

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения
имени академика Е.Н. Мешалкина»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

На правах рукописи

Попова Ирина Владимировна

**Экспериментальное изучение сосудистого протеза, изготовленного методом
электроспиннинга**

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности

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 2016г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗАХ, ЭЛЕКТРОСПИННИНГ КАК ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАНТОВ (обзор литературы)	
1.1 Актуальность проблемы.....	12
1.2 Преимущества и недостатки, используемых типов сосудистых трансплантантов, основные причины их дисфункции	13
1.3 Строение стенки сосуда и ее ответная реакция на имплантацию протеза	17
1.4 Основные требования, предъявляемые к современным сосудистым протезам.....	19
1.5 Преимущества и недостатки способов изготовления синтетических сосудистых протезов. Варианты использования метода электроспиннинга	21
1.6 Типы полимеров и способы улучшения их характеристик при создании протеза методом электроспиннинга	25
1.7 Резюме.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Общая структура эксперимента.....	38
2.2 Разработка протокола изготовления протезов.....	40
2.3 Исследование физических свойств протезов сосудов, стендовые испытания.....	42
2.4 Экспериментальная часть (in vivo).....	45
2.4.1 Набор животных для исследования.....	45
2.4.2 Процедура имплантации экспериментальных протезов.....	46
2.4.3 Оценка проходимости сосудистого протеза	47
2.4.4 Исследование морфологического строения сосудистого протеза.....	48
2.4.5 Иммуногистохимическое исследование.....	50
2.5 Статистическая обработка данных.....	52

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Физико-механические свойства протезов	53
3.2 Экспериментальная часть <i>in vivo</i>	56
3.2.1 Интраоперационные показатели	56
3.2.2 Проходимость трансплантантов	58
3.3 Оценка "состоятельности" протезов	61
3.3.1 Интраоперационное исследование протезов сосудов и обзорная микроскопия	61
3.3.2 Гистологическое исследование эксплантированных сосудов	66
3.3.3 Исследование заселения протезов сосудов клетками	79
3.3.3.1 Оценка процесса пролиферации клеток	79
3.3.3.2 Оценка клеточного состава нативного сосуда крысы и зоны анастомозов	79
3.3.3.3 Оценка клеточного состава экспериментальных протезов	80
3.3.3.4 Оценка экстраклеточного матрикса эксплантированных протезов	84
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	86
ВЫВОДЫ	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БПВ – большая подкожная вена
БПШ - бедренно-подколенное шунтирование
БТШ - бедренно-тибиальное шунтирование
ВПКЧ – вена пупочного канатика человека
ГА – глутаральдегид
ГФИП - 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол
ДС – дуплексное сканирование
ЛСК – линейная скорость кровотока
МРТ – магнитно-резонансная томография
МПВС – малопроницаемый внутренний слой
ПКЛ – поликапролактон
ПКС – протез кровеносного сосуда
ПЛГА – полилактид-ко-гликолид
ПГК – полигликоливая кислота
ПЛКЛ - поли L-лактид с поликапролактоном
ПМК – полимолочная кислота
ПТФЭ – политетрафторэтилен
ПЭТФ – полиэтиленатрафталат
СД – сахарный диабет
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
УЗДГ - ультразвуковая доплерография
ФБР – фосфатно-буферный раствор
ХИНК – хроническая ишемия нижних конечностей

ВВЕДЕНИЕ

Использование современных материалов и технологий в сосудистой хирургии позволили повысить эффективность лечения пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей [26]. Несмотря на это частота послеоперационных осложнений, повторных операций и ампутаций остается достаточно высокой. Основной причиной снижения эффективности лечения, как правило, является тромбоз стентов, сосудистых шунтов и их анастомозов, что приводит к повторной ишемии нижней конечности и ставит под угрозу ее дальнейшую жизнеспособность [6;9;92;118;119;141].

Результаты хирургической коррекции кровотока зависят от многих факторов: уровня и протяженности стенозированного/тромбированного участка артерии, диаметра сосуда и степени повреждения его стенки; наличия периферического (воспринимающего) и коллатерального кровеносного русла, технических особенностей операции (способа формирования анастомоза, вида сосудистого шва), используемого шовного материала [21;32;40;77]. В литературе отмечено, что чем меньше диаметр протезируемого участка артерии – тем больше риск возникновения тромбоза [21;77].

Основными факторами, влияющими на проходимость протеза кровеносного сосуда, являются: состояние путей «притока» и «оттока» крови на момент операции, длина, диаметр и материал из которого состоит используемый трансплантат [5; 112;123;125].

Если выше перечисленные особенности, касающиеся повреждения самого кровеносного сосуда не всегда можно скорректировать во время операции, то хирургическую тактику и используемый материал, как правило, можно выбрать согласно конкретной ситуации. Например, исследования, проведенные В.А. Гуциным, показали, что гемодинамически предпочтительнее использовать формирование анастомозов по типу конец в конец, особенно для соединения сосудов диаметром менее 5 мм [21]. В своем исследовании Green R.M. и соавторы продемонстрировали значимость размера используемого

трансплантата. По результатам пятилетнего наблюдения было выявлено, что риск тромбоза возрастает 1,65 раза при бедренно-подколенных реконструкциях выше щели коленного сустава при использовании синтетического протеза диаметром менее 7 мм [67].

Настоящий прорыв реконструктивной хирургии кровеносных сосудов в России произошёл в 40-50 гг. XX столетия, после внедрения в практику разных ПКС [30;47]. Первые синтетические ПКС были изготовлены в 1958г. из полиамидных волокон (капрон, нейлон), а в 70-х годах для этой цели использовали полиэфирные нити (терилон) и полипропилен. Однако ни один из этих видов протезов не получил широкого клинического применения. Для производства тканых, вязанных или велюровых ПКС материалом выбора на протяжении многих лет являлся полиэтилентерефталат (дакрон) и изготовленные из него полиэфирные волокна [99]. Протез сосуда из лавсана (отечественный аналог дакрона) был применен впервые Е.Н. Мешалкиным при замещении части дуги аорты, а в 1959г. Б.В. Петровским при восстановлении кровотока на периферических артериях [37;39]. Наиболее удачными отечественными трансплантатами сосудов, используемыми и в настоящее время, оказались протезы из политетрафторэтилена, фторлон-лавсановые с покрытием на основе желатина, антикоагулянтными и антибактериальными веществами [8].

В настоящее время биотрансплантаты и синтетические ПКС, применяемые в клиниках не отвечают требованиям, предъявляемым к протезам сосудов, предназначенным для замены кровеносного сосуда малого диаметра (менее 6 мм) и характеризуются высокой частотой осложнений. Следовательно, улучшение свойств протезов сосудов способных длительно функционировать в организме является актуальной задачей сосудистой хирургии [38; 27; 71;92; 118; 122;126].

Необходимо отметить, что современное развитие химических технологий и физических методов позволяет получать трехмерные скаффолды с механическими свойствами, близкими к заменяемым органам. К числу этих технологий относится в первую очередь электроспиннинг – метод, позволяющий

получать волокна из растворов полимеров и пригодный для изготовления протезов сосудов [83;138].

Для того чтобы улучшить свойства протезов, изготовленных методом электроспиннинга, в представленной работе было предложено сформировать в непосредственной близости к внутреннему просвету сосуда тонкий слой непроницаемый для клеток крови, но проницаемый для биополимеров и низкомолекулярных веществ. Такой подход ранее не использовался, однако формирование подобного слоя, в принципе, позволяет избежать образования тромба в стенке протеза сосуда, уменьшить время гемостаза интраоперационно, обеспечить эффективную диффузию питательных веществ из кровотока, эффективную миграцию клеток в пористую структуру протеза и прорастание питающих сосудов в стенку протеза. Таким образом, протез сосуда, снабженный малопроницаемым внутренним слоем, может обладать рядом очевидных преимуществ по сравнению с аналогичным, не имеющим такого слоя.

НАУЧНАЯ ГИПОТЕЗА:

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

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработать состав полимерной композиции и технологию изготовления протезов сосудов методом электроспиннинга, в том числе и протезов с внутренним малопроницаемым слоем.

2. Изготовить три типа протезов сосудов, один контрольный и два с малопроницаемым внутренним слоем. Выполнить сравнительное исследование физических свойств протезов в соответствии с требованиями регламентирующих документов (ГОСТ Р ИСО 7198-2013) [20].

3. Оценить проницаемость протезов для крови, устойчивость к «разлохмачиванию» краев, формирование анастомозов с нативной артерией при выполнении основного этапа операции на экспериментальных животных.

4. Выполнить сравнительное исследование био- и гемосовместимости, склонность к формированию неоинтимы 3 типов протезов приготовленных из различных полимерных композиций в сроки до 20 недель после имплантации экспериментальным животным.

5. Определить тип протеза в наибольшей степени отвечающего требованиям клиники.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработан протокол изготовления протеза кровеносного сосуда методом электроспиннинга, содержащего малопроницаемый внутренний слой (мпвс).

2. Установлено, что физико-химические характеристики трансплантатов, изготовленных по предложенному протоколу, соответствуют ГОСТ Р ИСО 7198-2013 по прочности на разрыв в продольном направлении, прочности на прорыв нитью, проницаемости, при этом малопроницаемый внутренний слой повышает герметичность протеза и снижает степень кровопотери через его стенку и в зоне анастомоза.

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

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Результаты настоящего исследования демонстрируют новые возможности использования метода электроспиннинга в качестве альтернативного способа

изготовления протезов кровеносных сосудов. Выполненное сравнительное исследование разных типов трансплантатов представляет информацию, необходимую для рационального дизайна протезов сосудов. Разработанный протокол малопроницаемого слоя протезов и полученные данные об экспериментальных протезах позволяют рекомендовать их к полноразмерным доклиническим и клиническим исследованиям.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, содержащих литературный обзор, описание используемых материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Указатель литературы содержит 56 отечественных и 97 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 35 рисунками.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Предложенный протокол изготовления сосудистых протезов методом элестроспиннинга с малопроницаемым внутренним слоем позволяет получить полимерный каркас, обладающий достаточными механическими характеристиками, а именно прочностью на разрыв, прочностью на прорыв нитью, устойчивостью к расслоению при воздействии длительной гидродинамической нагрузки в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7198-2013.

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

3. При длительной оценке био- и гемосовместимости протезов на экспериментальных животных было отмечено, что изготовленные протезы являются тромбрезистентными, не вызывают избыточного образования

неофиброзной капсулы, неоинтимы, при этом наилучшую биосовместимость имеют протезы из ПКЛ с желатином и мпвс.

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

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения работы доложены и обсуждены на конференциях:

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

Выдан патент № 2572333 от 10.01.2016: «Способ изготовления протезов сосудов малого диаметра с низкой пористостью».

ПУБЛИКАЦИИ

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

ДОСТОВЕРНОСТЬ ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Достаточное количество экспериментальных наблюдение, 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 не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автором лично выполнены все операции по имплантации и забору экспериментальных протезов, а также контроль над состоянием животных на протяжении всего срока наблюдения. Автор принимала участие в изготовлении протезов сосудов и исследовании их механических свойств *in vitro*, функциональной оценке протезов с помощью ультразвукового доплеровского сканирования и МРТ-диагностики *in vivo*, исследовании послеоперационной морфологической и гистологической картины полученных результатов. Провела статистическую обработку данных с применением пакетов программ “Statistica 7” и Excel 2010; анализ и интерпретацию полученных данных. Автор является одним из соавторов полученного патента на изобретение.

Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, постоянное внимание и организационную помощь в выполнении этого исследования своим научным руководителям, а именно: доктору медицинских наук, профессору А.А. Карпенко и кандидату биологических наук П.П. Лактионову, а также искренне благодарит за дружеское участие Е.А. Покушалова, Д.С. Сергеевича, А.О. Степанову, И.С. Захарову, А.И. Шевченко, С.М. Закияна, А.Е. Акулова.

ГЛАВА 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗАХ, ЭЛЕКТРОСПИННИНГ КАК ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАНТОВ (обзор литературы)

1.1 Актуальность проблемы

Болезни системы кровообращения стабильно занимают одну из главных причин инвалидности и смертности населения. По данным исследования, проведенного в США (National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000) частота встречаемости поражений артерий нижних конечностей у пациентов в 60 лет составляет 4,7%, а у пациентов старше 70 лет около 14,5% - 20% [112;132]. В ангиохирургии одной из основных причин, требующих незамедлительного оперативного лечения, является развитие критической ишемии нижних конечностей 15-33% [29; 54; 102;120; 124;133].

По определению национальных российских рекомендаций: «заболевание периферических артерий – это синдром, обусловленный изменением анатомической структуры и функции артерий конечностей» [56]. Наиболее важными причинами поражения артериального русла с точки зрения распространенности являются атеросклероз и осложнения сахарного диабета (СД) [56;10;119]. Атеросклероз вызывает накопление холестерина под слоем интимы, уменьшая площадь поперечного сечения, доступную для потока крови и, таким образом, приводит к снижению притока крови к тканям ниже уровня поражения [50].

По данным А.В. Покровского с соавт., (2003), по причине прогрессирования атеросклероза около 10% населения старше 50 лет страдает поражением периферических артерий и около 90% от всех ампутаций нижних конечностей приходится на долю этого заболевания [1;27;46;141].

Сахарный диабет утяжеляет течение атеросклеротического поражения артерий нижних конечностей, приводя к распространенной закупорке артерий голени и стопы [25]. Авторы исследования хирургических реконструкций на уровне бедренно - подколенного сегмента при СД демонстрируют большой

процент раннего послеоперационного тромбоза шунта - 41%, при этом у 16% в ближайшем периоде, а у 25% через год. Однако подобное хирургическое вмешательство у этой категории больных позволяет снизить частоту больших ампутаций до 20,4%, а также количество летальных исходов - 3,2% [22]. В мире ежегодно выполняются больше 2,7-4,5 миллионов высоких ампутаций приходящихся на долю диабетических поражений артерий нижних конечностей [119].

При критической ишемии конечностей и протяженной окклюзии артерий операцией выбора продолжает оставаться реваскуляризация дистального артериального русла при помощи аутовенозного, синтетического и других типов шунтов [9;45;92;72].

1.2 Преимущества и недостатки, используемых типов сосудистых трансплантатов, основные причины их дисфункции

Собственные неизмененные артерии считаются лучшими ангиозаменителями [141]. Однако они ограничены в применении по причине отсутствия в организме человека артерий, которые можно использовать без значимого ущерба для кровоснабжаемых ими тканей или органов. Исключением являются внутренняя грудная и лучевая артерии, которые нашли широкое применение в лечении ишемической болезни сердца [31].

Использование аутологичной большой подкожной вены остается и на сегодняшний день "Золотым стандартом" [147]. Преимуществами этого трансплантата является иммунологическая совместимость, устойчивость к инфицированию, низкая тромбогенность (из-за присутствия живых эндотелиальных клеток), а также отсутствие необходимости в консервации и стерилизации. Однако у одной трети пациентов вена не может быть использована по причине ее анатомической непригодности: недостаточная длина для замены пораженного участка артерии, варикозное расширение (оптимальным диаметром вены для шунтирования является 4 мм), рассыпной тип и т.д. У ряда больных вена бывает использована в качестве шунта при ранее проведенных хирургических

вмешательствах, т.е. до возникновения необходимости выполнения реконструктивных операций на нижних конечностях [147;93]. Дефицит аутовенозного материала особенно возрастает у пациентов, нуждающихся в повторных операциях, и эта цифра может достигать 50% [113]. Первичная проходимость аутовенозного шунта в бедренно - подколенной позиции через 2 года от момента имплантации составляет 80%, а через 5 лет 47,6-69% [9;14;92]. По результатам 5-летнего анализа отмечаются преимущества использования аутолены "in situ" над реверсированной аутовеной и протезом из ПТФЭ при шунтировании бедренно – подколенного сегмента ниже щели коленного сустава. При шунтировании выше щели коленного сустава статистически достоверной разницы между этими трансплантатами не выявлено [9;14;44;51;78; 148].

В настоящее время влияние объёма хирургической травмы сосудистой стенки на интенсивность развития пролиферативных процессов, динамику гиперпластических реакций в венозной стенке, находящейся в позиции артериального шунта остается до конца не изученной. Дисфункцию ауототрансплантата в отдаленные сроки наблюдения связывают с прогрессирующим атеросклеротическим поражением стенки сосуда, гиперплазией интимы, аневризматическим расширением. Все это одни авторы связывают с компенсаторной реакцией на увеличившееся внутрисосудистое давление на стенку вены, другие же отмечают, что в основе таких изменений лежит обширное разрушение эндотелия, деиннервация и деваскуляризация вены [24;48;137;141]. К другим недостаткам венозного ауототрансплантата можно отнести увеличение продолжительности операции за счет времени, потраченного на выделение и подготовку вены, а также дополнительную травматизацию окружающих тканей.

Сосудистые биологические протезы продолжают использоваться в ангиохирургии и в настоящее время. Однако широкое клиническое применение трансплантатов из трупных тканей человека и из сосудов животных ограничено развитием ряда специфических осложнений. Первичная проходимость гомо - и ксенорографта через 5 лет от момента имплантации в бедренно - подколенную

позицию составляет около 53% [6;118]. Аневризматическое расширение протезов составляет – 18% через 3 года и 58% через 5 лет [27;122;118]. В связи, с чем авторы выделяют среди недостатков биопротезов: склонность к образованию аневризм, остаточную иммуногенность, а также более высокий риск инфекционных осложнений по сравнению с аутовеной [7;27]. Несмотря на разные способы, предложенные для подавления видовой иммуноспецифичности (обработка ферментами, детергентами, этиловым спиртом, формалином, глутаровым альдегидом, лиофилизацией – т.е. замораживание с последующим высушиванием), все они приводят к разрушению эластиновых волокон и коллагенового каркаса, что и является причиной формирования аневризм в биопротезах [6;7;15;33;43;65;91]. Для увеличения прочности стенок биопротезов был предложен способ обработки ксенопротезов с помощью бисэпоксисоединений (ЭПС). Первичная проходимость в сроки до 8 лет этих биопротезов в бедренно - подколенной позиции выше щели коленного сустава составила 37,5%, ниже щели коленного сустава – 7,4% [6]. Обработка ЭПС уменьшает адгезию белков и тромбоцитов, тем самым улучшая тромборезистентность трансплантата и подавляя процесс его кальцификации, а также увеличивает прочность протеза за счет сохранения коллагенового и эластинового каркаса [5].

Наибольший опыт использования в клинической практике сосудистых протезов биологического происхождения принадлежит профессору Dardik и др. из США. В 1995 году им были озвучены результаты о 1074 бедренно - подколенно - берцовых реконструкциях с применением биопротезов из вен пупочного канатика новорожденных (ВПКЧ). Проходимость трансплантатов через 5 лет от момента имплантации достигала 57 - 65% [71;72]. К числу преимуществ ВПКЧ можно отнести значительную длину, отсутствие клапанов и боковых притоков, а к числу недостатков большой диаметр (до 8 мм), толстую стенку, постепенное уменьшение прочности и эластичности ВПКЧ, в связи с замещением ткани стенки коллагеном реципиента, приводящее к аневризматическому расширению или тромбозу [13;36;72].

В результате усовершенствования материалов и способов изготовления протезов кровеносных сосудов на современном рынке представлены синтетические протезы, которые обеспечивают неплохие результаты в раннем послеоперационном периоде. Наиболее часто используемыми из них являются полиэтилентерефталат (лавсан) и политетрафторэтилен (ПТФЭ). По данным разных авторов, первичная проходимость трансплантатов из ПТФЭ и ПЭТФ в период до 30 дней после операции колеблется от 89% до 99,7% [9;41;42;75]. Однако долговременное функционирование таких протезов нельзя признать идеальным, т.к. проходимость протеза из ПТФЭ в бедренно - подколенной позиции через 3 года от момента имплантации составляет 69%, а через 5 лет только 39% [57;92;94;126].

