов (1,5% бивалирудина).
2. Разработанный протокол изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга из полимерной смеси биостабильного полиуретана Tecoflex EG-80A™, желатина и бивалирудина, позволяет создать протезы сосудов малого диаметра, не уступающие (а по многим характеристикам и превосходящие) по прочности протезам сосудов из ПТФЭ, но, при этом, более эластичные и податливые, чем протезы сосудов из ПТФЭ. Показано, что прочность экспериментальных протезов сосудов на разрыв составляет $15,60 \pm 0,80$ МПа (в группе ПТФЭ – $16,00 \pm 0,90$ МПа, $p=0,37$), прочность на прорыв нитью $470,00 \pm 35,00$ г*силы (в группе ПТФЭ – $170,00 \pm 5,70$ г*силы, $p=0,005$), давление разрыва 14896 ± 304 мм рт. ст. (в группе ПТФЭ – 1327 ± 289 мм рт. ст., $p=0,005$), податливость $18,6 \pm 0,11$ %/мм рт. ст.⁻¹ $\times 10^{-2}$ (в группе ПТФЭ – $3,26 \pm 0,08$ %/мм рт. ст.⁻¹ $\times 10^{-2}$, $p=0,005$).
3. Изготовленные протезы сосудов из полимерной смеси биостабильного полиуретана, желатина и бивалирудина методом электроспиннинга, обладают низкой цитотоксичностью для эндотелиоцитов, а также, хорошей гемосовместимостью. Показано, что эндотелиоциты хорошо прикрепляются и пролиферируют на поверхности матриксов. Введение в состав волокон внутреннего слоя ПС 1,5% бивалирудина позволяет добиться его длительного высвобождения (50% в течение 10 суток) и, соответственно, пролонгированно улучшить гемосовместимость контактирующей с кровью поверхности. Агрегация тромбоцитов снижается не менее, чем в 4 раза по сравнению с матриксами из чистого полиуретана, повышая гемосовместимость материала в ближайшей и длительной перспективе. Исследуемые матриксы показывают

низкий процент гемолиза - 2,55%.

4. Интраоперационная оценка качества изготовления протезов показала, что они устойчивы к «разволоknению» при отрезании. Через проколы стандартными атравматическими иглами в исследуемых протезах нет кровопотери, что достоверно снижает время гемостаза анастомозов в момент основного этапа операции с 24,5 мин в группе ПС из ПТФЭ до 18,5 мин в группе ПС из Тек-Жл-Бив. При запуске кровотока по имплантированному сосуду было отмечено, что протезы из ПТФЭ пропитываются кровью, в отличие от ПС из Тек-Жл-Бив.

5. ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое на сроках наблюдения до 24 недель показали более высокую проходимость (94,5%), по сравнению с ПС из ПТФЭ (66,6%), при этом линейные скорости кровотока у экспериментальных протезов на всех сроках наблюдения значимо не отличались от нормальных артерий. Экспериментальные ПС показали высокую биостабильность, невысокую кальцификацию их стенок (в отличие от протезов из ПТФЭ, в которых спустя 24 недели после эксплантации площадь кальцифицированных участков выше в 4,5 раза) и хорошую клеточную заселенность внутренней поверхности, контактирующей с кровотоком. Иммуногистохимическое исследование показало формирование функционально полноценного неоэндоthелиального слоя у экспериментальных протезов с наличием необазальной мембраны, что объясняет хорошую проходимость на всех сроках наблюдения.

6. Совокупность всех свойств, а именно: прочность, биостабильность, способность к активному заселению матрикса клетками, формированию полноценного слоя неоинтимы, низкой кальцификации стенок, тканеинженерные ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое может быть рекомендован для дальнейшего исследования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения биосовместимости и механических свойств протезов рекомендуется введение в состав раствора базового полимера белка внеклеточного матрикса, например, желатина.
2. Для улучшения гемосовместимости контактирующей с кровью поверхности рекомендуется введение в состав волокон внутреннего слоя ПС прямых антикоагулянтов, например, бивалирудина.
3. Для замены участка поврежденного сосуда рекомендуется использование ПС из полиуретана с желатином и бивалирудином во внутреннем слое, так как они обладают хорошей прочностью, биостабильностью, способностью к активному заселению клетками, формированию полноценного слоя неоинтимы, низкой кальцификацией стенок.
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.
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 чрезмерное натяжение может приводить к отслойке внутреннего слоя.

- 1) The World Heart Federation's vision for worldwide cardiovascular disease prevention / S. Yusuf, D. Wood, J. Ralston, K.S. Reddy // *The Lancet*. – 2015. – Т. 386. – №. 9991. – С. 399-402.
- 2) Primary stenting of the superficial femoral and popliteal artery / D.D. Dearing, K.R. Patel, J.M. Compoginis et al. // *Journal of vascular surgery*. – 2009. – Т. 50. – №. 3. – С. 542-547.
- 3) Nitinol stent implantation versus balloon angioplasty for lesions in the superficial femoral artery and proximal popliteal artery: twelve-month results from the RESILIENT randomized trial / J.R. Laird, B.T. Katzen, D. Scheinert, et al. // *Circulation: Cardiovascular Interventions*. – 2010. – Т. 3. – №. 3. – С. 267-276.
- 4) Contemporary use of arterial and venous conduits in coronary artery bypass grafting: anatomical, functional and clinical aspects / G. Cuminetti, S. Gelsomino, S. Curello, et al. // *Netherlands Heart Journal*. – 2017. – Т. 25. – №. 1. – С. 4-13.
- 5) Improving in vivo outcomes of decellularized vascular grafts via incorporation of a novel extracellular matrix / N.J. Kristofik, L. Qin, N.E. Calabro, et al. // *Biomaterials*. – 2017. – Т. 141. – С. 63-73.
- 6) Five-Year Patency Rates for Heparin-Bonded Expanded Polytetrafluoroethylene Femoropopliteal Bypass Grafts vs ePTFE Grafts Without Heparin / R.H. Samson, R. Morales, D.P. Showalter, et al. // *Journal of Vascular Surgery*. – 2016. – Т. 63. – №. 1. – С. 289.
- 7) A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for above-knee femoropopliteal artery bypass / I.J. Rychlik, P. Davey, J. Murphy, M.E. O'Donnell // *Journal of Vascular Surgery*. – 2014. – Т. 60. – №. 2. – С. 506-515.
- 8) Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft / B.S. Conklin, E.R. Richter, K.L. Kreutziger, et al. // *Medical engineering & physics*. – 2002. – Т. 24. – №. 3. – С. 173-183.
- 9) Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts / A. Hasan, A. Memic, N. Annabi, M. et al. // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Т. 10. – №. 1. – С. 11-25.