Вследствие уменьшения проходимости/тромбоза протеза возникает угроза потери нижней конечности, что значительно ухудшает качество жизни пациента и вызывает необходимость выполнения повторной операции [1]. Причинами уменьшения проходимости синтетических сосудистых протезов, являются их механические свойства, структура поверхности и свойства базовых полимеров, вследствие которых такие протезы характеризуются повышенной тромбогенностью и способностью индуцировать гиперплазию интимы в зоне анастомоза [34;41].

Несоответствие эластичности материала протезов и стенки артерии создает напряжение в области их соединения, и чем более значимо это несоответствие, тем больше индуцируется процесс неоинтимогенеза (формирования внутренней оболочки) [38;41;136]. Недостаточная пористость и структура поверхности современных протезов из ПТФЭ позволяют сформироваться адекватному эндотелиальному слою протяженностью не более 3,5 см от зоны анастомоза [38; 59;151]. На поверхности оставшейся части протеза, а ее длина может достигать 30-40 см, наблюдается формирование псевдоинтимы с неравномерной фиксацией и различной степенью зрелости новообразованной соединительной ткани, отслоение которой является одной из причин нарушения первичной проходимости протеза в срок около 12 мес. с момента имплантации [38].

Углеродное покрытие ПКС из ПТФЭ в экспериментальном исследовании показало снижение воспалительной реакции и риск его инфицирования [88]. Однако, многоцентровое клиническое исследование сравнения протезов из ПТФ, содержащих/не содержащих углеродное покрытие и используемых для бедренно-берцового шунтирования, не показали статистически значимых отличий проходимости в срок до 36 месяцев [81].

В настоящий момент, не существует идеального сосудистого протеза, для выполнения операций на артериях малого диаметра (менее 6 мм), а, следовательно, поиск не только оптимальных конструкций изделий, но и новых, более совместимых с организмом материалов является актуальной задачей ангиохирургии [84;138].

1.3 Строение стенки сосуда и ее ответная реакция на имплантацию протеза

Длительное функционирование трансплантата в организме человека зависит от многих факторов, в том числе и от исходного состояния пораженного кровеносного сосуда (степени поражения слоев стенки). Артерии в организме человека имеют сложную структуру и выполняют четкие функции. Их стенка состоит из трех слоев: (I) интима, (II) медиа и (III) адвентиция. Интима включает непрерывный монослой эндотелиальных клеток, непосредственно присоединенных к базальной мембране, содержащей субэндотелиальные коллагеновые пучки, эластичные волокна, гладкомышечные клетки (ГМК). Медиа - средний слой состоит из густонаселенных организованных гладкомышечных клеток с пучками коллагеновых и сетью эластичных волокон. В основе адвентиции лежит плотно-эластичная соединительная ткань, содержащая фибробласты, ГМК, периваскулярные нервные клетки, мелкие кровеносные сосуды питающие слои стенки (вазо-вазорум) [61;83;108;116]. Основными белками, которые определяют механические свойства артериальной стенки, являются эластин и коллаген. При этом на начальных стадиях

деформации, сопротивление растяжению оказывают эластиновые волокна, а с нарастанием нагрузки и деформации в поддержание прочности вовлекаются коллагеновые волокна. Таким образом, в природных артериях с нарастанием деформации возрастает сопротивление напряжению, и это свойство принципиально отличает артерии от синтетических протезов, которые имеют довольно узкий предел упругой деформации [25;58;109].

При изучении различных видов синтетических сосудистых протезов были выявлены морфологические схожие признаки процесса их вживления.

После запуска кровотока, на внутренней поверхности стенки трансплантата откладывается пристеночный тромб (нити фибрина + форменные элементы крови), который с течением времени уплотняется и отделяет поток крови от материала протеза. Вслед за воспалительной реакцией (инфильтрация нейтрофилами, макрофагами; набухание клеток и их компонентов; парез кровеносных сосудов поврежденной нативной артерии и т.д.) начинается процесс образования грануляционной ткани, уменьшение клеточного компонента и увеличение количества коллагеновых и эластических волокон [35]. Время формирования и толщина неоинтимы, выстилающая поверхность синтетического протеза, зависят от материала и способа используемого при его изготовлении [59;66]. Некоторые авторы утверждают, что с течением времени изнутри синтетический протез сосуда покрывается истинным эндотелием. При этом это происходит в зоне анастомозов за счет неповрежденного эндотелия нативных сосудов, а в средней части протеза из сливающихся островков эндотелия, источником которых являются циркулирующие в крови предшественники эндотелиальных клеток [4;11]. Образующийся эндотелий заметно отличается от эндотелия неповрежденных сосудов крупным размером клеток и их ядер, а также базофильной цитоплазмой [35].

В конце 4 недели над всей поверхностью протеза завершается образование наружного соединительнотканного слоя с врастающими кровеносными сосудами в толщу стенки (один из примеров - протез из углеродсодержащих полиэфирных

нитей (витлана и полиактилонитрила)), однако процесс созревания наружной пластинки продолжается еще длительное время [35;11;52].

1.4 Основные требования, предъявляемые к современным сосудистым протезам

Точное повторение структуры нативной ткани/органа не всегда необходимо, однако, для получения функциональной конструкции, целесообразно, чтобы используемый протез обладал свойствами, максимально близкими к протезируемой ткани/органа. В 1950 г. Cumberland и Scales впервые сформулировали критерии идеального материала, которые со временем были дополнены новыми рекомендациями согласно требованиям современной хирургии. Имплантат не должен: изменять физических свойств (размягчаться, терять прочность, эластичность) в результате контакта с тканями, вызывать воспаления или отторжения, обладать канцерогенными свойствами, вызывать аллергию или сенсибилизацию; должен быть химически инертным, обладать достаточной механической прочностью, быть пригоден для стерилизации и фабричного изготовления [55;53;129].

Основные требования к современным протезам сосудов изложены в регламентирующих документах. К их числу относятся межгосударственные стандарты, включающие общие технические требования и методы испытаний, предъявляемые к сосудистым протезам - (ГОСТ 31514-2012; ГОСТ Р ИСО 7198-2013); оценку биологического действия медицинских изделий (ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009); исследование изделий, взаимодействующих с кровью (ГОСТ Р ИСО 10993-4-2009); методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» приказ № 280 от 12.10.2007г. и т.д. [17-20].

В соответствие с этими требованиями протез не должен иметь дефектов, истончений стенки, незакрепленных частиц, красителей и т.д., соответствовать требованиям биобезопасности (нетоксичный, неаллергенный, гемосовместимый, и т.д.). Кроме того он не должен иметь швов, особенно в зоне разветвления [35]. Согласно ГОСТ Р ИСО 7198-2013, физико-механические свойства сосудистого

протеза должны быть максимально приближены к свойствам естественного кровеносного сосуда. А именно: механическая прочность и эластичность близкая к эластичности стенок сосуда. Большое значение придается проницаемости, относительному удлинению материала, прочности и относительной деформации на разрыв, изменению диаметра при радиальном давлении, а также остаточной деформации. Протез должен хорошо стыковаться с сосудом, иметь тонкую, эластичную стенку, легко прокалываться атрауматичной иглой, его концы не должны "разлохмачиваться" [35].

В связи с наличием разных диаметров и типов (эластический, мышечный, мышечно-эластический) кровеносных сосудов в организме человека, определение точных оптимальных механических параметров трансплантатов остается открытым в настоящее время [83;108;134;139].

Биосовместимость трансплантата должна быть обеспечена химически нейтральным синтетическим волокном, если и вызывающего, то только минимальную местную доброкачественную реакцию тканей организма [35]. Для обеспечения гемосовместимости необходимо формирование на внутренней поверхности протеза нормального эндотелия. Протез должен обладать способностью транспортировать через стенку питательные вещества из крови, не «заполняться» тромбомассой и быть доступным для клеток, формирующих сосудистую стенку. С 60-х годов исследователи активно искали способы соединить в одном трансплантате такие свойства, как нулевая хирургическая проницаемость и высокая биологическая пористость для клеток. Большая проницаемость трансплантата способствует образованию гематом, которые организуясь, вызывают фиброз и уменьшение просвета протеза. Для устранения чрезмерной кровопотери и возможности проникновения клеток организма необходимо, чтобы стенка сосудистого заменителя была с количеством и величиной пор, пропускающих не более 50 см^3 воды за одну минуту через 1 см^2 синтетического материала под давлением 120 мм.рт.ст. [35]. Для оценки гемосовместимости необходимо определить влияния природы и структуры поверхности материала на процессы адсорбции белков, активации клеток и

факторов свертывания крови, как в статических, так и динамических условиях, используя кровь животного или человека [50].

По требованию ГОСТ Р ИСО 7198-2013 протез должен быть исследован *in vitro* и *in vivo* для оценки его безопасности, функционирования (с имплантацией трансплантата животному на срок в 20 недель и контролем его проходимости при помощи доплер. исследований и/или ангиографии). При полученных хороших результатах материал допускается к клиническому исследованию.

1.5 Преимущества и недостатки способов изготовления синтетических сосудистых протезов. Варианты использования метода электроспиннинга

Текстильные протезы (из полиэтилентерефталата (ПЭТ), он же Лавсан) имеют прочность на разрыв в 15-30 раз превышающую прочность нативных сосудов, они бывают трех основных типов: вязанные, тканые и плетеные [38]. Вязанные сосудистые протезы изготавливаются на специальных вязальных машинах [16]. Преимуществами таких трансплантатов является то, что они менее склонны к "разлохмачиванию" слоев, чем тканые и плетеные протезы, обладают хорошей эластичностью и гибкостью. Недостатком является их повышенная проницаемость, поэтому необходимо предварительное пропитывание кровью пациента («преклотинг») на операции (см. рис. 1 А) [35;85].

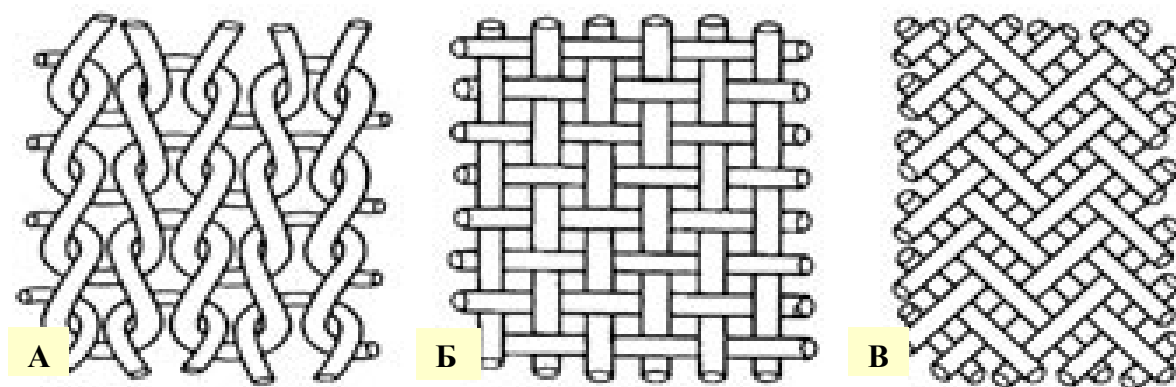


Рисунок 1. Схемы переплетений, используемых для изготовления протезов сосудов: Примечание: А) схема вязаного протеза; Б) схема тканого протеза; В) плетеного протеза [35].

Для производства тканых протезов используется ткацкий станок [66]. Их положительным качеством является уменьшение кровопотери через стенку протеза вследствие плотного переплетения нитей, однако отрицательный момент выражается в повышенной ригидности и жесткости (см. рис. 1 Б).

Плетеные протезы - занимают промежуточное положение между ткаными и вязаными ПКС. Они изготавливались на плетельных машинах, которые имеют различное количество веретен. При их имплантации отмечается небольшая кровопотеря. Они эластичны, растяжимы в продольном и поперечном направлениях, не перегибаются под острым углом, однако причиной их редкого использования являлась толстая и грубая структура стенки, а также "разлохмачивание" краев при разрезании (см. рис. 1 В) [35;38;151].

Для улучшения свойств текстильных протезов их поверхность обрабатывают гелеобразующими растворами, например растворами таких белков как коллаген, желатин с последующей химической фиксацией белкового слоя обработкой формальдегидом или глутаральдегидом. Такое покрытие сохраняется в организме от 2 недель до 2 месяцев, однако обладает антигенными свойствами, может вызывать аллергическую реакцию, а также способствовать адсорбции патогенных микроорганизмов [69;89;131]. Введение в покрытие трансплантата гепарина и замачивание в растворе антибиотиков дает кратковременный эффект в связи с быстрым вымыванием этих компонентов из стенки протеза [75; 114].

Нетекстильный тип протезов изготавливают из вспененного/растянутого политетрафторэтилена (ПТФЭ), которые имеют запас прочности в 3,5-5 раз больше по сравнению с нативными сосудами [38;151].

Синтетические протезы ПТФЭ и ПЭТФ – стабильные полимеры не деградирующие в биологических средах, поэтому изготовленные из них протезы не могут замещаться нативной тканью и, после установки, сохраняются в организме человека в течение всего времени эксплуатации.

Современным трендом в развитии протезирования сосудов является разработка и исследование биоразлагаемых ПКС, т.е. таких протезов, которые могут постепенно замещаться собственными тканями организма.

Однако, несмотря на очевидные преимущества, их использование в практической медицине может быть сильно ограничено, поскольку механическая прочность протезов сосудов является принципиальной характеристикой, а ее чрезмерное уменьшение совершенно недопустимо с точки зрения сохранения жизни и здоровья пациента [118;128;150].

В последние 5-7 лет для изготовления протезов все чаще используют электроспиннинг [73;96;110;130;152;154]. Электроспиннинг – технология, которая позволяет формировать нано- или микронити из растворов полимеров, подаваемых в электрическое поле. Раствор полимера подается из фильеры, являющейся одним из электродов в электрическое поле, сформированное между электродом-фильерой и электродом приемником. В электрическом поле капля полимера вытягивается с формированием нити, которая может быть уложена на плоский неподвижный электрод-коллектор или электрод-коллектор, выполненный в виде вращающегося стержня. При укладке волокна на вращающийся электрод формируется пористая трубка, состоящая из переплетенных нитей – аналог сосуда. С помощью изменения напряжения поля, скорости подачи и концентрации раствора, используемого растворителя электроспиннинг позволяет получать волокна толщиной от десятков нанометров до нескольких микрон, а благодаря различным способам их укладки материалы разнообразной макроструктуры с любыми значениями пористости и плотности [83;117; 128].

Преимуществами электроспиннинга как метода для изготовления протеза сосудов являются: высокая технологичность процесса, возможность изготавливать протезы сосудов разного диаметра и с разной толщиной стенки, высокая пористость и прочность получаемых 3Д матриксов, малые размеры волокна сравнимые с внеклеточным матриксом тканей человека, возможность получать материалы из разных синтетических полимеров, их смесей, смесей синтетических и биополимеров, смесей полимеров с биологически активными низко- и высокомолекулярными соединениями [82;95;128;134;135;149].

Варианты изготовления протеза кровеносного сосуда методом электроспиннинга описанные в литературе:

1. использование различных типов полимеров:
 - а) синтетические полимеры - поликапролактон, полиуретан, нейлон, полимолочная кислота, полигликолид;
 - б) биологические полимеры - желатин, коллаген I, III, IV типа, эластин, тропоэластин, хитозан и т.д.;
 - в) использование для изготовления стенки протеза нескольких синтетических или биологических полимеров [80;96;107;109;138;152].
 2. Модификация ультраструктуры стенки протеза:
 - а) создание одно- или многослойного протеза [70;95;128;146];
 - б) формирование слоев стенки протеза из синтетического и биологического полимеров, подаваемых одновременно или последовательно из двух (или более) разных фильер [79];
 - в) получение волокон, для изготовления протезов, внутренний и внешний слой которых состоят из разных полимеров (коаксиальное волокно, т.е. имеющее в своей структуре ядро и оболочку) [152];
 - г) формирование стенки протеза, используя одновременно свойства электроспиннинга и электроспрея [83];
 - д) создание слоев трансплантата путем центробежного литья и последующей укладки волокон, полученных электроспиннингом [145].
 3. Наполнение протезов лекарственными препаратами: антикоагулянты – гепарин, гирудин; антиагреганты – аспирин; цитостатики – паклитаксель; противовоспалительные или антибактериальные лекарственные вещества; факторы роста клеток, а именно ГМК, эндотелиоцитов [88;64;73;102].
 4. Заселение протеза эндотелиальными и гладкомышечными клетками [111].
- Вне зависимости от варианта электроспиннинга, пространство в объеме матрикса, занимаемое твердой фазой и пустое пространство не имеют замкнутых пустот.
- Очевидно, используемые для изготовления протезов сосудов полимеры должны быть нетоксичными, разрешенными к медицинскому применению, обеспечивать оптимальную механическую прочность протеза, удовлетворять

требованиям био- и гемосовместимости, и. т.д., т.е. тем требованиям, которые предъявляются к материалам, используемым для изготовления протезов сосудов.

1.6 Типы полимеров и способы улучшения их характеристик при создании протеза методом электроспиннинга

Одним из часто используемых синтетических полимеров является поликапролактон (ПКЛ). В ряде исследований отмечается его хорошая биосовместимость и отсутствие цитотоксичности [68;70;80;128;152]. Одним из вариантов изготовления сосудистого протеза малого диаметра методом электроспиннинга было использование 15 % ПКЛ (молекулярной массой - 80 г/моль) в растворе хлороформа со спиртом ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 7:3, по объему), при напряжении 20 кВт и скорости подачи раствора полимера 12 мл/час [70;117]. Полимер способен образовывать прочные и эластичные матриксы, что доказывает его прочность на разрыв, составляющая $4,1 \pm 0,5$ МПа, при исследовании на разрывной машине с постоянной скоростью растяжения 10мм/мин. Утечка воды через протез при давлении в 120 мм.рт.ст. составила 1,3 мл/мин/см². Однако при этом авторы исследования отмечают отсутствие кровотечения на момент имплантации протеза диаметром 2 мм в брюшную аорту крыс, что объясняется более высокой вязкостью крови и наличием факторов свертывания крови [117]. В эксперименте указывают на превосходство поликапролактона в отдаленные сроки наблюдения (12-18 недель) над широко используемым политетрафторэтиленом, что выражается в 100% проходимости протеза из ПКЛ и 67% из ПТФЭ, соответственно. Эти же авторы отмечают, что протез из поликапролактона предрасположен к более быстрой и однородной эндотелиализации внутреннего слоя, ускоренному процессу ангиогенеза, а также формированию менее развитой неоинтимы и кальцификации, чем протез из ПТФЭ [70]. Уже через 3 месяца после имплантации в брюшной отдел аорты крысы, отмечается покрытие протеза эндотелием на $90 \pm 5\%$,

что было подтверждено иммуногистохимически (Анти – CD34). В течение первых 6 месяцев после имплантации протеза отмечается рост внутреннего слоя в основном за счет увеличения количества гладкомышечных клеток (ГМК) встроенных в эластические и коллагеновые волокна. Через 12-18 месяцев авторы отмечают уменьшение ГМК и образование однородного монослоя эндотелиальных клеток [70;128]. В естественных условиях поликапролактон медленно деградирует с образованием воды, углекислого газа, капроновой кислоты (жирная кислота, присутствующая в различных животных жирах; небольшое количество содержится в крови человека и спинномозговой жидкости) [12]. Деградация полимера происходит в три последовательных шага: потеря молекулярной массы, потери прочности и потеря массы [12;117]. Заметное уменьшение молекулярной массы и фрагментация волокон наблюдались *in vivo* в образцах только через 18 месяцев, однако уменьшения толщины стенки, разрыва или аневризматического расширения трансплантата выявлено не было [128].