- 10) Small-diameter vascular tissue engineering / D.G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, D. Mantovani // *Nature Reviews Cardiology*. – 2013. – T. 10. – №. 7. – C. 410-421.
- 11) Electrospun Poly (lactide-co-glycolide-co-3 (S)-methyl-morpholine-2, 5-dione) Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering / Y. Feng, W. Lu, X. Ren, et al. // *Polymers*. – 2016. – T. 8. – №. 2. – C. 13.
- 12) Study of patency of vascular grafts manufactured by means of electrospinning / I.V. Popova, A.O. Stepanova, T.A. Plotnikova, D.S. et al. // *Angiologiya i sosudistaya khirurgiya*= *Angiology and vascular surgery*. – 2015. – T. 21. – №. 2. – C. 136-8, 140-2.
- 13) The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts / R.A. Hoshi, R. Van Lith, M.C. Jen, et al. // *Biomaterials*. – 2013. – T. 34. – №. 1. – C. 30-41.
- 14) Electrospun small-diameter polyurethane vascular grafts: ingrowth and differentiation of vascular-specific host cells / H. Bergmeister, C. Grasl, I. Walter, et al. // *Artificial organs*. – 2012. – T. 36. – №. 1. – C. 54-61.
- 15) In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review / K.A. Rocco, M.W. Maxfield, C.A. Best, et al. // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2014. – T. 20. – №. 6. – C. 628-640.
- 16) Szycher, M. Biostability of polyurethane elastomers: a critical review / M. Szycher // *Journal of biomaterials applications*. - 1988. – T. 3. - №. 2. – C. 297-402.
- 17) Poly (carbonate urethane) and poly (ether urethane) biodegradation: in vivo studies / E.M. Christenson, M. Dadsetan, M. Wiggins, et al. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2004. – T. 69. – №. 3. – C. 407-416.
- 18) Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials / J.P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R.S. Labow // *Biomaterials*. – 2005. – T. 26. – №. 35. – C. 7457-7470.
- 19) Biodegradation of polyether polyurethane inner insulation in bipolar pacemaker leads / M.J. Wiggins, B. Wilkoff, J.M. Anderson, A. Hiltner // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2001. – T. 58. – №. 3. – C. 302-307.
- 20) Electrospun polyurethane vascular grafts: in vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression / C. Grasl, H. Bergmeister, M. Stoiber, et

al. // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2010. – T. 93. – №. 2. – C. 716-723.

21) Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities / H. Bergmeister, C. Schreiber, C. Grasl, et al. // Acta biomaterialia. – 2013. – T. 9. – №. 4. – C. 6032-6040.

22) Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation / P. Van de Witte, P.J. Dijkstra, J.W. Van den Berg, J. Feijen // Journal of membrane science. – 1996. – T. 117. – №. 1-2. – C. 1-31.

23) Hou, Q. Preparation of interconnected highly porous polymeric structures by a replication and freeze-drying process / Q. Hou, D.W. Grijpma, J. Feijen // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2003. – T. 67. – №. 2. – C. 732-740.

24) Giboz, J. Microinjection molding of thermoplastic polymers: a review / J. Giboz, T. Copponnex, P. Mélé // Journal of micromechanics and microengineering. – 2007. – T. 17. – №. 6. – C. R96.

25) Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration / M.S. Widmer, P. K. Gupta, L. Lu et al. // Biomaterials. – 1998. – T. 19. – №. 21. – C. 1945-1955.

26) Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts / H.Wu, J. Fan, C.C. Chu, J. Wu // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2010. – T. 21. – №. 12. – C. 3207-3215.

27) Yoo, H.S. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery / H.S. Yoo, T.G. Kim, T.G. Park // Advanced drug delivery reviews. – 2009. – T. 61. – №. 12. – C. 1033-1042.

28) Mechanical properties and biological behavior of 3D matrices produced by electrospinning from protein-enriched polyurethane / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y. Gao et al. // BioMed research international. – 2018. – T. 2018. – C. 1-10.

29) Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering / W.

He, T. Yong, W.E. Teo et al. // Tissue engineering. – 2005. – T. 11. – №. 9-10. – С. 1574-1588.

30) Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds / Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2005. – T. 72. – №. 1. – С. 156-165.

31) In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application / S.J. Lee, J.J. Yoo, G.J. Lim et al. // Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2007. – T. 83. – №. 4. – С. 999-1008.

32) Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly (L-lactide-co-caprolactone)(PLLC) nanofiber scaffold / Y. Zhu, M.F. Leong, W.F. Ong et al. // Biomaterials. – 2007. – T. 28. – №. 5. – С. 861-868.

33) Study of hemocompatibility and endothelial cell interaction of tecoflex-based electrospun vascular grafts / V.S. Chernonosova, A.A. Gostev, Y.A. Chesalov et al. // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2019. – T. 68. – №. 1-3. – С. 34-43.

34) Ferraresso, M. A two-year experience with a rapid access, self-sealing, polycarbonate urethane nanofiber vascular access graft for hemodialysis / M. Ferraresso, E.M. Bortolani, G. Amnon // The journal of vascular access. – 2016. – T. 17. – №. 3. – С. 210-214.

35) Equivalent secondary patency rates of upper extremity Vectra Vascular Access Grafts and transposed brachial-basilic fistulas with aggressive access surveillance and endovascular treatment / S.K. Kakkos, T. Andrzejewski, J.A. Haddad et al. // Journal of vascular surgery. – 2008. – T. 47. – №. 2. – С. 407-414.

36) Оганов, Р.Г. Демографическая ситуация и сердечно-сосудистые заболевания в России: пути решения проблем / Р.Г Оганов, Г.Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2019. – Т. 6. - №. 8. – С. 7-14.

37) 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease

in the adult / T.J. Anderson, J. Grégoire, R.A. Hegele et al. // Canadian Journal of Cardiology. – 2013. – T. 29. – №. 2. – C. 151-167.

38) Coronary artery bypass grafting vs percutaneous coronary intervention and long-term mortality and morbidity in multivessel disease: meta-analysis of randomized clinical trials of the arterial grafting and stenting era / I. Sipahi, M.H. Akay, S. Dagdelen // JAMA internal medicine. – 2014. – T. 174. – №. 2. – C. 223-230.

39) The impact of a second arterial graft on 5-year outcomes after coronary artery bypass grafting in the Synergy Between Percutaneous Coronary Intervention With TAXUS and Cardiac Surgery Trial and Registry / C.A. Parasca, S.J. Head, F.W. Mohr et al. // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2015. – T. 150. – №. 3. – C. 597-606.