Полимер гидроксикислотной кислоты - полигликолид один из наиболее быстро деградируемых синтетических материалов в биологических средах. Растворив полимер в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол до 10% концентрации и используя параметры электроспиннинга: скорость подачи раствора 5 мл/ч и напряжение в 25 кВ, исследователи получили однородные волокна с диаметром $87,72 \pm 23,34$ нм. Этот материал отличался жесткостью и хрупкостью (цифровые данные в статье не указаны), что впрочем, может быть связано с характеристиками самого полимера [100]. В силу высокой скорости деградация полигликолида для изготовления 3Д матриц чаще используют сополимеры гликолиевой кислоты с другими гидроксикислотами, например: с молочной кислотой. Соплимер гликолиевой и молочной кислот (полилактид-ко-гликолид, ПЛГА) характеризуется более длительным временем биодеградация, которое увеличивается с увеличением процентного содержания молочной кислоты, степени полимерности, а также различается у D и L стереоизомеров [100;140].

Помимо выше перечисленных полимеров, большой интерес вызывают полиуретаны (ПУ) – обширный класс полимеров с различными физическими и

биологическими свойствами. Первоначальный опыт применения полиуретанов в медицине не имел успеха вследствие возникающих местных острых реакций (использовался коммерчески неочищенный образец полимеров), что было связано с гидролизом в среде живого организма сложных полиэфиров – уретанов [104;153]. При клинических испытаниях 8 из 15 протезов, имплантированных в бедренно-подколенную позицию, были окклюзированы в срок наблюдения до 1 года [153]. На смену, этим ПУ пришли простые полиэфир-уретаны с различными заместителями в уретановой группе, более стабильные, био- и гемосовместимые [143].

Группой авторов Takehisa Matsuda с соавт. [105], были исследованы трубки, изготовленные методом электроспиннинга из 15% раствора полиуретана в смеси тетрагидрофурана (ТГФ) с N, N-диметилформамидом (ДМФ). Скорость вращения коллектора была от 150 до 3400 оборотов в минуту, скорость подачи раствора полимера от 1 до 10 мл/ч и напряжение - 12,5 кВ. Увеличение скорости вращения коллектора и концентрации ДМФ способствовали повышению эластичности материала в продольном и радиальном направлении [90;105].

Исследователи из США (г. Филадельфия), Pimpon Uttayarat и соавторы [145], обратили внимание на то, что особый рельефный внутренний слой матрикса трансплантата стимулирует миграцию клеток эндотелия. Они использовали 5% ароматический полиэфир – уретан, растворенный в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол и напряжение в 12 кВ для создания гибридного 2-слойного протеза кровеносного сосуда. Внутренний слой был создан с помощью центробежного литья полимера на стержень, имеющий углубления. Слой имеет микродорожки, определяющие направление и скорейшее распространение эндотелиальных клеток. Наружный слой, изготовленный методом электроспиннинга, имел сетчатую структуру. Было отмечено, что полученный материал обладает прочностью в продольном направлении от $0,43 \pm 0,04$ до $2,00 \pm 0,40$ МПа, что сопоставимо с прочностью артерий исследуемого животного (кролик).

Один из способов повышения прочности или регулирования скорости биodeградации протеза во время эксплуатации – это одновременное использование комбинации разных типов полимеров для изготовления

3Д матриц [96;107]. В опубликованной работе С.М. Vaz с соавторами исследованы свойства трубчатого протеза с наружным диаметром 6 мм, имеющего двухслойное строение: внутренний слой из поликапролактона и наружный из поли-молочной кислоты (ПМК). При этом ПКЛ растворяли в хлороформе (CHCl_3), а ПМК в смеси CHCl_3 и диметилформамида. Исследование механических свойств материала, с помощью одноосного растяжения со скоростью 2 мм/мин, показало модуль Юнга для равный $30,9 \pm 6,6$ МПа. Для оценки биосовместимости, на полученных 3Д матриксах культивировали 2 вида клеток (фибробласты мыши и миофибробласты из вены человека) в статических условиях в течение 4 недель. Авторы отмечают, что на 14 день наблюдения можно обнаружить значительное увеличение количества клеток не только на поверхности материала, но и внутри матрикса. В заключении указывается, что двухслойная трубка имеет приемлемые характеристики, позволяющие рассматривать ее в качестве кандидата для протезирования артерий [146].

Биологические полимеры, в частности белки – коллаген, эластин, желатин, протеогликаны или полисахариды, как правило, включают в состав матрицы для повышения биосовместимости материала [69;89;131]. Получить матрикс методом электроспиннинга из коллагена I типа (выделенного из телячьей кожи) удастся только при концентрации белка 0,08 г/мл, и напряжении 25 кВ. Материал с перпендикулярной укладкой волокон обладал механической прочностью в $0,7 \pm 0,1$ МПа, что близко к прочности стенки кровеносных сосудов [107]. Учеными из США было проведено исследование матрикса изготовленного методом электроспиннинга из смеси полимеров, полученных путем растворения поликапролактона и коллагена I типа (1:1 по весу) в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол и имеющей общую концентрацию раствора 5%. Для изготовления протеза сосуда было использовано напряжение в 20 кВ, скорость подачи раствора из шприца 3мл/ч. Для увеличения стабильности и прочности материала ПКЛ/коллаген обрабатывали в 2,5% растворе глутаральдегида в течение 6 часов. При исследовании механических свойств смеси ПКЛ/коллаген с чистым поликапролактоном было обнаружено, что образец из ПКЛ обладает меньшим

относительным удлинением (13%), чем из ПКЛ с белком (58%) и меньшей прочностью на разрыв 0,4 МПа против 0,7 МПа. Протез из смеси поликапролактона с коллагеном выдержал большее давление изнутри по сравнению с чистым поликапролактоном: 155 мм.рт.ст. против 130 мм.рт.ст., соответственно. Для оценки гидрофильности материал взвешивали сухим, после чего погружали в воду на 30с. Далее вынимали из воды, осушали салфеткой и снова взвешивали. ПКЛ/коллаген обладает наибольшим поглощением жидкости, что объясняется гидрофильностью коллагена. При культивировании на поверхности матрикса отмечается хорошая адгезия и пролиферация эндотелиальных и гладкомышечных клеток [95].

Желатин – гидролизат коллагенов, который часто используется в тканевой инженерии. Ли и др. показали, что средний диаметр волокон при изготовлении 3Д матриксов методом электроспиннинга из растворов желатина и коллагена были похожи и составляли 200-500 нм. Также были похожи и их механические свойства: прочность на разрыв составляла 8-12 МПа [97]. Имплантируемые 3Д матриксы, включающие в свой состав помимо синтетического полимера еще и желатин, превосходили матриксы из синтетических полимеров в биосовместимости и активации клеточной пролиферации [80;82].

Была исследована серия матриксов изготовленных методом электроспиннинга из растворов желатина с полигликолиевой кислотой (ПГК). Содержание желатина в растворах составляло 10%, 30% и 50% от концентрации ПГК. Для их изготовления раствор подавали со скоростью 5мл/ч, напряжение электрического поля составляло 25 кВ. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что повышение концентрации желатина способствовало увеличению диаметра волокон от 133,77 нм (с 10% желатина) до $863,96 \pm 265,09$ (с 50% желатина). Плоский материал размером 60мм*10мм*0,2 мм проверяли на прочность. Было обнаружено, что с повышением концентрации желатина в стартовом растворе полигликолида приводит к увеличению прочности на разрыв и модулю Юнга. При этом для 10% концентрации желатина прочность на разрыв материала составила - 0,650 МПа;

модуль Юнга 32 МПа; относительное удлинение 32%, а при 50% концентрации желатина - прочность на разрыв была равна 1,9 МПа, модуль Юнга 72 МПа и относительное удлинение 6% [82].

Для сравнения свойств материалов полученных из растворов желатин/поликапролактон и коллаген I типа/поли L-лактид/поликапролактон (ПЛКЛ) были использованы растворы синтетического и биологического полимеров в соотношении 1:1 (по весу). С помощью метода электроспиннинга было изготовлено 2 типа материалов. Первый представлял собой 3Д матрикс из раствора желатин/ПКЛ в 2,2,2-трифторэтаноле (ТФЭ) с добавлением небольшого количества уксусной кислоты (0,2% по отношению ТФЭ) - 10% общей концентрацией полимеров. Вторым являлся 8% раствор коллагена/ПЛКЛ в гексафторизопропанол. Волокна диаметром $386,9 \pm 102,5$ нм из желатин/ПКЛ были получены при подаче раствора со скоростью 2мл/ч и напряжении 10 кВ. Волокна из коллагена I типа/ПЛКЛ диаметром $301,8 \pm 97,3$ нм получали при подаче раствора со скоростью 1мл/ч и напряжении 5 кВ. Сравнение прочности материалов на разрыв проводили до и после имплантации подкожно мышам. Модуль Юнга был определен как $1,49 \pm 0,06$ МПа для 3Д матриксов из желатин/ПКЛ и $1,77 \pm 0,09$ МПа для матриксов из коллаген/ПЛКЛ. Через шесть недель после имплантации, значение прочности для матрикса из желатин/ПКЛ снизилось до $0,75 \pm 0,15$ МПа, что свидетельствует быстрой деградации желатина и слабом формировании ткани. Модуль Юнга для каркасов коллаген/ПЛКЛ через 6 недель после имплантации увеличился до 5.99 ± 0.80 МПа, что произошло, скорее всего, из-за усиленного образования ткани. Авторы в исследовании *in vitro*, отмечали, что к матриксам обоих типов хорошо адгезировали гладкомышечные клетки (и пролиферировали на их поверхности), что подтверждает отсутствие токсичности и хорошую биосовместимость матриксов. Авторы отмечали, что на поверхности 3Д матрикса второго типа формировался более однородный слой клеток [80].

Mengyan Li и др. [97], было показано, что образование волокон методом электроспиннинга из альфа-эластина (выделенного из вейной связки крупного

рогатого скота) и рекомбинантного тропоэластина возможно только при 20% концентрации полимера и напряжении на капилляре – 10 кВ. При этом механическая прочность материала при растяжении в продольном направлении составила 1.6 МПа для альфа-эластина и 13 МПа для тропоэластина, а модуль Юнга - 184 ± 98 МПа и 289 МПа, соответственно.

Исследователями из США [109] была продемонстрирована возможность использования предшественника эластина - рекомбинантного человеческого тропоэластина, в качестве одного из улучшающих составляющих 3Д матрикса, изготовленного методом электроспиннинга. Материал был получен из 15% раствора тропоэластина в 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропаноле. Электроспиннинг проводили при напряжении 18,5 кВ, скорости вращения коллектора 4400 об/мин, скорости подачи раствора 2мл/ч. Одноосные испытания на растяжение продемонстрировали средний предел прочности на разрыв $0,36 \pm 0,05$ МПа, модуль упругости в пределах $0,15 \pm 0,04$ и $0,91 \pm 0,16$ МПа. Конфокальные снимки материала, полученного из тропоэластина и сделанные после 48 ч культивирования, показали хорошее прикрепление и рост эндотелиальных клеток (полученных из свиного костного мозга) к волокнам матрицы, которые образовывали плотный монослой. В исследовании выполненном Steven G. Wise с соавт.[149] также были продемонстрированы данные, свидетельствующие о хорошей гемосовместимости, адгезии и пролиферации клеток на 3Д матриксах из 10% тропоэластина и поликапролактона.

Была предпринята попытка получения 3Д матриксов из смеси - поли (D, L-лактид-ко-гликолида) (40%), колагена I типа (45%) и эластина (15%) в 1,1,1,3,3,3 - гексафтор-2-пропаноле. Для формирования волокна использовали напряжение 25 кВ, скорость подачи раствора 3 мл/ч, скорость вращения электрода-коллектора 500 об/мин. Полученный материал обрабатывали в течение 2 часов 1% глутаральдегидом и отмывали в физиологическом фосфатном буферном растворе (ФБР). Авторы отмечают, что трансплантат способен выдерживать давление в 1425 мм.рт.ст, что в 12 раз превышает систолическое давление

в природном кровеносном сосуде, а также способствует росту, пролиферации гладкомышечных и эндотелиальных клеток *in vitro*. Для оценки биосовместимости - материал имплантировали мышам подкожно. По окончании исследования не наблюдалась, каких либо изменений характерных при токсическом воздействии: все животные остались живы, изменения жизненно важных органов или показателей крови не было выявлено [140].

Помимо решения вопроса о снижении риска тромбоза трансплантата в послеоперационном периоде необходимо еще и создавать такие конструкции, чтобы свести к минимуму образование неоинтимы. Кроме технических особенностей операции, природных свойств используемого трансплантата, возможно включение в стенку ПКС лекарственных средств, которые обеспечат местное противовоспалительное и антипролиферативное действие. А изменяя состав полимерной композиции можно регулировать скорость высвобождения препарата из волокон с заданной скоростью.

Было выполнено сравнение матриц без добавления и включающих антитромботические вещества. В качестве контроля была микроволокнистая трубка диаметром в 1 мм, изготовленная из 20 % поли-(L-молочной кислоты) растворенной в 1,1,1,3,3-гексафтор-2-пропанол. Гирудин (полипептид, полученный из пиявки, который является мощным ингибитором тромбина) был введен в матрикс, состоящий из смеси поли-(L-молочной кислоты) с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Эти протезы были имплантированы в правую общую сонную артерию крыс. Данные ультразвукового исследования и результат анализа эксплантированных протезов через месяц наблюдения показали, что проходимость трансплантатов, содержащих гирудин составляет 83%, а без него только 50%. При исследовании механических свойств протеза содержащего гирудин: исходно (без имплантации) модуль упругости был равен 3,5 МПа, а через 6 месяцев наблюдения *in vivo* составил 11,1 МПа, что свидетельствует о значительной реконструкции протеза в естественных условиях [64]. Подобные результаты, характеризующие пониженную адгезию/агрегацию тромбоцитов, демонстрировал сосудистый протез,

содержащий аспирин [73]. В исследовании были предложены три различные концентрации препарата (1,5 и 10% вес/вес). Волокнистая структура четко прослеживалась для всех трансплантатов, однако увеличение концентрации аспирина (5 или 10% вес/вес) приводило к нарушению микроструктуры и появлению больших слитых волокон. Количество высвобождаемого препарата (которое исследовали путем погружения ПКС в натрий-фосфатный буфер, при температуре 37°C) напрямую зависело от его концентрации в протезе, причем фаза устойчивого высвобождения достигалась уже через 50 часов. Для исследования адгезии тромбоцитов на внутренней поверхности экспериментальных ПКС, их инкубировали в плазме с большим содержанием тромбоцитов (центрифугирование крови из пуповины на 120 об/мин в течение 10 мин) в течение 2 и 6 ч, после чего исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Авторы отмечают, что в связи с ухудшением структуры материала связанного с добавлением аспирина количество осажденных тромбоцитов через 2 часа было больше (т.к. лекарственное вещество не успевало выделяться), чем у протезов без аспирина. Однако через 6 часов количество высвобожденного препарата уже напрямую зависело от его концентрации в материале и тромбоциты адгезировали к нему существенно хуже, чем к материалу без аспирина.

Одним из вариантов волокон, которые можно изготавливать методом электроспиннинга являются коаксиальные волокна [88;152]. Примером использования таких волокон является 3Д матрикс, в котором ядро волокон состоит из 25% гепарина, а наружная оболочка из поли-L-лактида с поликапролактоном. Полученный материал был оценен *in vitro* и *in vivo*. Наличие пористой структуры позволяет выполнить заселение матрикса эндотелиальными и/или гладкомышечными клетками, которые потенциально способны полностью имитировать заменяемую ткань и быстро регенерировать повреждение [152]. Было показано, что клетки, проникая в стенку пористой матрицы, могут располагаться в порах, где активно делятся, и вырабатывают внеклеточное вещество, состоящее из коллагеновых волокон,

которое впоследствии замещают полимерные волокна матрикса [68]. Прочность клеточно-заселенного трансплантата из коаксиальных волокон, была сопоставима с прочностью бедренной артерии собаки. При исследовании *in vivo* авторы отмечали хорошую проходимость протеза в течение 24 недель – 89% против 12,5 % в контрольной группе (без предварительной эндотелиализации) [152].

Хорошие результаты были получены и при использовании антипролиферативного вещества – паклитакселя, который в малых дозах по типу митотического ингибитора (путем его связывания с β -субъединицей тубулина, приводит к блокированию митотического цикла на G2/M стадии), ограничивает рост неоинтимы и следовательно снижает риск стеноза трансплантата [60;76;99]. В 2009г было проведено исследование протезов кровеносных сосудов с внутренним диаметром 2 мм, длиной 4 см, изготовленных методом электроспиннинга из поликапролактона (7,5, 9 и 12% [вес/объем]) и содержащих разные концентрации паклитакселя (0,25, 0,5, 0,75 и 1% [вес/вес]). После завершения электроспиннинга все протезы сушили под вакуумом в течение ночи при 37° С, стерилизовали γ -излучением дозой 25кГр. Степень и эффективность внедрения лекарственного вещества были оценены с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения. Скорость высвобождения паклитакселя исследовали путем погружения трансплантатов в пробирки с фосфатно-буферным раствором (рН 7,4), содержащим 0,05% (объем/объем) Твин 20, хранили при 37°С с вращательным перемешиванием 100 об/мин в течение 1, 5 и 16 часов и 1, 6, 8, 12, 14, 16, 20 и 27 дней. В каждый момент времени для количественного измерения концентрации лекарственного вещества забирали 1 мл среды, в оставшуюся среду добавляли свежий буфер для поддержания условий инкубации. В результате было отмечено, что процесс высвобождения препарата характеризуется наличием 3 фаз: 1 фаза - «всплеска» около 20% введенного паклитакселя в течение нескольких часов; 2 фаза - «замедленного диффузного высвобождения» длится до 22 дней и 3 фаза – «заключительный этап» с очень медленным высвобождением остаточного лекарственного вещества. Для исследования *in vivo* было выполнено

сравнение протезов из ПКЛ и протезов из 12% поликапролактона (вес/объем) и 0,75% паклитакселя. Протез с внутренним диаметром 2 мм был имплантирован в брюшной отдел аорты крысы на 3, 12 и 24 недели. По результатам исследования (в котором было задействовано 18 крыс породы Sprague-Dawley) через 3 и 24 недели отмечается 100% проходимость протезов, однако на всех запланированных сроках наблюдения для ПКС с паклитакселем было характерно формирование более тонкой неоинтимы (меньше слоев клеток и эластических волокон) по сравнению с протезом из поликапролактона без этого лекарственного вещества [87].

Принимая во внимание трехслойное строение артерии, было предложено использовать эту модель и при создании протеза кровеносного сосуда. Протез сосуда, имеющий многослойное строение был изготовлен методом электроспиннинга с одновременной подачей растворов из 2-х капилляров. Из 1-ого подавали раствор синтетических полимеров, а из 2-ого – биополимера (желатина). В качестве внутреннего слоя с атромбогенной поверхностью был использован слой из полиэтиленгликоля, с фактором роста тромбоцитов и волокон желатина. Средний слой - каркас, состоял из полилактид-ко-гликолида с фактором роста эндотелия сосудов и волокон желатина. Наружный слой – поликапролактон с волокнами желатина обеспечивающий хорошую интраоперационную прочность, и позволяющий контролировать рост тканей. По результатам исследования отмечалась инкапсуляция факторов роста со случайным распределением в составе волокна, быстрое их высвобождение до 50% в течение первых 10 дней с последующим замедлением процесса. Также, отмечается, что такой протез обладает большей прочностью на разрыв по сравнению с коронарной артерией кролика.

При имплантации материала в позицию сонной артерии кролика, протез показал хорошую проходимость в течение 8 недель. Протез, содержащий оба фактора роста, способствует формированию более тонкого и равномерного внутреннего слоя по сравнению с протезом, который не содержит факторы или включает только один из факторов [79].

1.7 Резюме

Анализ литературных данных демонстрирует, что аутооттрансплантаты продолжают оставаться лучшим материалом, используемым для протезирования сосудов. Однако по разным причинам их использование не всегда возможно, что стимулирует разработку новых сосудистых протезов.

Большое количество экспериментальных и клинических исследований различных видов биологических и синтетических заменителей кровеносного сосуда свидетельствуют о том, что проблема артериальных протезов малого диаметра (а именно диаметром менее 6 мм) будет актуальной еще длительное время.

Разработка протеза из синтетических/биологических полимеров методом электроспиннинга является актуальной задачей сосудистой хирургии. Несмотря на интенсивные теоретические и экспериментальные исследования в этой области, необходимо отметить отсутствие системного подхода и результатов, которые были бы выполнены в соответствии с требованиями регламентирующих документов, или хотя бы соответствовали им в общем виде. В связи с этим данные разных работ трудно сопоставить, они не позволяют получить полной и однозначной картины, ясно продемонстрировать преимущества или недостатки того или иного типа протезов.

Становится очевидным, что необходимые сведения можно получить только в результате сравнительного исследования протезов разных типов, выполненного с использованием современных методов, и достаточной статистической базой.

Ряд вопросов остаются мало исследованными, равно как и ряд очевидных технических решений до сих пор не реализованны. В частности авторы, использующие многослойные протезы никак не исследуют стабильность стенки, хотя известно, что материалы из полимеров с разными механическими свойствами в условиях длительной циклической нагрузки склонны к расслоению. Не определена оптимальная пористость сосудистых протезов, не используются очевидные варианты ее регулирования. При этом пористость, очевидно, играет ключевую роль в неоваскуляризации и эндотелиализации сосудистого каркаса.

Не исследовано поведение протезов после длительной циклической гидравлической нагрузки, не приведены количественные характеристики проницаемости протезов, неоинтимы, клеточного заполнения.

Представленная работа содержит данные отвечающие на часть вышеобозначенных «белых пятен» в исследовании протезов сосудов малого диаметра. В частности предложены сосудистые заменители принципиально нового типа с малопроницаемым внутренним слоем, выполнены механические испытания матриксов разных типов, проведены стендовые испытания, выполнен весь комплекс сравнительного исследования протезов сосудов разных типов, имплантированных в брюшную аорту крыс. Результаты исследования позволяют рекомендовать протезы сосудов с малопроницаемым внутренним слоем для клинического исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая структура эксперимента

Для достижения цели и решения поставленных задач была намечена схема экспериментального исследования (см. рис. 2).



Рисунок 2. Схема экспериментального исследования

Основную часть работы, а именно, разработку протокола изготовления протезов кровеносного сосуда, процесс электроспиннинга, обзорную микроскопию выполняли 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 и часть гистологических окрасок на базе ФГБУ ННИИПК «им.ак. Е.Н.Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии под руководством доктора медицинских наук, профессора Карпенко А.А. и кандидата биологических наук Сергеевича Д.С.

Исследование физико-механических параметров трансплантатов осуществляли с участием Центра коллективного пользования «Механика» при институте Гидродинамики Сибирского отделения Российской академии наук им. М.А. Лаврентьева СО РАН при участии кандидата технических наук, Юношева С.А.

Оценку проходимости протезов методом Магнитно-резонансной томографии выполняли на базе SPF-вивария ИЦИГ СО РАН в сотрудничестве с к.б.н., Акуловым А.Е.

Окраску препаратов на кальций выполняли в Новосибирском НИИТО им. Я.Л. Цивьяна под руководством главного научного сотрудника функциональной группы патоморфологии и теоретических исследований в вертебродологии, доктора медицинских наук, профессора Зайдман Аллы Михайловны.

Иммуногистохимический анализ препаратов протезов выполняли в Центре коллективного пользования микроскопии ИЦИГ СО РАН в сотрудничестве с к.б.н., Захаровой И.С. и к.б.н., Шевченко А.И..

2.2 Разработка протокола изготовления протезов

Изготовление сосудистых протезов осуществляли при помощи установки для электроспиннинга NF-103 (Месс. СО, Япония).

В процессе исследования выполнялся подбор оптимальных параметров электроспиннинга для создания сосудистого протеза путем изменения: расстояния между фильерой и электродом-коллектором (внешний диаметр коллектора 1,7 мм) – 10÷25 см; скорости подачи полимера – 0,5÷2 мл/мин; напряжения – 15-25 кВ; скорости вращения электрода-коллектора – 300 об/мин. Электроспиннинг проводили при комнатной температуре в термостатируемой комнате (23÷25°C).

В результате были определены и использованы для изготовления экспериментальных ПКС следующие параметры электроспиннинга: расстояние между фильерой и электродом-коллектором (внешний диаметр коллектора 1,7 мм) - 20 см; скорость подачи полимера - 1,5 мл/мин; напряжение - 23 кВ; скорость вращения электрода-коллектора – 300 об/мин. Электроспиннинг проводили в термостатируемой комнате с постоянной температурой - 23°C. Общий объем раствора синтетических полимеров затраченных на один протез был равен 0,5 мл.

В работе использованы синтетические полимеры, такие как 5-7% поликапролактон (ПКЛ, Sigma, США, № кат. 440744), 10% раствор сополимера молочной и гидроксипропановой кислот (Lactel, США, № кат. 1132-63-01, полилактид-ко-гликолид, ПЛГА) и биологический полимер 2-10% желатин из кожи свиньи (Sigma, США, № кат. G2500-100G). В качестве растворителя полимеров использовали 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (Sigma, США, № кат. 105228-100G, ГФИП).

Изготовлены 3 типа протезов сосудов, представляющие собой трубку с внутренним диаметром 1,7 мм и длиной 80 мм, которые были разделены на сегменты необходимой длины в рамках исследования:

1. Протез из поликапролактона (7%,w/v) растворенного в ГФИП (протез из ПКЛ) (см. рис. 3 А).

Подготовка раствора для электроспиннинга: В 7 мл ГФИП растворили 490 мг ПКЛ при перемешивании и комнатной температуре.

2. Протез из поликапролактона (5%,w/v) с 10 % желатином (w/w), растворенных в ГФИП и имеющий малопроницаемый внутренний слой (мпвс) (протез ПКЛ с желатином и мпвс) (см. рис. 3 Б).

Подготовка раствора для электроспиннинга: для введения желатина в состав полимерной нити, предварительно были подготовлены растворы белка и синтетических полимеров. Раствор из поликапролактона (5%,w/v) получали путем перемешивания/растворения 350 мг ПКЛ в 6 мл ГФИП при комнатной температуре. Перед процессом электроспиннинга добавляли 1 мл 10% раствора желатина заранее растворенного в ГФИП.

3. Протез из поликапролактона (5%,w/v) с 10 % желатином и с внутренним слоем из 10% ПЛГА с желатином и малопроницаемым внутренним слоем, изготавливали аналогично п.2., используя заранее приготовленные растворы полимеров (см. рис. 3 В).

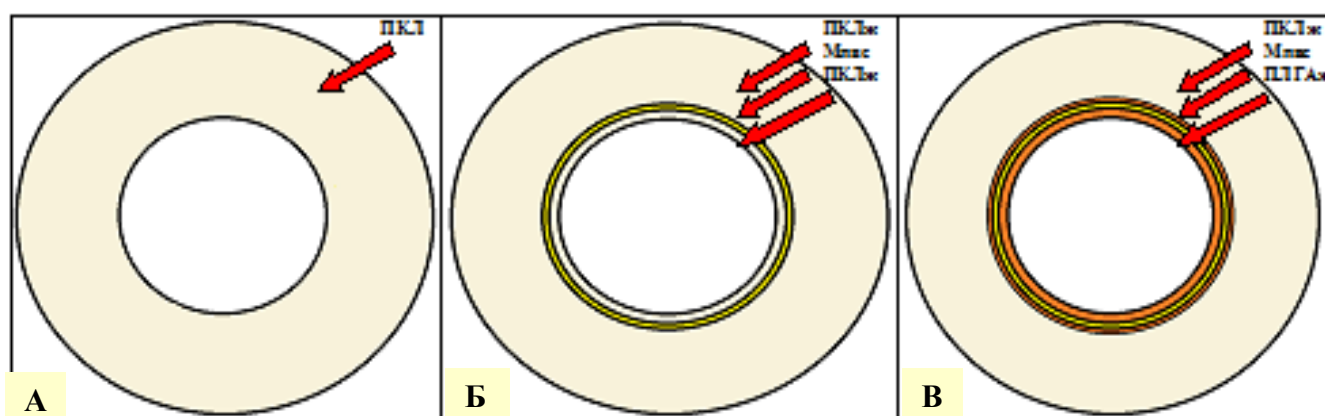


Рисунок 3. Варианты исследуемых сосудистых протезов.

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

Малопроницаемый внутренний слой протезов для 2 и 3 типа протезов изготавливали следующим образом. На электрод-коллектор электроспиннингом сначала наносили 10% требуемого для формирования протеза объема раствора (ПКЛ с желатином для 2 типа протеза; ПЛГА с желатином для 3 типа протеза).

Затем останавливали процесс электроспиннинга и поверхность волокон наносили 0,044 мл нагретого до температуры 37°C 2% водного раствора желатина, распределяя его равномерно с помощью стерильной кисточки. Далее процесс электроспиннинга возобновляли в том же режиме до израсходования запланированного объема раствора (ПКЛ с желатином для 2 и 3 типов протезов). По завершению электроспиннинга ПКС снимали с электрода-коллектора. Экспериментальные протезы, содержащие желатин инкубировали в растворе, содержащем 0,05 М гидрокарбонат натрия (NaHCO_3) pH 9.0 в течение 5 минут, затем 2 часа в 2% растворе глутарового альдегида (Sigma, США, № кат. G5882) в этом же буфере (Fluka, Швейцария, № кат. 49626). По окончании инкубации в реакционную смесь вносили 1/10 объема 0,1 М раствора, содержащего глицин (ICN, США, № кат. 808831), оттитрованный соляной кислотой (глицин/HCl) до pH=9.0, инкубировали в течение 20 минут, затем, внесли 1/10 объема раствора боргидрида натрия (NaBH_4) (Sigma, США, № кат. 71320) в концентрации 4 мг/мл и инкубировали еще 20 минут. Заготовку протеза сосудов от избытка реагентов отмывали трехкратной сменой апиrogenной дистиллированной воды (по 5 минут, 5-10 мл на один протез/одну смену), один раз апиrogenной дистиллированной водой (полученной на установке aurium 611VF, Sartorius, США) с 2% глицерином (Sigma, США, № кат. G8898). Готовые протезы сосудов высушивали в установке для вакуумной сушки (mlv LGA 05, Германия) в стерильных условиях.

2.3 Исследование физических свойств протезов сосудов, стендовые испытания

Для исследования ультраструктуры матриц, образцы контрастировали напылением 10 нм золота и регистрировали изображение с помощью электронной микроскопии JSM-6460 LV (Jeol, Япония). Эту работу выполняли в Отделе физико-химических методов Института катализа СО РАН.

Прочность изготовленных протезов сосудов на разрыв (не менее 3 образцов) исследовали в условиях динамической нагрузки со скоростью 10 мм/мин на испытательной машине Zwick/Roell Z100 (Германия) согласно ГОСТ 270-75.

Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении до разрыва. Упруго - деформирующие свойства (способность возвращать прежнюю форму после деформации) анализировали по относительному удлинению до нарушения целостности материала. Для уточнения данных деформационной диаграммы, полученной на испытательной машине, дополнительно определяли прочность в области упругой деформации в условиях статической нагрузки, варьируя прикладываемое усилие с шагом 10 г. Для измерения остаточной деформации после статической нагрузки использовали оптический микроскоп МИР-2 ($\times 15$), который позволяет измерять остаточную деформацию образца материала с точностью 70 микрон.

Прочность на передавливание измеряли по сдавливанию участка протеза сосуда длиной 1 см между двумя плоскими параллельными поверхностями с оптическим контролем просвета сосуда (до контакта стенок протеза) при помощи оптического микроскопа МИР-2 $\times 15$. Нагрузку увеличивали с шагом в 2 грамма.

Прочность материалов на прорыв нитью измеряли, как описано в литературе [130]. Для этого один край протеза 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.

Проницаемость протезов определяли на испытательном стенде, согласно ГОСТ-Р 51566-2000. 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).

Экспериментальные ПКС исследовали в условиях гидродинамической нагрузки на установке, состоящей из гидравлического и электронного блоков управления клапанами с перепадом давления от 200-100 мм.рт.ст. (на входе и выходе) (см. рис. 4).



Рисунок 4. Общий вид установки для гидродинамического испытания протезов сосудов.

Примечание: 1-испытываемый протез сосуда, 2, 3 - впускной и выпускной клапаны, 4 - накопительный резервуар с предохранительным клапаном для подачи раствора, 5 - накопительный резервуар–приемник, 6 – электронный коммутатор, 7- программа управления клапанами 8- Регуляторы-измерители давления, 9-Микроскоп МИР-2 ($\times 15$).

Время каждого этапа цикла и их количество программировалось одинаково для всех типов протезов (т.е. время подачи и удержания давления в протезе, сравливания давления и т.д.). Последовательное открывание впускного и выпускного клапанов позволяло имитировать гидравлическую нагрузку, испытываемую сосудом в организме. Открытие впускного клапана (при закрытом выпускном) выравнивало давление жидкости в сосуде с давлением в накопительном резервуаре, затем впускной клапан закрывался, открывался выпускной клапан, что приводило к сбросу избыточного давления в протезе и его выравниванию с давлением во втором накопительном резервуаре. Точность поддержания давления в резервуарах составляла ± 2 мм.рт.ст. Клапаны принудительно открывали и закрывали поток жидкости, имея минимальный внутренний объем (меньше 5 мкл) и, таким образом, их срабатывание не приводило к дополнительному ударному воздействию на гидравлическую систему. Протезы исследовали после 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 циклов нагрузки при перепаде давлений 200/100 мм.рт.ст.

2.4 Экспериментальная часть *in vivo*

2.4.1 Набор животных для исследования

Работа была выполнена на 45 лабораторных крысах линии Wistar, со средним возрастом $6,8 \pm 0,15$ месяцев и средней массой тела 440 ± 40 г.

Все процедуры с животными выполняли в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977г. №755 и приложения к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977г.), с соблюдением принципов Хельсинской декларации ВМА (2000). Животных содержали в стационарных условиях вивария с естественным световым режимом, на стандартной лабораторной диете и свободным доступом к воде. 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.

Всем животным выполняли хирургическое вмешательство "Имплантация экспериментального сосудистого протеза в инфраренальный отдел аорты" в стерильных условиях операционной (см. рис. 5,6). На каждый срок наблюдения (2-е; 4-и и 20-ть недель) были имплантированы по пять образцов одного из типов экспериментальных протезов. По завершению хирургического вмешательства и после пробуждения животного от наркоза его помещали на 2 дня в отдельную клетку с соответствующим послеоперационным уходом. Первые 3 дня после хирургического вмешательства для профилактики тромбоза протеза 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 "Забор исследуемого материала" используя наркоз, а также релапаротомию, выделение и иссечение протеза с захватом 5 мм аорты от анастомозов по описанной схеме в разделе 2.4.2.

Выведение животных из эксперимента осуществляли сразу после забора экспериментального протеза (не дожидаясь пробуждения от наркоза) путем использования двукратной дозы наркотической смеси с последующей стремительной декапитацией.

2.4.2 Процедура имплантации экспериментального протеза

В качестве премедикации (для уменьшения секреции слюнных и бронхиальных желез) использовали 0,1% - 0,1 мг/кг атропин, внутримышечно. Введение в наркоз осуществляли путем внутрибрюшинной инъекции смеси растворов КсилаВет (Pharmamagist Ltd, Венгрия), золетила (Virbac Sante Animale, Франция) и 0.9% раствор NaCl (Красфарма, Россия), из расчета: 0,3 мг КсилаВет, 15 мг золетила на кг веса и 0,5 мл физ. раствора. Затем после утраты болевой чувствительности и наступления сна, животное фиксировалось на операционном столе в положении на спине. С помощью бритвенного станка удалили шерсть с передней брюшной стенки (см. рис. 5).



Рисунок 5. Подготовка к операции: наркоз и фиксация животного.

Обработав операционное поле антисептическим средством (10% Betadine), доступ к брюшной аорте выполняли по срединной линии живота.

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

Для лучшей визуализации области формирования анастомозов, а также защиты от случайной травмы нижней полой вены был использован стерильный латексный материал треугольной формы.

Перед пережатием аорты подкожно однократно вводили 100 ЕД гепарина. После позиционирования зажимов, выполняли поперечное пересечение аорты на 5-10 мм ниже почечных артерий и выше аорто-подвздошной бифуркации (см. рис. 6 А, Б). С помощью мононити Primelen 8.0 с атравматической иглой формировали проксимальный, а затем дистальный анастомозы 8-10 узловыми швами. Сначала протез к аорте фиксировали по боковым стенкам, далее по задней и передней стеке, а после прошивали между фиксирующими швами (см. рис. 6в). Сняв зажимы с аорты, осуществляли контроль гемостаза. На заключительной стадии выполняли послойное ушивание операционной раны с последующей обработкой швов антисептическим средством.

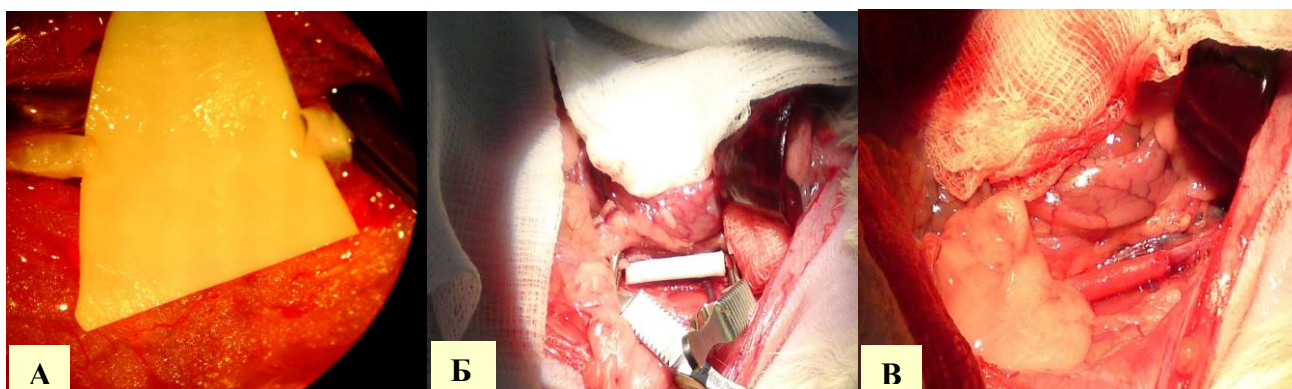


Рисунок 6. Этапы операции, 4 – кратное увеличение операционного микроскопа ОРМИ PICO (Carl Zeiss, Германия).

Примечание: А) позиционирование зажимов и пересечение аорты; Б) позиционирование протеза; В) поток крови по протезу.

2.4.3 Оценка проходимости сосудистого протеза

За проходимостью протезов следили, фиксируя в них объемную скорость кровотока на 4 неделе от хирургического вмешательства и перед выведением животных из эксперимента (20 неделя наблюдения) методом магнитно-резонансной томографии с использованием «BioSpec 117/16USR» (Bruker, Германия). При этом было выделено пять областей: 1) аорта проксимальнее

имплантированного протеза; 2) на уровне проксимального анастомоза; 3) середина протеза; 4) на уровне дистального анастомоза; 5) аорта дистальнее протеза. Для выполнения этого контрольного обследования потребовалось использование средства для ингаляционного наркоза - 2% изофлуран в сочетании с кислородом, подача которого животному была через маску. Осложнений во время исследования не было.

Оценку средней линейной скорости кровотока (ЛСК) в протезе выполняли с помощью диагностической ультразвуковой системы Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Ultrasound, Израиль; регистрационное удостоверение ФСЗ 2010/06618 от 13.04.2010) перед "Забором исследуемого материала" на сроках наблюдения: 4 и 20 недель. А также дополнительно были определены показатели ЛСК у контрольной группы животных (5 крыс линии Wistar, которым не был имплантирован протез). Точками исследования были: зона перед проксимальным анастомозом между аортой и протезом, середина протеза и зона сразу после дистального анастомоза.