40) Total arterial grafting is associated with improved clinical outcomes compared to conventional myocardial revascularization at 10 years follow-up / G. Bisleri, L. Di Bacco, L. Giroletti, C. Muneretto // Heart and vessels. – 2017. – T. 32. – №. 2. – C. 109-116.

41) Arterial coronary artery bypass grafting is safe and effective in elderly patients / B. Medalion, R. Mohr, Y. Ben-Gal // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2015. – T. 150. – №. 3. – C. 607-612.

42) Покровский, А.В. Состояние сосудистой хирургии в Российской Федерации в 2018 году / А.В. Покровский, А.Л. Головюк // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. М. – 2019. – 49 С.

43) The choice of conduits in coronary artery bypass surgery / M. Gaudino, D. Taggart, H. Suma et al. // Journal of the American College of cardiology. – 2015. – T. 66. – №. 15. – C. 1729-1737.

44) Abu-Omar, Y. Coronary artery bypass surgery / Y.Abu-Omar, D.P.Taggart // Medicine. – 2014. – T. 42. – №. 9. – C. 527-531.

45) Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions / R.E. Harskamp, R.D. Lopes, C.E. Baisden et al. // Annals of surgery. – 2013. – T. 257. – №. 5. – C. 824-833.

46) Remote endarterectomy versus supragenicular bypass surgery for long occlusions of the superficial femoral artery: medium-term results of a randomized

controlled trial (the REVAS trial) / S.S. Gisbertz, R.P. Nolthenius, G.J. de Borst et al. // *Annals of vascular surgery*. – 2010. – T. 24. – №. 8. – C. 1015-1023.

47) Johnson, W.C. A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: a prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study / W.C.Johnson, K.K.Lee // *Journal of vascular surgery*. – 2000. – T. 32. – №. 2. – C. 268-277.

48) Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature / P. Klinkert, P.N. Post, P.J. Breslau, J.H. Van Bockel // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2004. – T. 27. – №. 4. – C. 357-362.

49) Brewster, D.C. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease / D.C.Brewster, F.M.G.Hospital, H.M.School // *Journal of vascular surgery*. – 1997. – T. 25. – №. 2. – C. 365-379.

50) Chlupac, J. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery / J.Chlupac, E.Filova, L.Bacakova // *Physiological Research*. – 2009. – T. 58. – C. 119.

51) Pashneh-Tala, S. The tissue-engineered vascular graft—past, present, and future / S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2015. – T. 22. – №. 1. – C. 68-100.

52) Choice of conduit for the right coronary system: 8-year analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes trial / I.E. Hadinata, P.A. Hayward, D.L. Hare et al. // *The Annals of thoracic surgery*. – 2009. – T. 88. – №. 5. – C. 1404-1409.

53) Has the in situ right internal thoracic artery been overlooked? An angiographic study of the radial artery, internal thoracic arteries and saphenous vein graft patencies in symptomatic patients / P.J. Shah, K. Bui, S. Blackmore et al. // *European journal of cardio-thoracic surgery*. – 2005. – T. 27. – №. 5. – C. 870-875.

54) Aorta-coronary bypass grafting with polytetrafluoroethylene conduits. Early and late outcome in eight patients / R.B. Chard, D.C. Johnson, G.R. Nunn, T.B. Cartmill // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 1987. – T. 94. – №. 1. – C. 132-134.

- 55) The use of expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts for myocardial revascularization / F.W. Hehrlein, M. Schlepper, F. Loskot et al. // The Journal of cardiovascular surgery. – 1984. – T. 25. – №. 6. – С. 549-553.
- 56) TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Disease / L. Norgren, W.R. Hiatt, J.A. Dormandy et al. // J Vasc Surg. – 2007. – T. 45. – С. 5.
- 57) Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial / R.M. Green, W.M. Abbott, T. Matsumoto et al. // Journal of vascular surgery. – 2000. – T. 31. – №. 3. – С. 417-425.
- 58) Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization / Y. Yao, J. Wang, Y. Cui et al. // Acta biomaterialia. – 2014. – T. 10. – №. 6. – С. 2739-2749.
- 59) In vivo functional evaluation of tissue-engineered vascular grafts fabricated using human adipose-derived stem cells from high cardiovascular risk populations / J.T. Krawiec, J.S. Weinbaum, H.T. Liao et al. // Tissue Engineering Part A. – 2016. – T. 22. – №. 9-10. – С. 765-775.
- 60) Факторы риска развития ранних окклюзий имплантата при реконструктивных операциях у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (обзор литературы) / Б.В. Болдин, С.В. Родионов, П.Ю. Голосницкий и др. // Лечебное дело. – 2015. – №. 4.
- 61) Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch / Аю Tiwari, K.S. Cheng, H. Salacinski, G. Hamilton et al. // European journal of vascular and endovascular surgery. – 2003. – T. 25. – №. 4. – С. 287-295.
- 62) The mechanical properties of infrainguinal vascular bypass grafts: their role in influencing patency / S. Sarkar, H.J. Salacinski, G. Hamilton, A.M. Seifalian // European journal of vascular and endovascular surgery. – 2006. – T. 31. – №. 6. – С. 627-636.
- 63) Greenwald, S.E. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties / S.E. Greenwald, C.L. Berry // The Journal of pathology. – 2000. – T. 190. – №. 3. – С. 292-299.

- 64) Haruguchi, H. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review / H. Haruguchi, S.Teraoka // *Journal of Artificial Organs*. – 2003. – Т. 6. – №. 4. – С. 227-235.
- 65) Do, H. Intimal hyperplasia and wall shear in arterial bypass Y-grafting and consequence grafting: A numerical study / H. Do, A.A. Owida, Y.S. Morsi // *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*. – 2014. – Т. 14. – №. 03. – С. 1450044.
- 66) Intimal hyperplasia in vascular grafts / M.S. Lemson, J.H. Tordoir, M.J. Daemen et al. // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2000. – Т. 19. – №. 4. – С. 336-350.
- 67) Биодegradирuемый сосудистый протез с армирующим внешним каркасом / Л.В. Антонова, Е.О. Кривкина, М.А. Резвова и др. // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. – 2019. – Т. 8. – №. 2. – С. 87-97.
- 68) Foley, L.S. ARTERIAL INSUFFICIENCY / L.S. Foley, C.J. Fox // *Abernathy's Surgical Secrets E-Book*. – 2017. – С. 339.
- 69) Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes / M.R. De Vries, K.H. Simons, J.W. Jukema et al. // *Nature Reviews Cardiology*. – 2016. – Т. 13. – №. 8. – С. 451-470.
- 70) Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis / K. Yahagi, F.D. Kolodgie, F. Otsuka et al. // *Nature Reviews. Cardiology*. – 2016. – Т. 13. – №. 2. – С. 79.
- 71) Митьковская, Н. Сердце и метаболический риск / Н. Митьковская, Е. Григоренко, Л. Данилова – Litres, 2017. – 255 С.
- 72) Surgical and antimicrobial treatment of prosthetic vascular graft infections at different surgical sites: a retrospective study of treatment outcomes / S. Erb, J.A. Sidler, L. Elzi et al. // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 11. – С. e112947.
- 73) Prosthetic vascular graft infection: a risk factor analysis using a case–control study / V.S. Antonios, A.A. Noel, J.M. Steckelberg et al. // *Journal of Infection*. – 2006. – Т. 53. – №. 1. – С. 49-55.
- 74) Prosthetic vascular graft infection: a multi-center review of surgical management / E. Zetrenne, B.C. McIntosh, M.H. McRae et al. // *The Yale journal of biology and medicine*. – 2007. – Т. 80. – №. 3. – С. 113.