2.4.4 Исследование морфологического строения сосудистого протеза

Макроскопический анализ, а именно состоятельность анастомозов, наличие деформаций протеза 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 протезы сосудов промывали при помощи инсулинового шприца небольшим количеством физиологического раствора, после чего фиксировали в 10% 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 протезов. 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 определения степени клеточного наполнения экспериментальных протезов сосудов мы использовали обзорную флуоресцентную микроскопию. Для этого были подготовлены продольные и поперечные срезы макропрепаратов, включающие зону анастомоза с аортой и середину имплантированного трансплантата ($\frac{1}{4}$ каждого протеза). Препараты в течение 5 минут 3-хкратно промывали в фосфатно-солевом буферном растворе, окрашивали в течение 20 минут SYBR Green I (Life technologies, США) при разведении красителя 1:10000 в физ. растворе, избыток красителя удаляли отмывкой 3-мя сменами физ. раствора в течение 5 минут.

Для гистологического и иммуногистохимического анализа эксплантированных протезов сосудов изготавливали серийные поперечные киосрезы с толщиной 10 мкм, используя криостат «Microm» HM-550 (Carl Zeiss, Германия). Срезы хранили в холодильной камере при температуре -18°C .

Гистологическое исследование препаратов проводили с помощью окраски веществ сочетающих основной и кислый красители, а именно гематоксилином (Biovitrum, Санкт-Петербург) и эозином (Bio-Optica, Италия, № кат. 05-11007) для определения основных структурных составляющих элементов препаратов экспериментальных протезов: клеточного наполнения трансплантатов и неклеточных структур, а также определения наличия признаков воспаления. Окраска по методу фон Косса (Bio-Optica, Италия, № кат. 04-170801) выполняли для определения депозитов кальция в образцах протезов путем реакции замещения ионов серебра на кальций с формированием солей серебра с последующим восстановлением серебра до металла и его визуализацией.

Для выявления коллагеновых и эластических волокон, форменных элементов крови, таких как эритроциты, была выполнена окраска срезов ПКС по методу Пикро-Маллори (Bio-Optica, Италия, № кат. 04-021822).

Окрашенные стекла (Termo scientific Superfrost Plus, № кат. 013014) высушивали и заключали под покровное стекло при помощи среды Bio Mount (Bio-Optica, Италия, № кат. 05-BM500). Для оценки полученных препаратов использовали микроскоп AxioVision FL-40 с программным пакетом AxioVision 3.1 (Carl Zeiss, Германия).

2.4.5 Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимического исследования препараты, зафиксированные в 4% формальдегиде (Sigma, США) споласкивали физ. раствором и инкубировали в растворе 125 мМ глицина в физ. растворе для блокирования оставшихся альдегидных групп в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере. После препараты отмывали физ. раствором 2 раза по 30 минут при комнатной температуре на шейкере и инкубировали (только для препаратов протезов) в течение 1 часа при комнатной температуре в 20% сахарозе и в течение ночи при +4°C в 30% сахарозе для восстановления структуры. Затем препараты отмывали физ. раствором 2 раза по 30 минут при комнатной температуре. Препараты пермеабелизовали инкубацией в 0,1% растворе детергента Triton X-100 в физ. растворе в течение 1 часа (0,1% -для препаратов протезов и 1% для срезов протезов). Отмывали физ. раствором 2 раза по 30 минут при комнатной температуре.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов антителами к характерным маркерным белкам - их инкубировали в блокирующем буфере – 1% растворе бычьего сывороточного альбумина на физ. растворе в течение 30 минут и затем с первичными антителами 1 в течение ночи при +4°C. Избыток первичных антител отмывали физ. раствором 2 раза по 15 минут при комнатной температуре и инкубировали препараты с флуоресцентно-мечеными видоспецифическими антителами в течение 1 часа в темной влажной камере

при комнатной температуре; разведение антител использовали в соответствии с рекомендациями производителя. В нашей работе мы использовали антитела: маркер эндотелиальных клеток - anti-CD31 (Abcam, США, № кат. ab64543), маркер гладкомышечных клеток - anti- α -sma (Dako, США, № кат. M0851), маркеры секретируемого межклеточного матрикса - anti-collagen I (Abcam, США, № кат. ab34710) и anti-fibronectin (Abcam, США, № кат. ab6328), маркер фибробластов anti-CD90 (Millipore, США, № кат. MAB1406), а также вторичные антитела: Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies, США, № кат. A21124), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies, США, № кат. A21121), Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG2a (Life Technologies, США, № кат. A21134), Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life Technologies, США, № кат. A11031), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life Technologies, США, № кат. A11029). После инкубации отмывали флуоресцентно-меченые антитела физ. раствором 2 раза по 15 минут при комнатной температуре и окрашивали ядра клеток в растворе с концентрацией 0.001 мкг/мл DAPI в физ. растворе.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов протезов изолектином (этот лектин используют для выявления эндотелиальных клеток, Isolectin GS-IB4 from Griffonia simplicifolia, Life Technologies, США, № кат. I21413 Alexa Fluor® 594 Conjugate) сначала их инкубировали в 0,1мМ CaCl₂ в течение 30 минут; далее в течение ночи в растворе изолектина (разведение 1:75 в 0,1мМ CaCl₂), а после отмывали 2 раза по 15 минут физ. раствором при комнатной температуре.

Готовые препараты заключали в среду «Vectashield mounting medium with DAPI» (Vector laboratories, США, № кат. H-1200) и анализировали с помощью лазерного сканирующего инвертированного флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM710. Изображения обрабатывали при помощи программного обеспечения ZEN (Carl Zeiss, Германия).

2.5 Статистическая обработка данных

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

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

3.1 Физико-механические свойства протезов

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

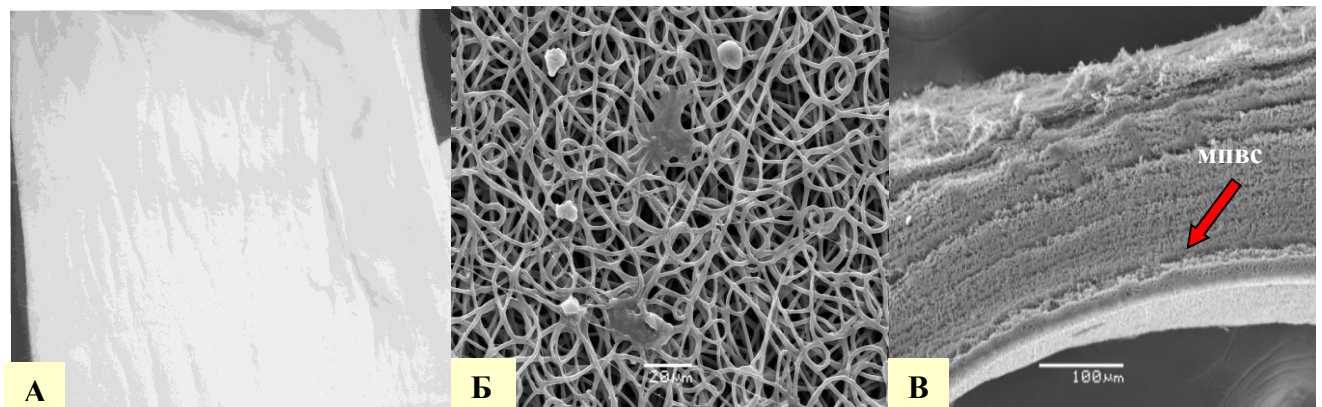


Рисунок 7. Структура протезов сосудов, изготовленных методом электроспиннинга: Примечание: А) протез из поликапролактона по данным световой микроскопии, микроскоп SteReo Discovery V12(Zeiss, Germany), увеличение $\times 56$; Б) вид изнутри протеза с мпвс по данным СЭМ (LEO -1430, Jeol, Япония); В) вид сбоку протеза с мпвс по данным СЭМ (LEO -1430, Jeol, Япония), где стрелкой указан мпвс.

При исследовании механических свойств экспериментальных протезов как описано в разделе 2.3, было обнаружено, что протезы, содержащие желатин в стартовом растворе на 20-30% прочнее по сравнению с ПКС из чистого ПКЛ (см. таб.1). Введение мпвс практически не влияло на прочностные характеристики протезов.

Таблица 1

Механические свойства экспериментальных протезов

Тип протеза	Прочность в области упругой деформации (Мпа)	Относительное удлинение (%)	Прочность на разрыв в продольном направлении (Мпа)	Относительное удлинение (%)	Прочность на прорыв ниткой (грамм силы)	Прочность на сдавливание (грамм силы)
1. протез из ПКЛ (контроль)	1,2±0,2	7±2	2,3±0,5	860±120	160±20	20±2
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	1,4±0,2	11±2	2,1±0,5	450±100	170±20	19±2
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	1,4±0,2	11±2	2,1±0,5	450±100	170±20	19±2
p- уровень	$p_{(1,2,3)}=0,824$	$p_{(1,2,3)}=0,79$	$p_{(1,2,3)}=0,856$	$p_{(1,2,3)}=0,005$ $p_{(1,2)} < 0,001$ $p_{(1,3)} < 0,001$ $p_{(2,3)} = 1$	$p_{(1,2,3)}=0,787$	$p_{(1,2,3)}=0,787$

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

Матрицы изготовленные с помощью электроспиннинга имели проницаемость равную 20 мл/см²/мин, при этом скорость вращения электрода-коллектора влияла на ориентацию волокон, но не влияла на расстояние между слоями (см. рис. 8 А, Б, В). Разработанный нами протокол введения малопроницаемого внутреннего слоя позволил уменьшить проницаемость до 0,07-0,15 мл/см²/мин.

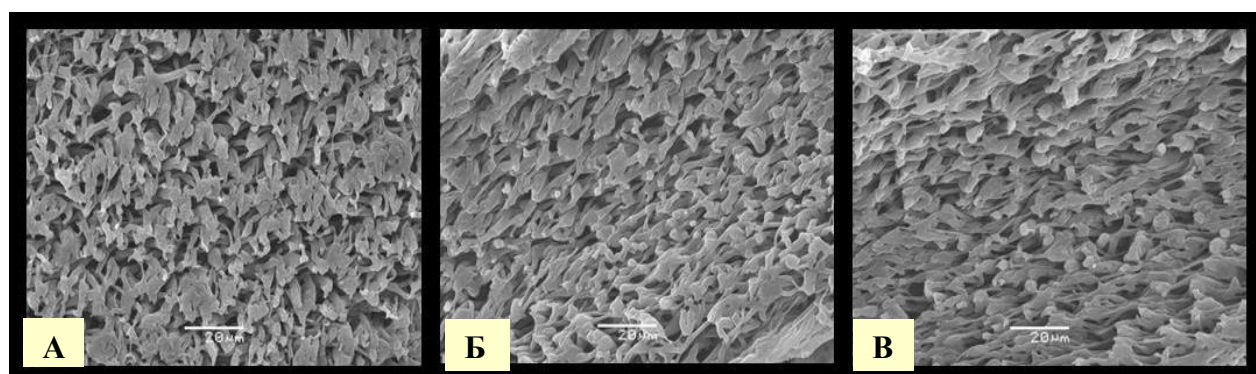


Рисунок 8. Направление волокон при изменении скорости вращения коллектора:

Примечание: А) 300 об/мин; Б) 1500 об/мин; В) 3000 об/мин

Гидродинамические испытания при выполнении более 500 000 циклов нагрузки с перепадами давления физ. раствора до и после протеза от 100 до 200 мм.рт.ст., соответственно, демонстрировали высокую функциональную стабильность: отсутствие изменений в структуре и проницаемости у протезов с мпвс. Разволоknения и отслоения мпвс не наблюдалось.

Возможность изготовления любого типа и размера протеза методом электроспиннинга позволяет выбрать оптимальный вариант конструкции для конкретной клинической ситуации.

Резюме:

1. Тип полимера и скорость вращения электрода коллектора не влияют на проницаемость материала изготовленного методом электроспиннинга.
2. Сосудистые протезы, изготовленные методом электроспиннинга, обладают достаточной механической прочностью, включая прочность на прорыв нитью, что имеет важное значение для интраоперационных процедур.
3. Разработанные протоколы в рамках нашего исследования позволяют создавать многослойные протезы сосудов с малопроницаемым внутренним слоем, обладающие достаточной механической прочностью, способные выдерживать длительные гидродинамические нагрузки.

3.2 Экспериментальная часть *in vivo*

3.2.1 Интраоперационные показатели

Имплантация экспериментальных протезов была выполнена 45 крысам. Из них 21(46,7%) женского и 24 (53,3%) мужского пола (см. таб. 2). Для трех типов протезов, изготовленных в рамках исследования, были сформированы три группы наблюдения. Первой группе животных была выполнена имплантация протезов из ПКЛ; второй группе - протезов из ПКЛ с желатином и мпвс и третьей группе были имплантированы протезы из ПКЛ с желатином и внутренним мпвс, в котором в качестве полимера-основы выступал ПЛГА. Ни на одном из сроков наблюдения летальности не было.

Таблица 2

Распределение животных по полу в группах

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

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

Среднее значение общего объема наркозной смеси, как описано разделе 2.4.2. (КсилаВет, золетил, физиологический раствор) потраченной на момент операции в группах составило 6,4 мл. Показатель диаметра аорты крыс интраоперационно был от 1,6 до 2 мм, а длина имплантированного протеза (в зависимости от анатомической особенности животного) составила от 10 до 15 мм и в группах статистически значимо не отличались.

При оценке длительности операции более высокие показатели имели место при использовании трансплантата из ПКЛ с желатином и мпвс, что было связано

с анатомическими особенностями и небольшими техническими трудностями при выделении магистральных сосудов у животных этой группы, однако это отличие не было статистически значимым по отношению к двум другим группам экспериментальных протезов (см. таб. 3).

Таблица 3

Время операции и окклюзии аорты в группах

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

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

Интраоперационная оценка качества изготовленных протезов показала их хорошую устойчивость к "разлохмачиванию" при отрезании части ножницами. Формирование анастомозов не сопровождалось подворачиванием краев трансплантата, а область соединения протеза с нативной артерией была в виде плотного контакта. Все типы исследуемых ПКС сохраняли свою цилиндрическую форму на протяжении всех этапов имплантации, однако при сдавливании пинцетом пропитанный физиологическим раствором протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс увеличивал свою податливость, в отличие от протезов, не содержащих ПЛГА, что, по-видимому, было связано с более жесткой структурой каркаса из этого полимера.

После запуска кровотока по имплантированному протезу, наблюдалось более выраженное пропитывание стенки кровью и потрачено достоверно больше времени для местного гемостаза (время от снятия зажимов с аорты до прекращения кровотечения из области проколов иглой) у протеза из ПКЛ без малопроницаемого внутреннего слоя (см. таб. 3 и рис. 9 А, Б, В).

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.

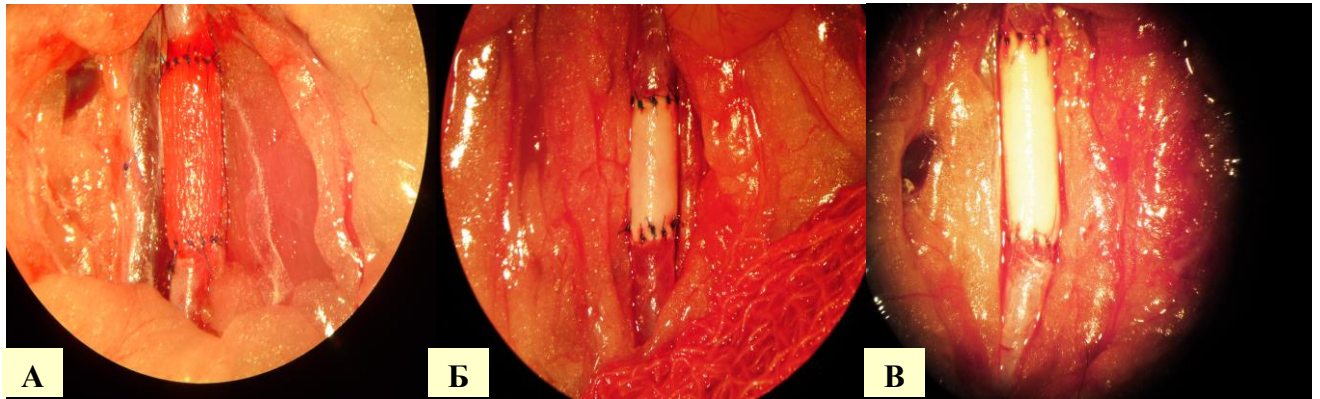


Рисунок 9. Интраоперационный вид протезов, Микроскоп ОРМІ РІСО, увеличение х6:
Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона с желатином и мпвс; В) протез из поликапролактона с желатином, внутренним слоем из ПЛГА с желатином и мпвс

3.2.2 Проходимость трансплантатов

После имплантации протезов, при оценке состояния зоны кровоснабжения, в эксперименте не было выявлено гангрены конечностей и/или признаков их трофического нарушения. Ни у одной из крыс не наблюдалось перемежающей хромоты, а кожные покровы задних конечностей и хвоста были обычной окраски.

Проходимость трансплантатов за весь период наблюдения составила: для протезов из первой и второй группы наблюдения - 100%; для протеза из третьей группы - 93,5% (тромбоз 1 протеза на 2 недельном сроке наблюдения).

При измерении объемной скорости кровотока в пяти контрольных точках с помощью магнитно-резонансной томографии на 4-ой неделе наблюдения отмечались более низкие показатели у трансплантатов из ПКЛ, что вероятно было связано с небольшим увеличением диаметра протеза в этот период (см таб. 4; рис. 10 А, Б).

Протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА – мпвс имел наибольшее значение скорости кровотока. А протез из ПКЛ с желатином и мпвс на 4 неделе наблюдения имел промежуточные показатели объемной скорости кровотока между 1 и 3 группами (см таб. 4).

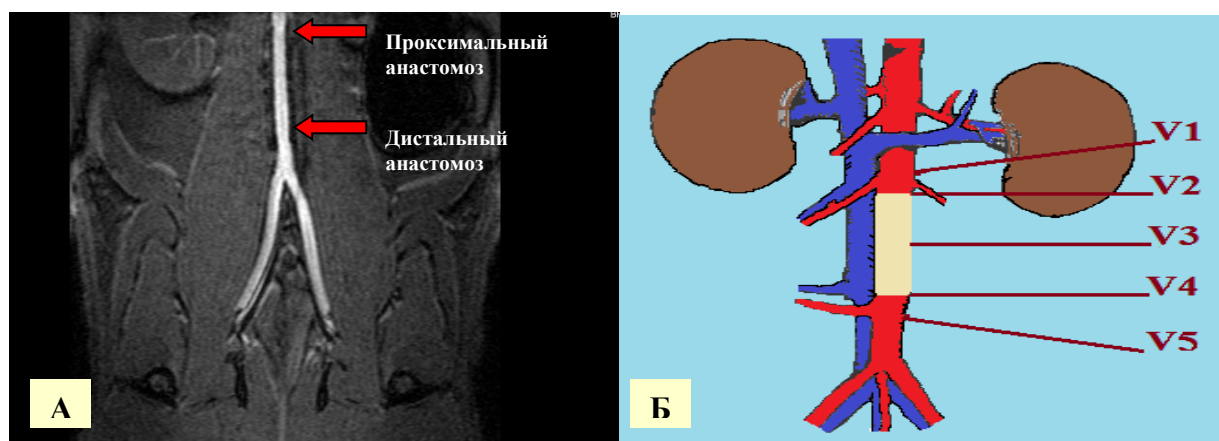


Рисунок 10. Оценка проходимости протеза с помощью магнитно-резонансной томографии «BioSpec 117/16USR» (Bruker, Германия):

Примечание: А) снимок аорты после имплантации протеза в аорту; Б) схема областей измерения объемной скорости кровотока, где: V1 – аорта проксимально от протеза; V2 – проксимальный анастомоз; V3 – середина протеза; V4 – дистальный анастомоз; V5 – аорта дистально от протеза.