- 75) O'brien, T. Prosthetic vascular graft infection / T. O'brien, J. Collin // British journal of surgery. – 1992. – Т. 79. – №. 12. – С. 1262-1267.
- 76) Опыт применения криосохраненных гомографтов в аорто-бедренной позиции при инфекции сосудистых протезов / А.А. Карпенко, В.Б. Стародубцев, П.В. Игнатенко, Д.Г. Золоев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2015. – Т. 21. – №. 3. – С. 129-133.
- 77) Вульф, В.В. Исторические аспекты разработки и использования сосудистых трансплантатов. Современное состояние вопроса / В.В. Вульф, В.С. Аракелян, В.Т. Костава // Бюллетень НЦССХ им. АН Бакулева РАМН Сердечно-сосудистые заболевания. – 2008. – Т. 9. – №. 5. – С. 5-11.
- 78) Введение в ангиологию и сосудистую хирургию / Е. Бурлева, А. Фокин, В. Ермолаев, Е. Иванов. – Litres, 2017. – 306 С.
- 79) Реконструктивные вмешательства на магистральных сосудах в онкологии / И.Р. Аглуллин, И.Р. Сафин, Д.В. Рукавишников и др. // Поволжский онкологический вестник. – 2016. – №. 3. – С. 24-29.
- 80) Edwards, W.S. Chemically treated nylon tubes as arterial grafts / W.S. Edwards, J.S. Tapp // Surgery. – 2005. – Vol. 38, № 1. – P. 61–70
- 81) Harrison, J. H. Synthetic materials as vascular prostheses: I. A comparative study in small vessels of nylon, dacron, orlon, ivalon sponge and Teflon / J.H. Harrison // The American Journal of Surgery. – 1958. – Т. 95. – №. 1. – С. 3-15.
- 82) Dacron tube and bifurcation arterial prostheses produced to specification / O.C. Julian, R.A. Deterling, H.H. Su // Surgery. – 1957. – Т. 41. – №. 1. – С. 50-61.
- 83) Xue, L. Biomaterials in the development and future of vascular grafts / L. Xue, H.P. Greisler // Journal of vascular surgery. – 2003. – Т. 37. – №. 2. – С. 472-480.
- 84) Amid, P.K. Polypropylene prostheses / P.K. Amid // Abdominal wall hernias: principles and management. – Springer-Verlag, New York, 2001. – С. 272-278.
- 85) Tissue engineering of blood vessels / M.S. Baguneid, A.M. Seifalian, H.J. Salacinski et al. // British Journal of Surgery. – 2006. – Т. 93. – №. 3. – С. 282-290.
- 86) Биотехнологические аспекты создания трансплантатов артерий / Д.В. Бызов, О.П. Сынчикова, Е.Н. Пушкова и др. // Biotechnologia Acta. – 2010. – Т. 3. – №. 3. – С. 23-32.

- 87) John, L.C. Biomechanics of coronary artery and bypass graft disease: potential new approaches / L.C. John // *The Annals of thoracic surgery*. – 2009. – T. 87. – №. 1. – C. 331-338.
- 88) Owida, A.A. Numerical analysis of coronary artery bypass grafts: An overview / A.A. Owida, H. Do, Y.S. Morsi // *Computer methods and programs in biomedicine*. – 2012. – T. 108. – №. 2. – C. 689-705.
- 89) Biological mechanisms influencing prosthetic bypass graft patency: possible targets for modern graft design / D.M. Scharn, W.F. Daamen, T.H. Van Kuppevelt et al. // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2012. – T. 43. – №. 1. – C. 66-72.
- 90) Weinberg, C.B. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells / C.B. Weinberg, E. Bell // *Science*. – 1986. – T. 231. – C. 397-401.
- 91) Davim, J.P. The design and manufacture of medical devices / J.P. Davim – Elsevier, 2012. – 273 C.
- 92) Microporous segmented polyetherurethane vascular graft: I. Dependency of graft morphology and mechanical properties on compositions and fabrication conditions / J.H. Chen, R.F. Laiw, S.F. Jiang, Y.D. Lee // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 1999. – T. 48. – №. 3. – C. 235-245.
- 93) Microstructures in phase-inversion membranes. Part 1. Formation of macrovoids / C.A. Smolders, A.J. Reuvers, R.M. Boom, I.M. Wienk // *Journal of Membrane Science*. – 1992. – T. 73. – №. 2. – C. 259-275.
- 94) Doi, K. Novel compliant and tissue-permeable microporous polyurethane vascular prosthesis fabricated using an excimer laser ablation technique / K. Doi, Y. Nakayama, T. Matsuda // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 1996. – T. 31. – №. 1. – C. 27-33.
- 95) Kotch, F.W. Self-assembly of synthetic collagen triple helices / F.W. Kotch, R.T. Raines // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – T. 103. – №. 9. – C. 3028-3033.
- 96) Fabrication of poly-DL-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique / C. Ji, N. Annabi, M. Hosseinkhani, S. Sivaloganathan et al. // *Acta biomaterialia*. – 2012. – T. 8. – №. 2. – C. 570-578.