Таблица 4

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

Тип протеза	V1	V2	V3	V4	V5	p _(1,2,3,4,5)
1. протез из ПКЛ	8,6 ± 3,4/ 7,3 (7,1;9,9)	9,1 ± 3/ 7,5 (6,2;11,4)	7,9 ± 2/ 7 (6,4;10,1)	9,2 ± 2,4/ 10,3 (8,1;11,2)	9,9 ± 3,4/ 9 (7,7;11,8)	0,866
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	12,7 ± 5,5/ 12,8 (10,5;16,8)	12,9 ± 5,5/ 15,3 (9,8;15,5)	12,5 ± 4,1/ 13,4 (9,5;13,8)	14,3 ± 5,2/ 13,7 (9,4;19,2)	13,1 ± 4,5/ 11,8 (10,5;17)	0,982
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	17,5 ± 2,1/ 17 (16,7;18,9)	16,7 ± 3/ 17 (16,7;18,9)	14,5 ± 3,3 14,3 (12;17)	17,4 ± 3,1/ 16,8 (14,7;18,9)	17,2 ± 7,9/ 15 (14,3;24,1)	0,802
p - уровень	p _(1,2,3) =0,014 p _(1,2) =0,197 p _(1,3) =0,001 p _(2,3) =0,111	p _(1,2,3) =0,035 p _(1,2) = 0,211 p _(1,3) =0,004 p _(2,3) =0,212	p _(1,2,3) =0,025 p _(1,2) =0,058 p _(1,3) =0,006 p _(2,3) =0,449	p _(1,2,3) =0,017 p _(1,2) =0,086 p _(1,3) =0,001 p _(2,3) =0,295	p _(1,2,3) =0,163 p _(1,2) = 0,238 p _(1,3) =0,095 p _(2,3) =0,347	

Примечание: V1, V2, V3, V4, V5 – области измерения объемной скорости кровотока в соответствии с рис. 10 Б. В таблице представлено среднее значение ± стандартное отклонение / медиана (25; 75 процентиль). Сравнение по горизонтали: p_(1,2,3,4,5) - сравнение показателей внутри одной группы; Сравнение по вертикали: p_(1,2,3) – сравнение трех типов протезов; p_(1,2) - протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и мпвс; p_(1,3) – протеза из ПКЛ и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс; p_(2,3) – протеза из ПКЛ с желатином и мпвс и протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс.

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

Таблица 5

Объемная скорость кровотока в зоне хирургического вмешательства
на 20 неделе наблюдения (мл/мин)

Тип протеза	V1	V2	V3	V4	V5	p (1,2,3,4,5)
1. протез из ПКЛ	15,3 ± 4,5/ 13,6 (12,6;18)	15,8 ± 5,4/ 14,4 (11,2;19,9)	15,5 ± 3/ 14,4 (13,4;17,2)	17,4 ± 3,3/ 18,6 (15,6;20)	15,5 ± 4,4/ 14,9 (11,8; 19,2)	0,861
2. протез из ПКЛ с желатином и мпвс	17,4 ± 2,5/ 17,1 (16,8;19,5)	16,2 ± 3,6/ 17,2 (15,9;18)	13,5 ± 3,1/ 14,8 (13;15,7)	14,4 ± 4,7/ 15,3 (14,5;15,8)	15,4 ± 5,4/ 14 (12,7;17)	0,619
3. протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс	16,3 ± 3,3/ 15,7 (14,5;19,5)	15,4 ± 1,4/ 15,7 (15,4;16)	12 ± 2/ 13,4 (10,3;13,4)	16,8 ± 3,3/ 16,2 (14,6;19)	15,1 ± 5,4/ 15,6 (11,5;18,7)	0,22
p - уровень	$p_{(1,2,3)}=0,059$	$p_{(1,2,3)}=0,622$	$p_{(1,2,3)}=0,289$	$p_{(1,2,3)}=0,497$	$p_{(1,2,3)}=0,968$	

Примечание: V1, V2, V3, V4, V5 – области измерения объемной скорости кровотока в соответствии с рис. 10 Б. В таблице представлено среднее значение ± стандартное отклонение / медиана (25; 75 процентиль); Сравнение по горизонтали: $p_{(1,2,3,4,5)}$ - сравнение показателей внутри одной группы; Сравнение по вертикали: $p_{(1,2,3)}$ - сравнение трех типов протезов.

Спустя двадцать недель после имплантации (по данным ультразвукового доплеровского сканирования) линейная скорость кровотока (ЛСК) достоверно не отличалась между 3 типами ПКС ($p > 0,07$) и от скорости кровотока в аорте 5 крыс контрольной группы, т.е. без хирургического вмешательства ($p > 0,205$).

В протезе из ПКЛ показатель ЛСК составил $1,06 \pm 0,1$ м/с, в протезе из ПКЛ с желатином и мпвс $0,95 \pm 0,002$ м/с, а в протезе из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс $1,1 \pm 0,1$ м/с. Средняя линейная скорость кровотока в контрольной группе животных (без хирургического вмешательства) была равна $1,06 \pm 0,03$ м/с (см. рис. 11).

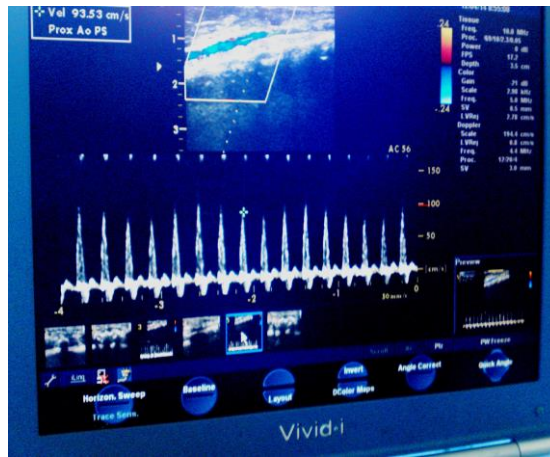


Рисунок 11. Определение линейной скорости кровотока с помощью ультразвуковой доплерографии Vivid i (GE Medical Systems Israel Ltd., Израиль)

3.3 Оценка "состоятельности" протезов

3.3.1 Интраоперационное исследование протезов сосудов и обзорная микроскопия

В послеоперационном периоде не наблюдалось диастаза, нагноений или других осложнений послеоперационной раны, окружающих тканей и самих протезов. Объективно на этапе забора материала у протезов определяется достаточно плотное фиксирование с окружающими тканями и выраженная васкуляризация (см. рис. 12 А, Б). При макроскопическом исследовании не было выявлено видимых деформаций стенки и изменения цвета экспериментальных ПКС. Также не было обнаружено признаков инфицирования/выраженного воспаления, гематом, как в зоне самого трансплантата, так и окружающих его тканей. Внутренняя выстилка протезов имела вид гладкого ровного слоя без резких границ с нативным сосудом (см. рис. 12 В).



Рисунок 12. Вид протеза из поликапролактона с желатином и ПЛГА-мПВС на 20 неделе наблюдения. Примечание: а) протез в момент пульсирующего кровотока, Микроскоп ОРМІ PICO, увеличение x10 б) эксплантированный протез, Микроскоп ОРМІ PICO, увеличение x16; в) вид протеза изнутри, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение x100.

При исследовании с помощью операционного микроскопа OPMI PICO (Carl Zeiss, Германия) у одного протеза из группы ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс было выявлено аневризматическое расширение без признаков тромбоза одной из стенок аорты на уровне дистального анастомоза и один из трансплантатов имел окклюзивный тромбоз просвета протеза на 2 неделе наблюдения (см. рис. 13А, Б).

В одном случае в группе ПКЛ с желатином и мпвс на 4 неделе наблюдения определялся ПКС с наличием пристеночного тромба. Участок повреждения выглядел в виде зоны уплотнения внутренней выстилки овальной формы бардово-коричневого цвета (организованный пристеночный плотный тромб) и располагался по задней поверхности и занимал 1/3 длины дистальной части трансплантата, не сообщался с внутренним просветом протеза и не распространялся на его толщину. Свежих тромботических наложений не было (см. рис. 13 В).

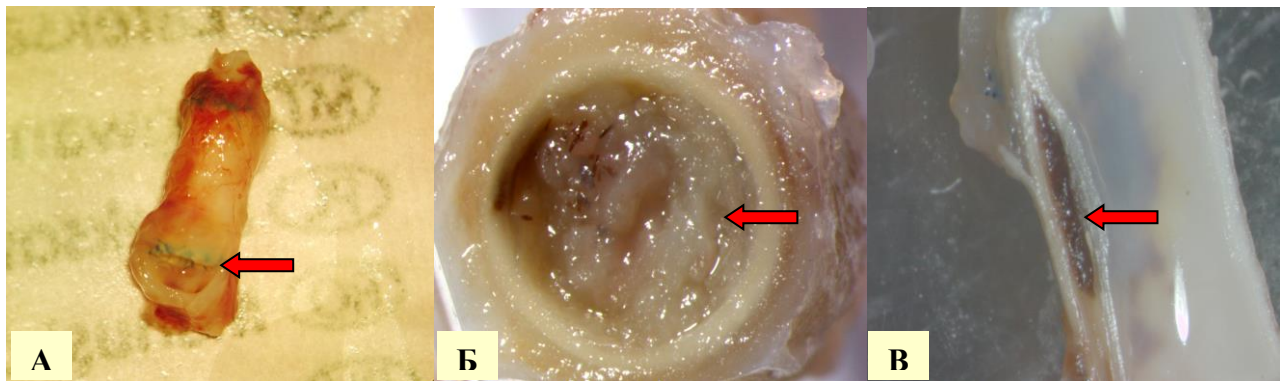


Рисунок 13. Вид протезов.

Примечание: А) аневризматическое расширение дистального анастомоза аорты с протезом из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс на 2 неделе, Микроскоп OPMI PICO, увеличение $\times 10$; Б) тромбоз протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение $\times 100$; В) пристеночный тромб в протезе ПКЛ с желатином и мпвс на 4 неделе, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение $\times 100$.

При измерении внешнего диаметра/площади просвета протезов, у трансплантата из чистого поликапролактона на 2 и 4 неделе после имплантации отмечалась тенденция к увеличению диаметра на 5-10%, в отличие от протезов содержащих мпвс. В связи с такими изменениями протезов из ПКЛ для сравнения индукции неоинтимы мы использовали не площадь просвета, а толщину его стенок, определенную как это было описано в разделе 2.4.4. (см. таб. 6).

Нами была обнаружена статистически значимая разница ($p \leq 0,05$) толщины стенки протеза и его внутреннего слоя между группами на всех сроках наблюдения (см. таб. 6).

Кроме того, внутри каждой группы было отмечено увеличение толщины стенки на 2 неделе, что характерно для «первичного набухания» стенки ПКС, уменьшение на 4 неделе и вновь постепенное увеличение на 20 неделе наблюдения (за счет формирования внутренней выстилки). Статистически значимым этот показатель был только у трансплантатов из ПКЛ с желатином и ПЛГА – мпвс между 2 и 20, а также 4 и 20 неделями (см. таб. 6).

Данные обзорной микроскопии демонстрируют, что протезы с мпвс имели наименьшую толщину стенки с сохранением линейных размеров на всех сроках наблюдения (см. таб. 6; рис. 14, 15).

Таблица 6

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

Тип протеза	2 неделя наблюдения	4 неделя наблюдения	20 неделя наблюдения	p-уровень
протез из ПКЛ	395 ± 111,3/ 381,4 (363,8;408,8)	282 ± 38,6/ 280 (270,4;291,9)	374 ± 83,8/ 353,4 (329,1; 430,4)	$p^*_{(1,2,3)}=0,119$
протез из ПКЛ с желатином и мпвс	298 ± 80,9/ 298,77 (240,18; 332,6)	226 ± 28,7/ 235,38 (209,06; 235,53)	231 ± 46,7/ 256,44 (195,6; 258,3)	$p^*_{(1,2,3)}=0,122$
протез из ПКЛ с желатином и ПЛГА- мпвс	210 ± 30,7/ 211,88 (182,5; 235,5)	193 ± 33,8/ 182,3 (170; 222)	261 ± 36,3 261 (246,1;265,2)	$p^*_{(1,2,3)}=0,02$ $p_{(1)}=0,422$ $p_{(2)}=0,015$ $p_{(3)}=0,044$
p - уровень	$p_{(1,2,3)}=0,013$ $p_{(1,2)}=0,154$ $p_{(1,3)}=0,007$ $p_{(2,3)}=0,053$	$p_{(1,2,3)}=0,004$ $p_{(1,2)}=0,03$ $p_{(1,3)}=0,095$ $p_{(2,3)}=0,83$	$p_{(1,2,3)}=0,006$ $p_{(1,2)}=0,002$ $p_{(1,3)}=0,024$ $p_{(2,3)}=0,015$	

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

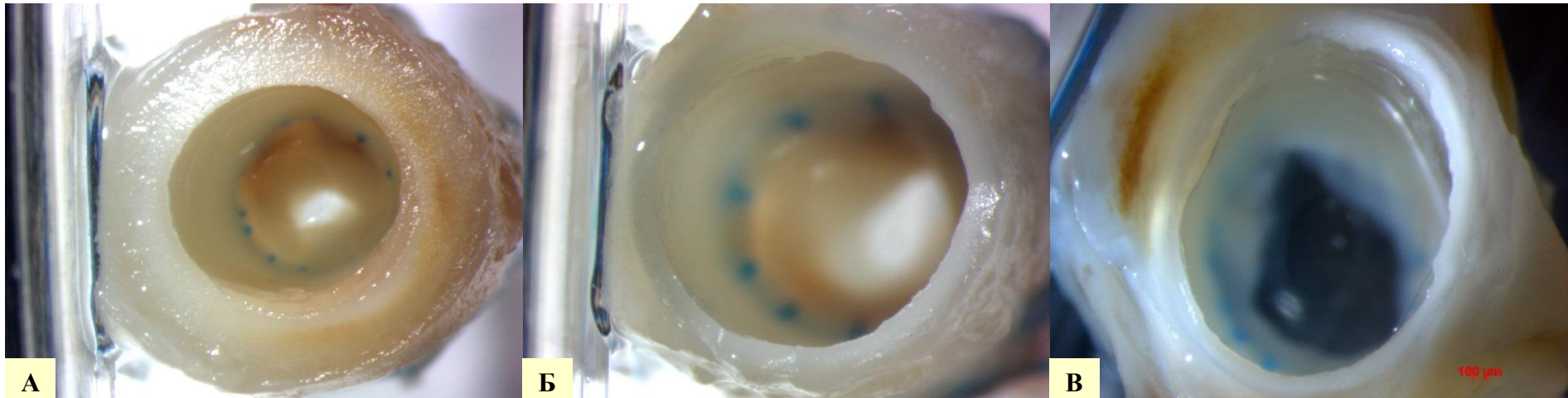


Рисунок 14. Обзорная микроскопия сосудистых протезов на 4 неделе наблюдения, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение x100.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА,

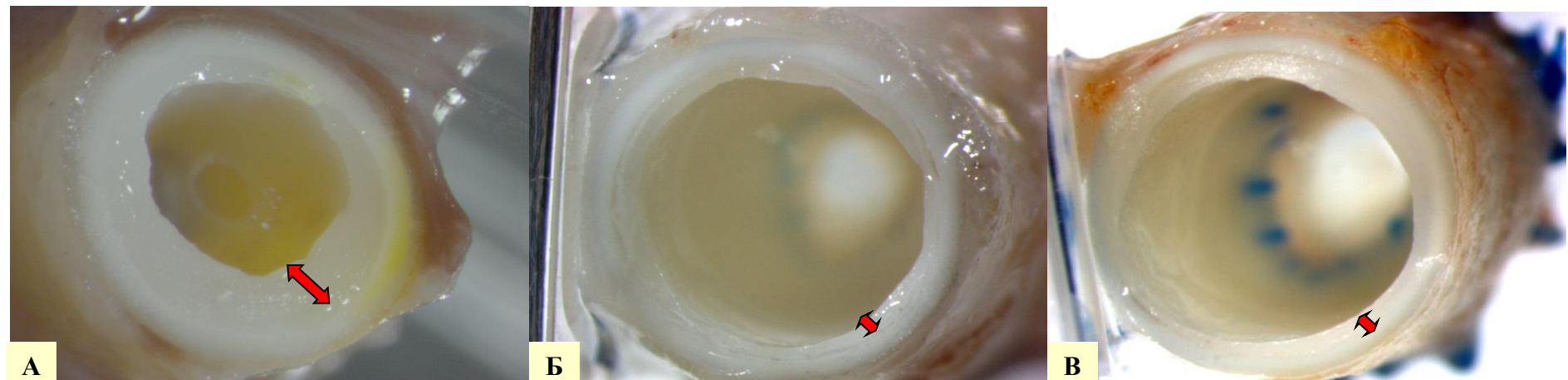


Рисунок 15. Обзорная микроскопия сосудистых протезов на 20 неделе наблюдения, Микроскоп Stereo Discovery V12, увеличение x100.

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

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

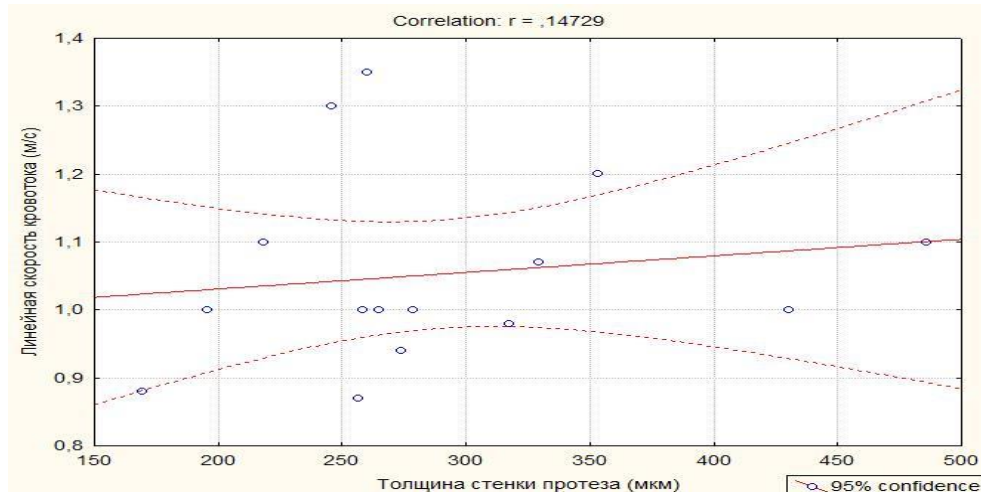


Рисунок 16. Корреляция толщины стенки протеза и линейной скорости кровотока на 20 неделе наблюдения.

Резюме:

1. Протезы сосудов устойчивы к "разлохмачиванию" при разрезании ножницами, хорошо сопоставимы с нативной артерией, а также податливы к растяжению и возвращению в исходное состояние в условии пульсирующего кровотока, что может являться благоприятным фактором, а именно снижающим риск механического повреждения форменных элементов о стенку протеза, и, следовательно, риск тромбообразования.
2. Трансплантаты, имеющие в своей структуре малопроницаемый внутренний слой меньше пропитываются кровью, а, следовательно, снижают время, потраченное на местный гемостаз.
3. Сосудистые протезы, изготовленные методом электроспиннинга, сохраняют внутренний просвет достаточным на протяжении длительного срока наблюдения.
4. Протезы сосудов с малопроницаемым внутренним слоем менее склонны к индукции неоинтимы, что позволяет сохранить достаточным внутренний просвет длительное время.

3.3.2 Гистологическое исследование эксплантированных сосудов

Для того, чтобы оценить био- и гемосовместимость трансплантатов, а именно взаимодействие клеток с имплантированными протезами, признаки воспалительной реакции, формирование неклеточных структур в том числе белковых волокон и кальцификатов, было выполнено гистологическое исследование протезов кровеносных сосудов всех исследуемых типов эксплантированных через 2 недели, 2 и 5 месяцев после имплантации.