- 97) Microsphere-based scaffolds for cartilage tissue engineering: using subcritical CO₂ as a sintering agent / M. Singh, B. Sandhu, A. Scurto et al. // *Acta biomaterialia*. – 2010. – T. 6. – №. 1. – C. 137-143.
- 98) Dehghani, F. Engineering porous scaffolds using gas-based techniques / F. Dehghani, N. Annabi // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – T. 22. – №. 5. – C. 661-666.
- 99) Ahmed, E.M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review / E.M. Ahmed // *Journal of advanced research*. – 2015. – T. 6. – №. 2. – C. 105-121.
- 100) Kalis, R.W. Reinforced vascular graft and method of making same / R.W. Kalis - Пат. 5609624 США. – 1997.
- 101) Khorasani, M.T. Fabrication of microporous polyurethane by spray phase inversion method as small diameter vascular grafts material / M.T. Khorasani, S. Shorgashti // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2006. – T. 77. – №. 2. – C. 253-260.
- 102) Inoguchi, H. Mechanical responses of a compliant electrospun poly (L-lactide-co- ϵ -caprolactone) small-diameter vascular graft / H. Inoguchi, I.K. Kwon, E. Inoue, K. Takamizawa // *Biomaterials*. – 2006. – T. 27. – №. 8. – C. 1470-1478.
- 103) Pinnau, I. Structures and gas separation properties of asymmetric polysulfone membranes made by dry, wet, and dry/wet phase inversion / I. Pinnau, W. J. Koros // *Journal of applied polymer science*. – 1991. – T. 43. – №. 8. – C. 1491-1502.
- 104) Preparation and properties of poly (lactide-co-glycolide)(PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds / Y.X. Huang, J. Ren, C. Chen et al. // *Journal of biomaterials applications*. – 2008. – T. 22. – №. 5. – C. 409-432.
- 105) Blaker, J.J. Novel fabrication techniques to produce microspheres by thermally induced phase separation for tissue engineering and drug delivery / J.J. Blaker, J.C. Knowles, R.M. Day // *Acta biomaterialia*. – 2008. – T. 4. – №. 2. – C. 264-272.
- 106) Specially elaborated thermally induced phase separation to fabricate poly (L-lactic acid) scaffolds with ultra large pores and good interconnectivity / Gong Y, Ma

Z, Gao C et al. // Journal of applied polymer science. – 2006. – T. 101. – №. 5. – C. 3336-3342.

107) Shao, J. Early stage structural evolution of PLLA porous scaffolds in thermally induced phase separation process and the corresponding biodegradability and biological property / J. Shao, C. Chen, Y. Wang et al. // Polymer degradation and stability. – 2012. – T. 97. – №. 6. – C. 955-963.

108) Lloyd, D.R. Microporous membrane formation via thermally induced phase separation. I. Solid-liquid phase separation / D.R. Lloyd, K.E. Kinzer, H.S. Tseng // Journal of Membrane Science. – 1990. – T. 52. – №. 3. – C. 239-261.

109) Sell, S.A. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering / S.A. Sell, M.J. McClure, K. Garg, et al. // Advanced drug delivery reviews. – 2009. – T. 61. – №. 12. – C. 1007-1019.

110) Zhang, X. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine / X. Zhang, M.R. Reagan, D.L. Kaplan // Advanced drug delivery reviews. – 2009. – T. 61. – №. 12. – C. 988-1006.

111) Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds / Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna // Tissue engineering. – 2005. – T. 11. – №. 1-2. – C. 101-109.

112) Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications / Y. Zhang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.M. Huang // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2005. – T. 16. – №. 10. – C. 933-946.

113) Electrospinning of highly porous scaffolds for cartilage regeneration / A. Thorvaldsson, H. Stenhamre, P. Gatenholm, P. Walkenström // Biomacromolecules. – 2008. – T. 9. – №. 3. – C. 1044-1049.

114) In vitro tissue engineering of a cardiac graft using a degradable scaffold with an extracellular matrix-like topography / O. Ishii, M. Shin, T. Sueda, J.P. Vacanti // The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2005. – T. 130. – №. 5. – C. 1358-1363.

115) Dhandayuthapani, B. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering / B. Dhandayuthapani, U.M. Krishnan,

S. Sethuraman // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2010. – T. 94. – №. 1. – C. 264-272.

116) Wheatley, D. J. Polyurethane: material for the next generation of heart valve prostheses? / D.J Wheatley, L. Raco, G.M. Bernacca et al. // European journal of cardio-thoracic surgery. – 2000. – T. 17. – №. 4. – C. 440-448.

117) LaPorte, R. J. Hydrophilic polymer coatings for medical devices / R.J. LaPorte – Routledge, 2017. – 11-16 c.

118) Kheradvar, A. Emerging trends in heart valve engineering: part I. Solutions for future / A. Kheradvar, E.M. Groves, L.P. Dasi et al. // Annals of biomedical engineering. – 2015. – T. 43. – №. 4. – C. 833-843.

119) Kucinska-Lipka, J. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system / J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, H. Janik, M. Sienkiewicz et al. // Materials Science and Engineering: C. – 2015. – T. 46. – C. 166-176.

120) Tatai, L. Thermoplastic biodegradable polyurethanes: the effect of chain extender structure on properties and in-vitro degradation / L.Tatai, T.G. Moore, R. Adhikari et al. // Biomaterials. – 2007. – T. 28. – №. 36. – C. 5407-5417.

121) Hergenrother, R.W. Effect of hard segment chemistry and strain on the stability of polyurethanes: in vivo biostability / R.W. Hergenrother, H. D. Wabers, S. L. Cooper // Biomaterials. – 1993. – T. 14. – №. 6. – C. 449-458.

122) Simmons, A. Long-term in vivo biostability of poly (dimethylsiloxane)/poly (hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomers / A. Simmons, J. Hyvarinen, R.A. Odell et al. // Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 20. – C. 4887-4900.

123) Bergmeister, H. Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements / H. Bergmeister, N. Seyidova, C. Schreiber et al. // Acta biomaterialia. – 2015. – T. 11. – C. 104-113.

124) Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering / C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna // Tissue engineering. – 2004. – T. 10. – №. 7-8. – C. 1160-1168.

- 125) Stokes, K. Polyurethane elastomer biostability / K. Stokes, R. McVenes, J. M. Anderson // Journal of biomaterials applications. – 1995. – T. 9. – №. 4. – C. 321-354.
- 126) Pinchuk L. A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanes // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 1995. – T. 6. – №. 3. – C. 225-267.
- 127) Anderson, J.M. Recent Advances in Biomedical Polyurethane Biostability and biodegradation / J.M. Anderson, A. Hiltner, M.J. Wiggins et al. // Polym Int. – 1998. – T. 46. – C. 163-171.
- 128) Ghista, D.N. Optimal prosthetic aortic leaflet valve: design parametric and longevity analyses: development of the Avcothane-51 leaflet valve based on the optimum design analysis / D.N. Ghista, H. Reul // Journal of biomechanics. – 1977. – T. 10. – №. 5-6. – C. 313-324.
- 129) Gunatillake, P.A. Designing biostable polyurethane elastomers for biomedical implants / P.A. Gunatillake, D.J. Martin, G.F. Meijs, S. J. McCarthy et al. // Australian journal of chemistry. – 2003. – T. 56. – №. 6. – C. 545-557.
- 130) Jansen, J. synthetic three-leaflet valve / J. Jansen, H.A Reul // Journal of medical engineering & technology. – 1992. – T. 16. – №. 1. – C. 27-33.
- 131) Annis, D. An elastomeric vascular prosthesis / D. Annis, A. Bornat, R.O. Edwards et al. // ASAIO Journal. – 1978. – T. 24. – №. 1. – C. 209-214.
- 132) The longer term patency of a compliant small diameter arterial prosthesis: the effect of the withdrawing of aspirin and dipyridamole therapy: the effect of reduced compliance / A.C. Fisher, T.V. How, L. De Cossart, D. Annis // ASAIO Journal. – 1985. – T. 31. – №. 1. – C. 324-328.
- 133) Report of AorTech International plc., December 15, 2000.
- 134) Hunt, J. Quantitative evaluation of the soft tissue to response to biostable polyurethanes / J. Hunt // Sixth World Biomaterials Congress. – 2000. – C. 2000.
- 135) Bernacca, G.M. Polyurethane heart valve durability: effects of leaflet thickness and material / G.M. Bernacca, T.G. Mackay, M.J. Gulbransen et al. // The International journal of artificial organs. – 1997. – T. 20. – №. 6. – C. 327-331.
- 136) Bernacca, G. M. Polyurethane heart valves: fatigue failure, calcification, and polyurethane structure / G.M. Bernacca, T.G. Mackay, R. Wilkinson, D.J. Wheatley

et al. // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 1997. – T. 34. – №. 3. – C. 371-379.

137) Christenson, E.M. Oxidative mechanisms of poly (carbonate urethane) and poly (ether urethane) biodegradation: in vivo and in vitro correlations / E.M. Christenson, J.M. Anderson, A. Hiltner // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2004. – T. 70. – №. 2. – C. 245-255.

138) Seifalian, A.M. In vivo biostability of a poly (carbonate-urea) urethane graft / A.M. Seifalian, H.J. Salacinski, A. Tiwari et al. // Biomaterials. – 2003. – T. 24. – №. 14. – C. 2549-2557.

139) Salacinski, H.J. In vitro stability of a novel compliant poly (carbonate-urea) urethane to oxidative and hydrolytic stress / H.J. Salacinski, N.R. Tai, R.J. Carson et al. // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2002. – T. 59. – №. 2. – C. 207-218.

140) Kidane, A.G. Incorporation of a lauric acid-conjugated GRGDS peptide directly into the matrix of a poly (carbonate-urea) urethane polymer for use in cardiovascular bypass graft applications / A.G. Kidane, G. Punshon, H.J. Salacinski et al. // Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2006. – T. 79. – №. 3. – C. 606-617.

141) Tiwari, A. Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate / A. Tiwari, A. Kidane, H. Salacinski et al // European journal of vascular and endovascular surgery. – 2003. – T. 25. – №. 4. – C. 325-329.

142) Prosthetic heart valves: catering for the few / P. Zilla, J. Brink, P. Human D. Bezuidenhout // Biomaterials. – 2008. – T. 29. – №. 4. – C. 385-406.

143) Polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites: the next generation material for biomedical applications / R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, P.E. Butler, A.M. Seifalian // Accounts of chemical research. – 2005. – T. 38. – №. 11. – C. 879-884.

144) Kannan, R.Y. Silsesquioxane nanocomposites as tissue implants / R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, J.E. Ghanavi et al. // Plastic and reconstructive surgery. – 2007. – T. 119. – №. 6. – C. 1653-1662.

- 145) Kannan, R.Y. The antithrombogenic potential of a polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) nanocomposite / R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, J. De Groot et al. // *Biomacromolecules*. – 2006. – T. 7. – №. 1. – C. 215-223.
- 146) Kannan, R.Y. The degradative resistance of polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocore integrated polyurethanes: an in vitro study / R.Y. Kannan, H.J. Salacinski, M. Odlyha et al. // *Biomaterials*. – 2006. – T. 27. – №. 9. – C. 1971-1979.
- 147) Sarkar, S. Manufacture of small calibre quadruple lamina vascular bypass grafts using a novel automated extrusion-phase-inversion method and nanocomposite polymer / S. Sarkar, G. Burriesci, A. Wojcik et al. // *Journal of biomechanics*. – 2009. – T. 42. – №. 6. – C. 722-730.
- 148) Kidane, A.G. A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets / A.G. Kidane, G. Burriesci, M. Edirisinghe et al. // *Acta biomaterialia*. – 2009. – T. 5. – №. 7. – C. 2409-2417.
- 149) Ahmed, M. The performance of a small-calibre graft for vascular reconstructions in a senescent sheep model / M. Ahmed, G. Hamilton, A.M. Seifalian // *Biomaterials*. – 2014. – T. 35. – №. 33. – C. 9033-9040.
- 150) Raghunath, J. A new biodegradable nanocomposite based on polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocages: cytocompatibility and investigation into electrohydrodynamic jet fabrication techniques for tissue-engineered scaffolds / J. Raghunath, H. Zhang, M.J. Edirisinghe et al. // *Biotechnology and applied biochemistry*. – 2009. – T. 52. – №. 1. – C. 1-8.
- 151) Raghunath, J. Degradation studies on biodegradable nanocomposite based on polycaprolactone/polycarbonate (80: 20%) polyhedral oligomeric silsesquioxane / J. Raghunath, G. Georgiou, D. Armitage et al. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2009. – T. 91. – №. 3. – C. 834-844.
- 152) Electrospun collagen–chitosan–TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts / C. Huang, R. Chen, Q. Ke et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – T. 82. – №. 2. – C. 307-315.
- 153) Electrospun elastin-like polypeptide enriched polyurethanes and their interactions with vascular smooth muscle cells / P.H. Blit, K.G. Battiston, M. Yang et al. // *Acta biomaterialia*. – 2012. – T. 8. – №. 7. – C. 2493-2503.