В момент первичного «набухания» протеза из поликапролактона, которое определяется на 2 неделе наблюдения, в стенках протеза и перипротезном пространстве не было выявлено лейкоцитарной инфильтрации, свидетельствующей о развитии воспалительного процесса. Наружная фиброзная капсула на всем протяжении трансплантата представлена в большей степени широкими коллагеновыми волокнами, фибробластами и миоцитами. На гистологических срезах в зоне анастомозов отмечается наличие фрагментов шовного материала, в области которых определяется смена хода пучков коллагеновых и эластических волокон с циркулярного направления на перпендикулярное по отношению к плоскости стенки сосудов (см. рис. 17).

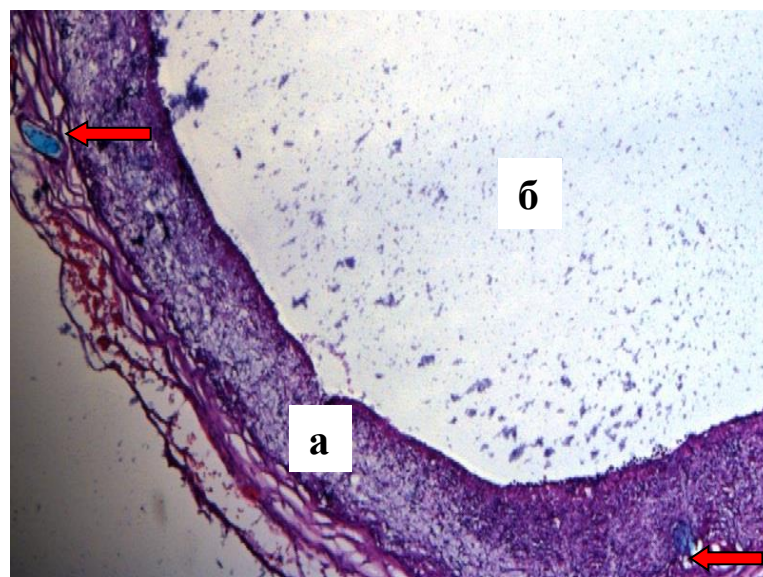


Рисунок 17. Зона анастомоза протеза из ПКЛ с нативной аортой на 2 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х100.

Примечание: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой указан шовный материал и область компрессии вокруг него.

В структуре самого трансплантата, помимо синтетических волокон, определяются мигрирующие снаружи внутрь ГМК и смена коллагеновых волокон на тонкие эластические волокна. Как в средней части протеза, так и в зоне анастомоза с нативной аортой выявлены свежие эритроциты по всей окружности, занимающие от 1/3 до 1/2 его толщины. Едва заметная фиброзно-тромботическая пленка, по-видимому, образовавшаяся при контакте с кровью на внутренней поверхности протеза - является начальным этапом формирования неоинтимы и на 2 неделе наблюдения имеет участки с разной степенью утолщения, при этом в зоне анастомоза она полностью покрывает нити шовного материала. В составе внутренней выстилки выявляются циркулярно-направленные эластические волокна (в большей степени) и в меньшей коллагеновые (см. рис. 18 А, 19А). Даже при микроскопии с большим увеличением (ув. $\times 400$) не удастся обнаружить клеток похожих на клетки эндотелия. Окраска по методу фон – Косса на этом сроке наблюдения показала равномерное распределение фосфатов кальция по всей толщине стенки протеза (см. рис. 20 А).

На 4 неделе наблюдения у протеза из поликапролактона также не было выявлено лейкоцитарной инфильтрации, как в зоне анастомоза, так и по всей длине трансплантата (см. рис. 22 А). Наружная капсула протеза имеет компоненты характерные для более зрелой соединительной ткани, чем на 2 неделе и состоит из рыхлой волокнистой структуры, фиброцитов, ГМК и формирующихся кровеносных сосудов (*Vasa Vasorum*) малого диаметра питающих стенку. На срезах сам экспериментальный протез представляет собой каркас из синтетических волокон с плотным заполнением пор элементами соединительной ткани: ГМК, коллагеновыми и эластическими волокнами (более выраженное наполнение ближе к внутреннему просвету). Внутренняя выстилка имеет вид тонкого ровного рыхлого слоя из циркулярно-расположенных в большей степени эластических волокон и ГМК между ними (подэндотелиальный слой). На внутренней поверхности протеза определяются удлиненной формы эндотелий-подобные клетки с плотным контактом между собой на границе, взаимодействующей с потоком крови (см. рис. 23 А). На четвертой неделе

наблюдения фосфаты кальция выявляются также как и на второй, т.е. во всей толщине стенки трансплантата.

У протеза из поликапролактона на 20 неделе наблюдения не было обнаружено признаков острого или хронического воспаления (полиморфноядерных лейкоцитов, гигантских клеток и лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов) (см. рис. 24 А). В наружной капсуле содержатся структуры характерные для зрелой рыхлой соединительной ткани: миоциты, фиброциты, коллагеновые и эластические волокна, крупного диаметра развитые кровеносные сосуды (*Vasa Vasorum*). Признаков значимой биodeградации полимера при гистологическом исследовании не было выявлено, т.к. стенка самого трансплантата хорошо определяется и представлена синтетическими волокнами, между которых находятся ГМК, коллагеновые волокна с наружной части и эластические волокна со стороны внутреннего просвета сосуда (см. рис. 26 А; 27 А). Внутренняя выстилка имеет вид рыхлого утолщенного слоя состоящего в большей степени из эластических волокон и циркулярно-расположенных единичных ядер ГМК (подэндотелиальный слой). Эндотелий-подобные клетки четко не определяются. (см. рис. 24 А; 25А). Фосфаты кальция определяются на границе неоинтима/протез, при этом в зоне анастомозов выраженность минерализации этого типа трансплантатов была больше чем в их средней части (см. рис. 21 А).

У протеза из ПКЛ с желатином и мпвс на второй неделе наблюдения не было выявлено лейкоцитарной инфильтрации. В его наружной капсуле видны миоциты, стремящиеся внутрь трансплантата, коллагеновые и эластические волокна. В области анастомозов на микропрепаратах определяются фрагменты шовного материала. Основу стенки трансплантата составляют синтетические волокна. Форменные элементы крови (эритроциты) выявляются в толще синтетических волокон до малопроницаемого внутреннего слоя. Однако иногда встречаются участки с более глубоким проникновением эритроцитов (аналогично протезу первого типа на 2 неделе наблюдения) (см. рис. 18 Б). Помимо этого выявляется небольшое количество эластических и коллагеновых волокон (см. рис. 19 Б). Внутренняя выстилка полностью покрывает нити шовного материала в зоне

анастомозов и на протяжении всего протеза в основном состоит из циркулярно-направленных эластических волокон. При микроскопическом исследовании, в том числе с большим увеличением (ув. $\times 400$) не удается обнаружить клеток похожих на клетки эндотелия. Характерная для наличия фосфатов кальция окраска была ограничена малопроницаемым внутренним слоем (см. рис. 20 Б).

У протезов этого же типа на четвертой неделе наблюдения в наружной капсуле среди волокнистой структуры определяется большое количество ГМК, фиброцитов, формирующих кровеносных сосудов (*Vasa Vasorum*) крупного размера. Сам протез представлен в виде каркаса из синтетических волокон с наличием незначительного количества ГМК, коллагеновых и эластических волокон и отсутствием свежих форменных элементов крови. Внутренняя выстилка в большей степени содержит циркулярно-расположенные волокнистые структуры (эластические волокна), ГМК - подэндотелиальный слой и имеющие удлиненную форму клетки похожие на клетки эндотелия с плотным контактом между собой (см. рис. 22 Б, 23 Б). На этом сроке наблюдения в окружающих тканях и в структуре протеза не было выявлено признаков воспалительной инфильтрации, а фосфаты кальция, как и на 2 неделе наблюдения выявлялись не глубже мпвс.

В группе экспериментальных протезов из ПКЛ с желатином и мпвс на 5 месяце наблюдения не было выявлено полиморфноядерных лейкоцитов, гиганских клеток, макрофагов или лимфогистиоцитарных инфильтратов, что свидетельствует об отсутствии воспалительных процессов (см. рис. 24 Б, 25 Б). В наружной капсуле определяется более плотная волокнистая структура вблизи синтетических волокон и более рыхлая в отдаленной от них частях, которые включают ГМК, кровеносные сосуды (*Vasa Vasorum*), коллагеновые и эластические волокна, фиброциты. Матрикс из полимерных волокон характеризуется наличием единичных ГМК и слабым выявлением коллагеновых и эластических волокон, отсутствием свежих форменных элементов крови. Внутренняя выстилка представлена в большей степени волокнистыми структурами (эластические волокна), циркулярно-расположенными ГМК (подэндотелиальный слой) и

имеющими удлинённую форму клетками похожими на клетки эндотелия с плотным контактом между собой (см. рис. 26 Б; 27 Б). Фосфаты кальция располагались в большей степени на границе неоинтимы и протеза (см. рис. 21 Б).

При микроскопии протезов из ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА после 2-й недели наблюдения было выявлено, что наружная капсула содержит большое количество миоцитов, фибробластов, эластических волокон и значительно меньшее количество коллагеновых волокон (см. рис. 18 В). При этом большинство миоцитов сконцентрировано на границе с наружной частью протеза. Признаков воспаления, а именно лейкоцитарной инфильтрации трансплантатов не выявлено. Среди полимерных волокон в стенке протеза встречается небольшое количество эластических волокон, а также единичные эритроциты с четкими контурами, однако в большей степени определяется их лизированная форма. Внутренняя выстилка более выражена в области анастомоза, полностью порывает нити шовного материала и практически не определяется в средней части протеза. Она представлена циркулярно-направленными эластическими волокнами. Клетки, похожие на клетки эндотелия, в протезах этого типа достоверно выявить не удастся (см. рис. 19 В). На этом сроке наблюдения область с характерной окраской для фосфатов кальция в большей степени была ограничена малопроницаемым внутренним слоем (см. рис. 20 В).

В протезах из ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА эксплантированных после 4-х недель функционирования не было обнаружено признаков воспаления, т.е. не было выявлено лимфогистиоцитарных инфильтратов (см. рис. 22 В). Наружная капсула трансплантата содержит ГМК, фиброциты и коллагеновые волокна, местами определяются небольшого диаметра сосуды (*Vasa Vasorum*). Пores стенки ПКС до 1/2 его толщины заполнены со стороны внутреннего просвета небольшим количеством свежих и лизированных эритроцитов, а наружная часть содержит единичные миоциты мигрировавшие из наружной фиброзной капсулы. Внутренняя выстилка имеет вид плотного слоя из циркулярно-расположенных эластических волокон и ядер ГМК (подэндотелиальный слой), удлинённой формы клеток, похожих на клетки эндотелия,

которые формируют плотные контакты друг с другом (см. рис. 22 В, 23В). При окраске по фон - Коссу фосфаты кальция определяются на границе неоинтимы и мпвс как и на 2 неделе наблюдения (см. рис. 20 В).

На пятом месяце наблюдения в протезе ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА так же не обнаружено признаков острого или хронического воспаления (полиморфноядерных лейкоцитов, гигантских клеток и лимфоидно-гистиоцитарных инфильтратов) (см. рис. 24 В, 25 В). Наружная капсула представлена рыхлой соединительной тканью, богатой ГМК, большого диаметра кровеносными сосудами (*Vasa Vasorum*) и волокнами, причем коллагеновых волокон выявляется больше, чем эластиновых. Структура самого протеза также четко определяется и представлена синтетическими волокнами, единичными ГМК, слабым выявлением коллагеновых и эластических волокон. Внутренняя выстилка представлена в большей степени волокнистыми структурами (эластические волокна) имеющими циркулярное направление, ГМК (подэндотелиальный слой) и толстым слоем имеющих удлиненную форму клетками с плотным контактом между собой (см. рис. 26 В, 27 В). Область с фосфатами кальция локализована преимущественно на границе неоинтимы и протеза, при этом в зоне анастомоза несколько больше, чем в их средней части (см. рис. 21 В).

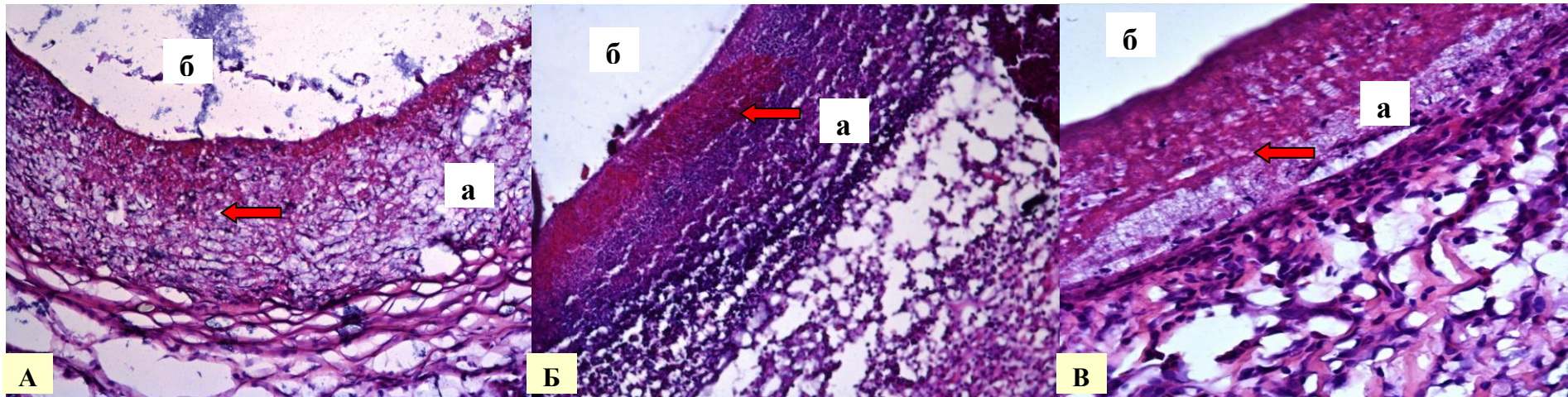


Рисунок 18. Вид протезов на 2 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой указано пропитывание стенки протеза эритроцитами.

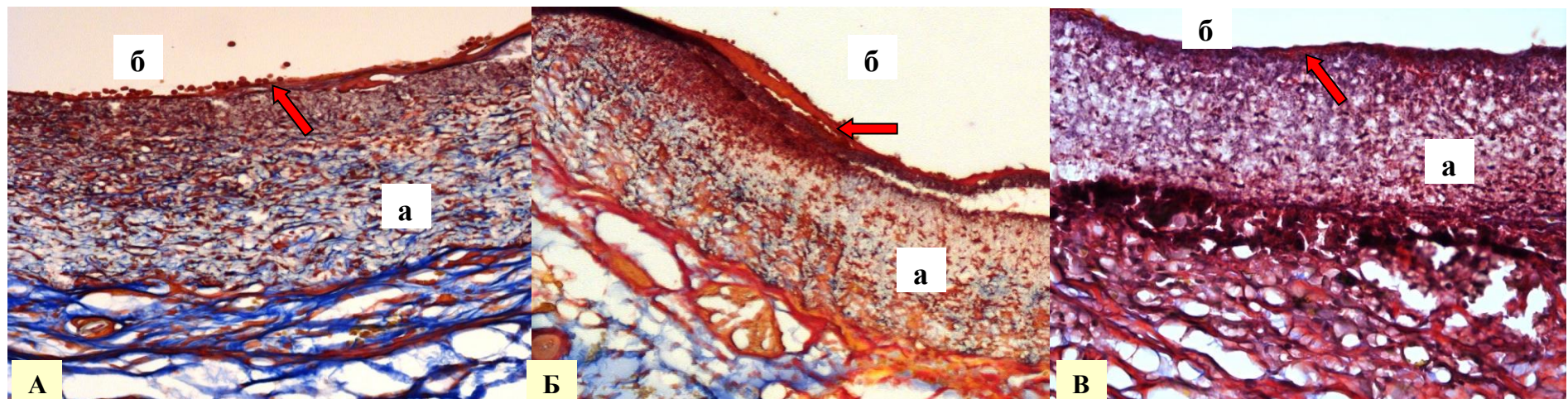


Рисунок 19. Вид протезов на 2 неделе наблюдения, окраска Пикро-Маллори, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х400.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначена неоинтима.



Рисунок 20. Вид протезов на 2 неделе наблюдения, окраска по фон - Коссу, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА; где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначены выпавшие фосфаты кальция.



Рисунок 21. Вид протезов на 20 неделе наблюдения, окраска по Фон Косу, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначены выпавшие фосфаты кальция.

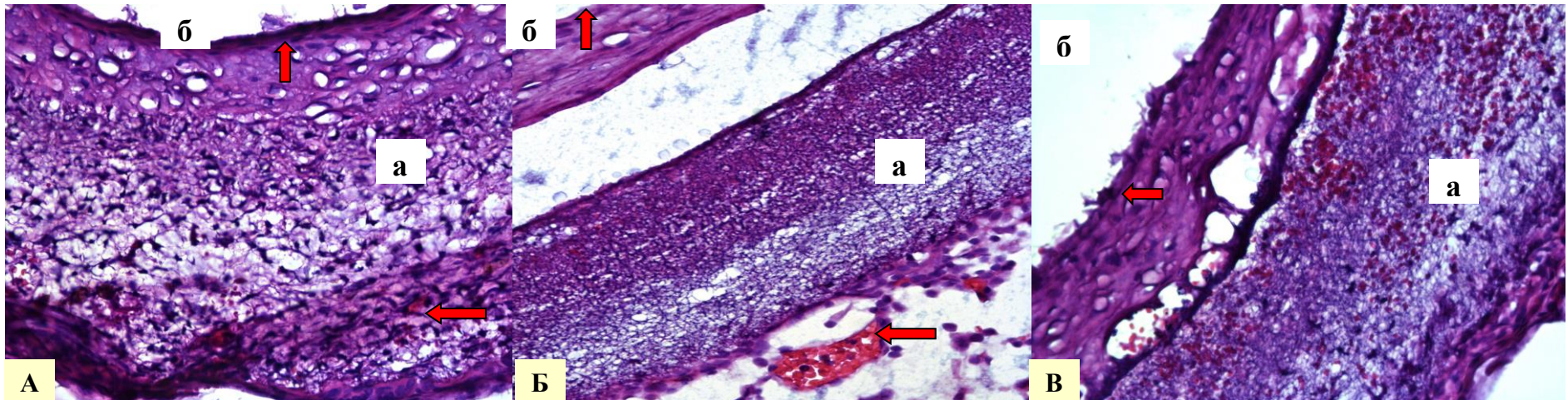


Рисунок 22. Вид протезов на 4 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х400.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначен эндотелий-подобный слой и Vasa Vasorum.

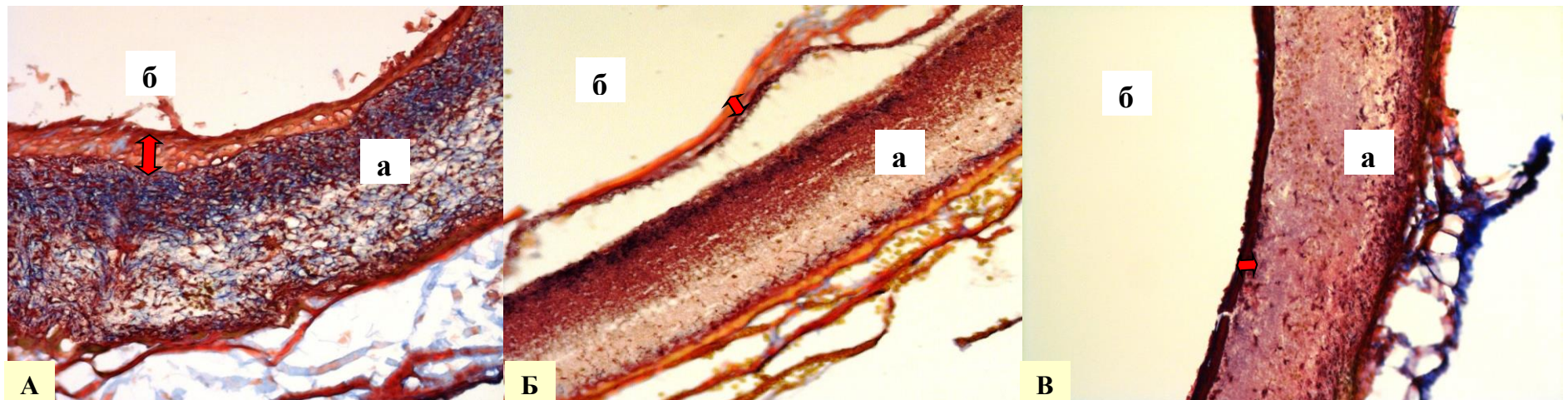


Рисунок 23. Вид протезов на 4 неделе наблюдения, окраска Пикро-Маллори, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначена неоинтима.