- 154) Fabrication of PU/PEGMA crosslinked hybrid scaffolds by in situ UV photopolymerization favoring human endothelial cells growth for vascular tissue engineering / H. Wang, Y. Feng, B. An et al. // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2012. – T. 23. – №. 6. – C. 1499-1510.
- 155) Biocompatibility evaluation of protein-incorporated electrospun polyurethane-based scaffolds with smooth muscle cells for vascular tissue engineering / L. Jia, M.P. Prabhakaran, X. Qin et al. // Journal of Materials Science. – 2013. – T. 48. – №. 15. – C. 5113-5124.
- 156) Novel electrospun polyurethane/gelatin composite meshes for vascular grafts / N. Detta, C. Errico, D. Dinucci et al. // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2010. – T. 21. – №. 5. – C. 1761-1769.
- 157) Co-electrospun blends of PU and PEG as potential biocompatible scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering / H. Wang, Y. Feng, Z. Fang et al. // Materials Science and Engineering: C. – 2012. – T. 32. – №. 8. – C. 2306-2315.
- 158) Electrospun tecophilic/gelatin nanofibers with potential for small diameter blood vessel tissue engineering / E. Vatankhah, M.P. Prabhakaran, D. Semnani et al. // Biopolymers. – 2014. – T. 101. – №. 12. – C. 1165-1180.
- 159) Electro-spinning of pure collagen nano-fibres—just an expensive way to make gelatin? / D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S. Yew et al. // Biomaterials. – 2008. – T. 29. – №. 15. – C. 2293-2305.
- 160) Kennedy, K.M. Cell-matrix mechanical interaction in electrospun polymeric scaffolds for tissue engineering: Implications for scaffold design and performance / K.M. Kennedy, A. Bhaw-Luximon, D. Jhurry //Acta biomaterialia. – 2017. – T. 50. – C. 41-55.
- 161) Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale / T.W. Chung, D.Z. Liu, S.Y. Wang, S.S. Wang // Biomaterials. – 2003. – T. 24. – №. 25. – C. 4655-4661.
- 162) Protrusive waves guide 3D cell migration along nanofibers / C. Guetta-Terrier, P. Monzo, J. Zhu et al. // J Cell Biol. – 2015. – T. 211. – №. 3. – C. 683-701.

- 163) Architecture and migration of an epithelium on a cylindrical wire / H.G. Yevick, G. Duclos, I. Bonnet, P. Silberzan // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Т. 112. – №. 19. – С. 5944-5949.
- 164) Di Cio, S. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype / S. Di Cio, J.E. Gautrot // *Acta biomaterialia*. – 2016. – Т. 30. – С. 26-48.
- 165) Yang, Y. Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells / Y. Yang, S. Motte, L.J. Kaufman // *Biomaterials*. – 2010. – Т. 31. – №. 21. – С. 5678-5688.
- 166) A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly (ester urethane) urea and phospholipid polymer blend / Y. Hong, S.H. Ye, A. Nieponice et al. // *Biomaterials*. – 2009. – Т. 30. – №. 13. – С. 2457-2467.
- 167) Long term performance of small-diameter vascular grafts made of a poly (ether) urethane–polydimethylsiloxane semi-interpenetrating polymeric network / G. Soldani, P. Losi, M. Bernabei et al. // *Biomaterials*. – 2010. – Т. 31. – №. 9. – С. 2592-2605.
- 168) Electrospinning thermoplastic polyurethane/graphene oxide scaffolds for small diameter vascular graft applications / X. Jing, H.Y. Mi, M.R. Salick // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – Т. 49. – С. 40-50.
- 169) Small-diameter tissue engineered vascular graft made of electrospun PCL/lecithin blend / M. Zhang, K. Wang, Z. Wang et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2012. – Т. 23. – №. 11. – С. 2639-2648.
- 170) Оценка биосовместимости биodeградируемого сосудистого графта малого диаметра из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона: морфологическое исследование / Л.В. Антонова, Р.А. Мухамадияров, А.В. Миронов и др. // *Гены & клетки*. – 2015. - Том 10, № 2. - С. 71-77.
- 171) Оценка *in vitro* активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матрицы на основе полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона / Л.В. Антонова, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова и др. // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. - 2018. Т.7. – № 2. – С. 89-101.

- 172) Inhibition of neointimal hyperplasia in vascular grafts by sustained perivascular delivery of paclitaxel / T. Masaki, R. Rathi, G. Zentner et al. // *Kidney international*. – 2004. – Т. 66. – №. 5. – С. 2061-2069.
- 173) Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review / Y. Song, J. Feijen, D.W. Grijpma, A.A. Poot // *Clinical hemorheology and microcirculation*. – 2011. – Т. 49. – №. 1-4. – С. 357-374.
- 174) Functionally graded electrospun scaffolds with tunable mechanical properties for vascular tissue regeneration / V. Thomas, X. Zhang, S.A. Catledge, Y.K. Vohra // *Biomedical Materials*. – 2007. – Т. 2. – №. 4. – С. 224.
- 175) Functionalization of electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffold with heparin and vascular endothelial growth factors for potential application as vascular grafts / Z. Wang, B. Sun, M. Zhang et al. // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 2013. – Т. 28. – №. 2. – С. 154-166.
- 176) Improving endothelialization by the combined application of polyethylene glycol coated cerium oxide nanoparticles and VEGF in electrospun polyurethane scaffolds / W.W. Dai, H.F. Guo, D.H. Qian et al. // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – Т. 5. – №. 5. – С. 1053-1061.
- 177) Vascular Endothelial Growth Factor Improves Physico- Mechanical Properties and Enhances Endothelialization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Poly(+caprolactone) Small-Diameter Vascular Grafts In vivo / L.V. Antonova, V.V. Sevostyanova, A.G. Kutikhin et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. – Т.7. – С. 1-8.
- 178) Constructing a blood vessel on the porous scaffold modified with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor / V.V. Sevostyanova, V.G. Matveeva, L.V. Antonova et al. // *AIP Conference Proceedings*. – AIP Publishing LLC, 2016. – Т. 1783. – №. 1. – С. 020204.
- 179) Conjugation with RGD peptides and incorporation of vascular endothelial growth factor are equally efficient for biofunctionalization of tissue-engineered vascular grafts / L.V. Antonova, A.M. Seifalian, A.G. Kutikhin et al. // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – Т. 17. – №. 11. – С. 1920.
- 180) Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1a и VEGF на процессы формирования in vivo

тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра / Л.В. Антонова, В.В. Севостьянова, А.Г. Кутихин и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2018. – Т.20. - №1. С. 96-109.

181) In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules / L.V. Antonova, V.V. Sevostyanova, A.V. Mironov et al. // Complex Issues of Cardiovascular Diseases. – 2018. – Т.7. - №2. – С. 25-36.

182) Endothelialization of Polycaprolactone Vascular Graft under the Action of Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor / V.V. Sevostyanova, L.V. Antonova, E.A. Velikanova et al. // Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny. - 2018. – Т.165. - №2. – С. 264-268.

183) Grafting of gelatin on electrospun poly (caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation / Z. Ma, W. He, T. Yong, S. Ramakrishna // Tissue engineering. – 2005. – Т. 11. – №. 7-8. – С. 1149-1158.

184) Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering / W. Fu, Z. Liu, B. Feng et al. // International journal of nanomedicine. – 2014. – Т. 9. – С. 2335.

185) The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction / B.W. Tillman, S.K. Yazdani, S.J. Lee et al. // Biomaterials. – 2009. – Т. 30. – №. 4. – С. 583-588.

186) Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested in vivo / L.V. Antonova, A.M. Seifalian, A.G. Kutikhin et al. // Frontiers in Pharmacology. – 2016. – Т.7. – № 136. – С. 1-10.

187) Structure of RGD-containing peptides and length of linker for their immobilization at vascular grafts affect regeneration of vascular tissue in rats / V.V. Sevostyanova, L.V. Antonova, V.N. Silnikov et al. // AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing LLC, 2018. – Т. 2051. – №. 1. – С. 020274.

188) Biocompatibility of small-diameter vascular grafts in different modes of RGD modification / L.V. Antonova, V.N. Silnikov, V.V. Sevostyanova et al. // Polymers. – 2019. – Т. 11. – №. 1. – С. 174.

- 189) The ability of usage various RGD configurations for the biodegradable vascular graft modification / L.V. Antonova, E.O. Krivkina, E.A. Senokosova et al. // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – IOP Publishing, 2019. – Т. 511. – №. 1. – С. 012036.
- 190) Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами / Л.В. Антонова, В.Н. Сильников, М.Ю. Ханова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – №. 1. – С. 142-152.
- 191) Aspirin-loaded electrospun poly (ϵ -caprolactone) tubular scaffolds: potential small-diameter vascular grafts for thrombosis prevention / C. Del Gaudio, E. Ercolani, P. Galloni et al. // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2013. – Т. 24. – №. 2. – С. 523-532.
- 192) Electrospun biodegradable elastic polyurethane scaffolds with dipyridamole release for small diameter vascular grafts / P. Punnaikitikashem, D. Truong, J.U. Menon et al. // Acta biomaterialia. – 2014. – Т. 10. – №. 11. – С. 4618-4628.
- 193) McClure, M.J. Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: Optimization of graft properties / M. J. McClure, D.G. Simpson, G.L. Bowlin // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2012. – Т. 10. – С. 48-61.
- 194) Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts / F. Montini-Ballarín, D. Calvo, P.C. Caracciolo et al. // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2016. – Т. 60. – С. 220-233.
- 195) Electrospun Produced Small Diameter Vascular Grafts: Modification of Physical Properties and Assessment of Biocompatibility / P.P. Laktionov, A.O. Lebedeva, M.V. Korobeinikov et al. // European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2014. – Т. 47. – №. 6. – С. 692.
- 196) Study of patency of vascular grafts manufactured by means of electrospinning / I.V. Popova, A.O. Stepanova, T.A. Plotnikova et al. // Angiologiya i sosudistaya khirurgiya= Angiology and vascular surgery. – 2015. – Т. 21. – №. 2. – С. 136-142.

- 197) The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant / H. Sun, L. Mei, C. Song et al. // *Biomaterials*. – 2006. – T. 27. – №. 9. – C. 1735-1740.
- 198) Mechanical study of PLA–PCL fibers during in vitro degradation / A.C. Vieira, J.C. Vieira, J.M. Ferra et al. // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2011. – T. 4. – №. 3. – C. 451-460.
- 199) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering / L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R.J. Biron et al. // *Bio/technology*. – 1994. – T. 12. – №. 7. – C. 689.
- 200) The independent role of cyclic flexure in the early in vitro development of an engineered heart valve tissue / G.C. Engelmayr Jr, E. Rabkin, F.W. Sutherland et al. // *Biomaterials*. – 2005. – T. 26. – №. 2. – C. 175-187.
- 201) Effect of compliance mismatch on vascular graft patency / W.M. Abbott, J. Megerman, J.E. Hasson et al. // *Journal of vascular surgery*. – 1987. – T. 5. – №. 2. – C. 376-382.
- 202) Electrospinning of novel biodegradable poly (ester urethane) s and poly (ester urethane urea) s for soft tissue-engineering applications / P.C. Caracciolo, V. Thomas, Y.K. Vohra et al. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – T. 20. – №. 10. – C. 2129-2137.
- 203) Caracciolo, P.C. Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly (esterurethanes) / P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – T. 20. – №. 1. – C. 145-155.
- 204) Segmented poly (esterurethane urea) s from novel urea–diol chain extenders: Synthesis, characterization and in vitro biological properties / P.C. Caracciolo, A.A. De Queiroz, O.Z. Higa et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – T. 4. – №. 4. – C. 976-988.
- 205) Guelcher S.A. Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine / S.A. Guelcher // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2008. – T. 14. – №. 1. – C. 3-17.
- 206) Synthesis and characterization of l-tyrosine based polyurethanes for biomaterial applications / D. Sarkar, J.C. Yang, A.S. Gupta, S.T. Lopina // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for*

Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2009. – T. 90. – №. 1. – C. 263-271.

207) Kucińska-Lipka, J. Polyurethanes modified with natural polymers for medical application / J. Kucińska-Lipka, I. Gubańska, H. Janik // Polimery. – 2013. – T. 58. – №. 9. – C. 678-684.

208) Improved endothelialization of small-diameter ePTFE vascular grafts through growth factor therapy / J.P. Hytönen, O. Leppänen, J. Taavitsainen et al. // Vascular Biology. – 2019. – T. 1. – №. 1. – C. 1-9.

209) Prosthetic bypass for restenosis after endarterectomy or stenting of the carotid artery / G. Illuminati, R. Belmonte, F. Schneider et al. // Journal of vascular surgery. – 2017. – T. 65. – №. 6. – C. 1664-1672.

210) Functional modification of electrospun poly (ϵ -caprolactone) vascular grafts with the fusion protein VEGF–HGFI enhanced vascular regeneration / K. Wang, Q. Zhang, L. Zhao et al. // ACS applied materials & interfaces. – 2017. – T. 9. – №. 13. – C. 11415-11427.

211) The effect of gelatin incorporation into electrospun poly (l-lactide-co- ϵ -caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility / J. Lee, G. Tae, Y.H. Kim et al. // Biomaterials. – 2008. – T. 29. – №. 12. – C. 1872-1879.

212) Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering / Z.X. Meng, Y.S. Wang, C. Ma et al. // Materials Science and Engineering: C. – 2010. – T. 30. – №. 8. – C. 1204-1210.

213) Polytetrafluoroethylene graft calcification in patients with surgically repaired congenital heart disease: evaluation using multidetector-row computed tomography / Y. Hayabuchi, K. Mori, T. Kitagawa et al. // American heart journal. – 2007. – T. 153. – №. 5. – C. 8061-8068.

214) Pathology of explanted polytetrafluoroethylene vascular grafts / R.I. Mehta, A.K. Mukherjee, T.D. Patterson, M.C. Fishbein // Cardiovascular Pathology. – 2011. – T. 20. – №. 4. – C. 213-221.