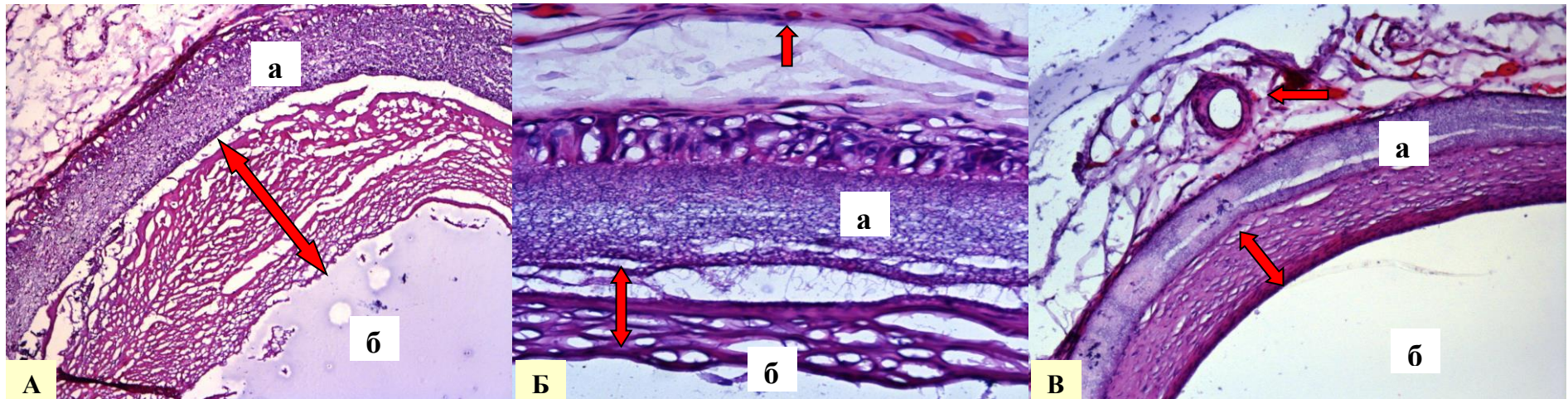


Рисунок 24. Вид протезов на 20 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначена неоинтима.

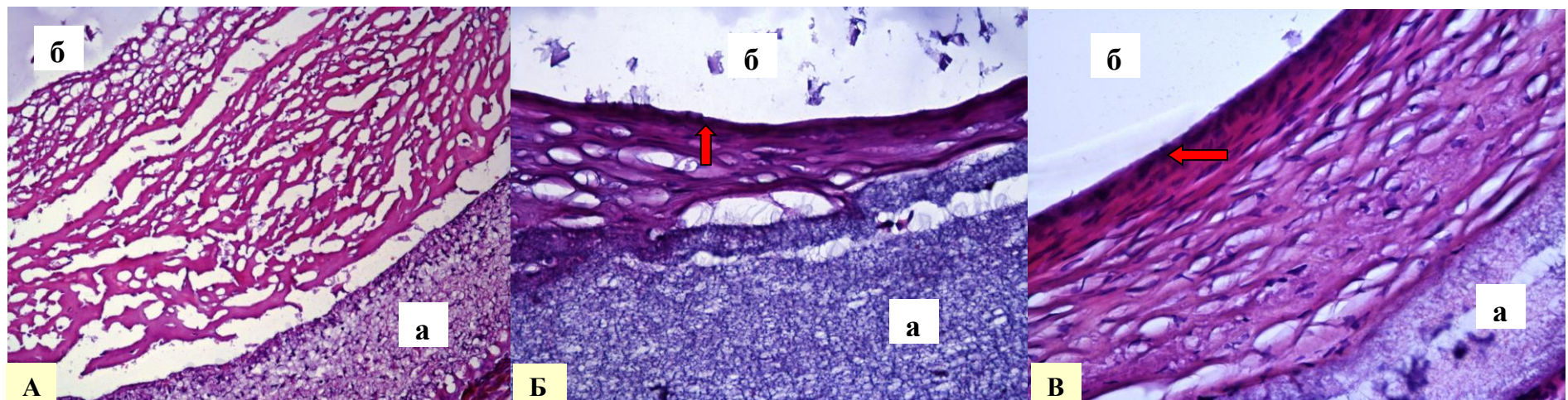


Рисунок 25. Вид протезов на 20 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х400.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначен эндотелий-подобный слой.

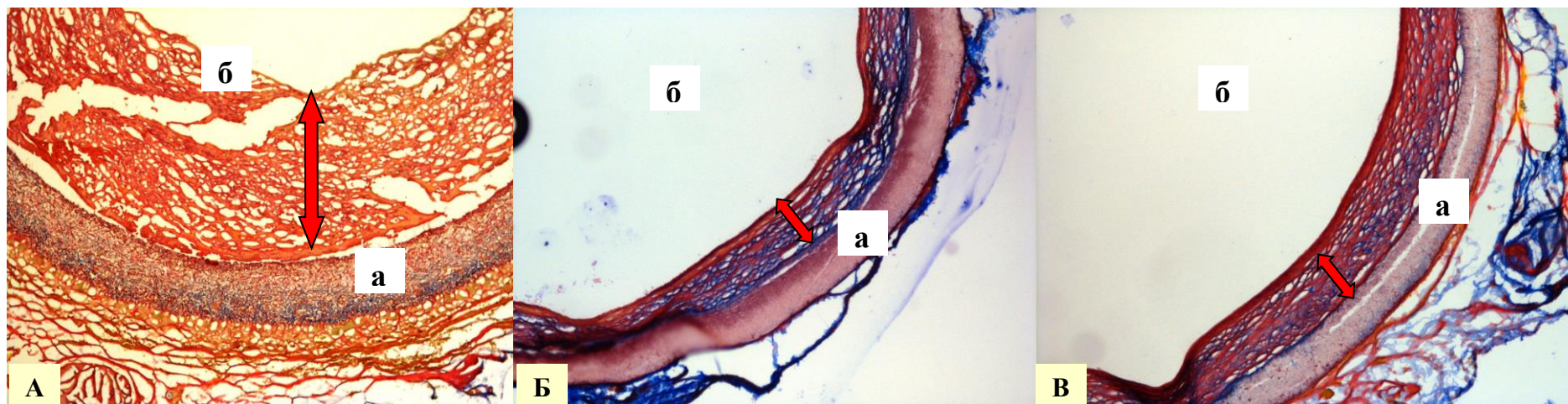


Рисунок 26. Вид протезов на 20 неделе наблюдения, окраска Пикро-Маллори, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х100.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначена неоинтима.

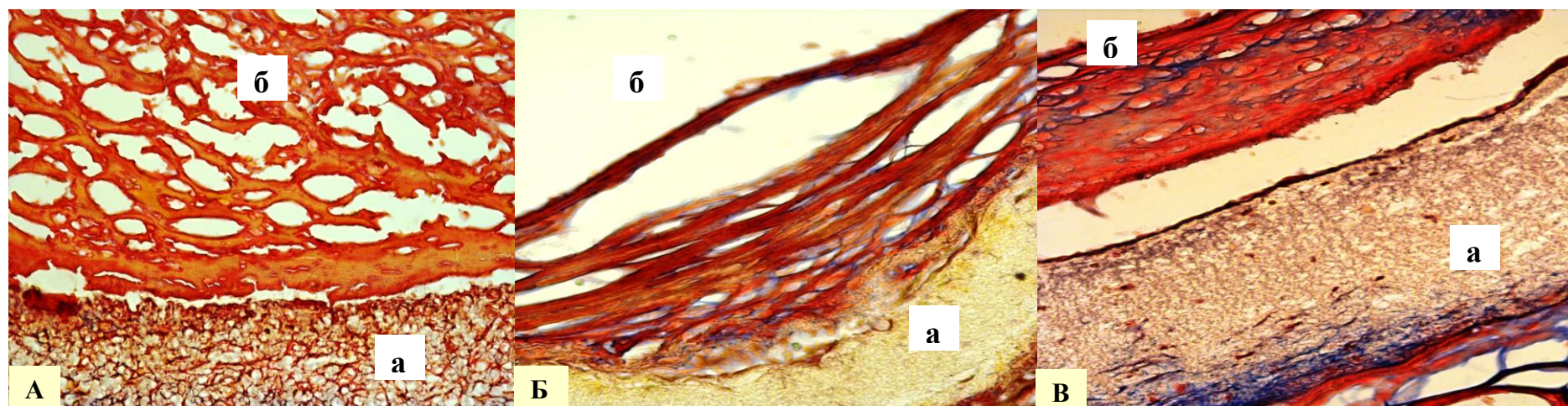


Рисунок 27. Вид протезов на 20 неделе наблюдения, окраска Пикро-Маллори, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х400.

Примечание: А) ПКЛ; Б) ПКЛ с желатином и мпвс; В) ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА, где: а) стенка протеза; б) просвет протеза. Стрелкой обозначена неоинтима.

Окклюзивный тромбоз дистального анастомоза в третьей группе экспериментальных протезов (ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА) на 2 неделе наблюдения гистологически был представлен разной степенью организации ткани. Наружная капсула имеет элементы рыхлой соединительной ткани. В толще стенки самого трансплантата среди синтетических волокон определяется незначительное количество миоцитов. В тромботической массе, а именно в зоне дистального анастомоза встречались как свежие эритроциты (в большей степени в центральной части тромба), так и их лизированная форма. При окраске гематоксилин-эозином на микропрепаратах молодой фибрин выглядит как слабо эозинофильные сетчатые массы (в центральной части тромба), зрелый - как ярко эозинофильные гомогенные конгломераты. Чем ближе к стенке трансплантата, тем более четко видны структуры соединительной ткани (миоциты и волокна). Ядра клеток имеют циркулярное, местами хаотичное направление, что характерно для зоны турбулентного кровотока. В структуре тромбомасс также видна лейкоцитарная инфильтрация. Ближе к проксимальному анастомозу в протезе определяется просвет, при этом неоинтима представлена волокнистой структурой содержащей миоциты, ядра, которых имеют также хаотичное направление (см. рис. 28).

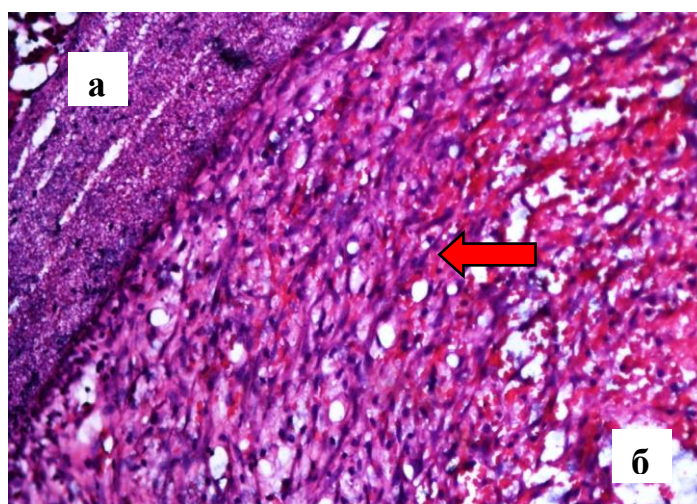


Рисунок 28. Вид тромбированного протеза из ПКЛ с желатином и мпвс-ПЛГА на 2 неделе наблюдения, окраска гематоксилин-эозин, Микроскоп AxioVision FL-40, Ув.х200. Примечание: а) стенка протеза; б) область просвета внутреннего протеза. Стрелкой указан тромб.

Резюме

1. На всех сроках наблюдения гистологически не было выявлено признаков острого или хронического воспаления у экспериментальных протезов.

2. Проникновение свежих эритроцитов у протеза из поликапролактона распространялось на всю толщину его стенки, а у протезов из 2 и 3 группы в большинстве случаев было ограничено малопроницаемым внутренним слоем.

3. Формирование характерных слоев артериальной стенки было выявлено у всех трансплантатов, при этом у протезов с мпвс неоинтима имела наименьшую толщину с клетками, похожими на клетки эндотелия.

3.3.3 Исследование заселения протезов сосудов клетками

3.3.3.1 Оценка процесса пролиферации клеток

Окраска препаратов SYBR Green I на всех сроках наблюдения показала плотное заселение клетками всех типов исследуемых протезов по внутренней, наружной поверхности и в толще их стенки. При этом наблюдается значительный градиент в наполнении клетками протезов по направлению снаружи внутрь. В зоне анастомоза, наблюдалась хорошая адаптация аорты с протезом, без значимого стенозирования просвета, а также активная миграция эндотелия из области сосудистой стенки на протез (см. рис. 29 А, Б, В).

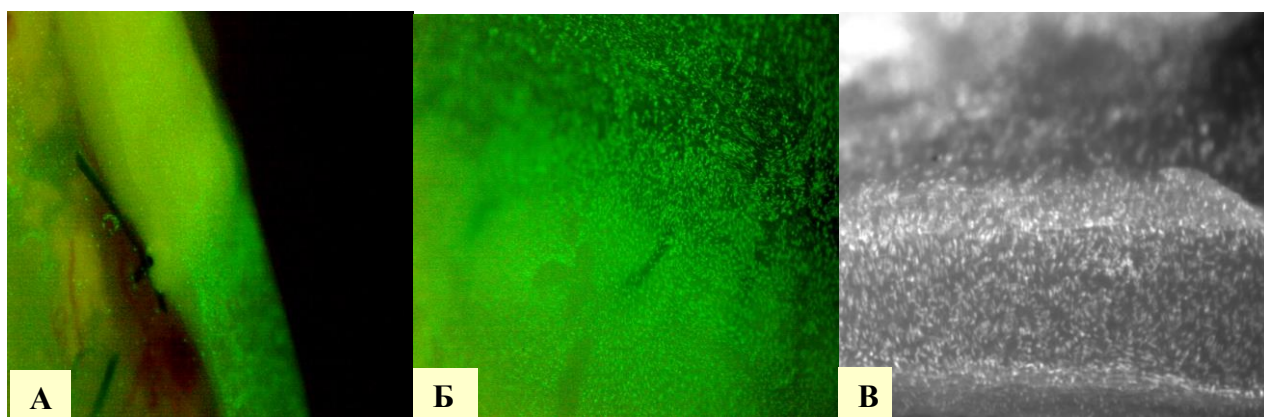


Рисунок 29. Окраска SYBR Green I протеза из поликапролактона на 20 недели наблюдения.

Примечание: А) зона анастомоза, увеличение $\times 100$; Б) внутренняя поверхность протеза, Увеличение $\times 200$; В) толщина стенки протеза, Увеличение $\times 200$.

3.3.3.2 Оценка клеточного состава нативного сосуда крысы и зоны анастомозов

При иммуногистохимическом исследовании в проанализированных образцах, вне зависимости от типа пришитого синтетического протеза, клетки крысиной части сосуда (брюшной аорты) обычно не имеют адекватного распределения характерных маркеров. Маркер гладкомышечных клеток α SMA не всегда детектируется на всей поверхности сосуда, часто располагается в отдельных участках, иногда – в единичных клетках. Эндотелиальный маркер CD31 выявляется редко в небольших зонах и отдельных клетках (см.рис. 30 А).

Маркер эндотелиальных клеток isolectin B4 детектируется либо на всей поверхности сосуда, либо в отдельных ее областях. Маркер фибробластов CD90 выявляется во внешнем слое фибробластов, попадающем в поле зрения в результате приготовления препарата, что видно на 3D-профиле поверхности. Межклеточный матрикс коллаген и фибронектин в участке нативной аорты на сроках 2, 4 недели детектируется в отдельных участках, к 20 недели – практически на всей поверхности (см.рис. 30 Б, В).

В зоне анастомоза протез-аорта, вне зависимости от типа трансплантата, обычно также выявляется некоторое нарушение распределения маркеров. Клетки, активно мигрируют со стороны нативного сосуда на синтетическую поверхность. В ряде случаев в районе непосредственного контакта с синтетическим материалом детектируются клетки, позитивные по окраске антителами к маркеру фибробластов CD90. Вероятно, они попали в исследуемую область из внешнего слоя фибробластов в процессе пришивания синтетического материала.

3.4.3.3 Оценка клеточного состава экспериментальных протезов

У всех типов протезов отчетливо виден градиент распределения клеток из области анастомозов в область протеза. Выявляются хорошо развитые слои клеток на внешней и внутренней поверхностях. В толще трансплантатов клетки распределены с выраженным градиентом, при этом: больше клеток было во внешней части, чем во внутренней.

В первом типе синтетического протеза (ПКЛ) на 2 неделе наблюдения на внутренней выстилке в основном детектируются α SMA - позитивные клетки, однако при этом обнаруживаются также CD31 - позитивные клетки (см. рис. 31 А). Оба вида клеток располагаются в тесном контакте друг с другом, однако не образуют слоев, а распределены стохастически. В ряде случаев выявляется колокализация маркеров гладкомышечных и эндотелиальных клеток. На четвертой неделе наблюдения у этого протеза в наружном и внутреннем слоях, детектируются отдельные группы α SMA-позитивных клеток. Внутренняя выстилка практически не имеет CD31-позитивных клеток (см. рис. 32 А). А к концу 5 месяца в толще самого

трансплантата клетки распределены равномерно (см. рис. 33А). На внутренней поверхности трансплантата определяются утолщенные области со значительным количеством слоев. Детектируются в большом количестве α SMA - позитивные клетки, а CD31 - позитивные – детектируются слабо, в виде отдельных клеток.

Синтетический протез 2 типа (ПКЛ с желатином и мпвс) в отличие от двух других типов заселяется медленнее. Слой клеток, прилегающий к внутренней поверхности, развит неравномерно. Среди клеток, заселяющих протез на 2 неделе, чаще в неоинтима детектируются α SMA - позитивные клетки, CD31 - позитивных клеток не обнаружено (см. рис. 31Б). На четвертой неделе наблюдения в наружном и внутреннем слоях, детектируются отдельные группы α SMA-позитивных клеток, а внутренняя выстилка имеет незначительное количество CD31-позитивных клеток (см. рис. 32Б). В толще синтетического протеза 2 типа на 20 неделе наблюдения выявляется незначительное количество клеток. Однако при этом равномерно развит внутренний слой клеток, прилегающий к синтетической поверхности. Детектируются обширные позитивные области характерные для эндотелиальных и гладкомышечных клеток (см. рис. 33 Б).

В синтетическом протезе 3 типа (ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс) на 2 неделе наблюдения внутренняя поверхность представлена слоями клеток разной толщины. Заселяющие клетки имеют в большем количестве α SMA - позитивный фенотип, однако в отличие от протеза 1 типа, CD31-позитивные клетки детектируются в отдельных районах (см. рис. 31 В). На 4 неделе в неоинтима хорошо выражены α SMA –позитивные клетки, а также ряде случаев выявляется колокализация CD31-позитивных клеток (см. рис. 32 В). На 20 неделе на разных срезах выявляется разное количество клеток, заселяющих синтетический протез. Продолжают детектироваться α SMA - позитивные клетки, как и на 4 неделе, в отличие от CD 31-позитивных, которые на этом сроке наблюдения выявляются очень слабо (см. рис. 33 В).

При исследовании срезов протезов на 20 неделе наблюдения у всех типов не определялся маркер фибробластов CD 90.

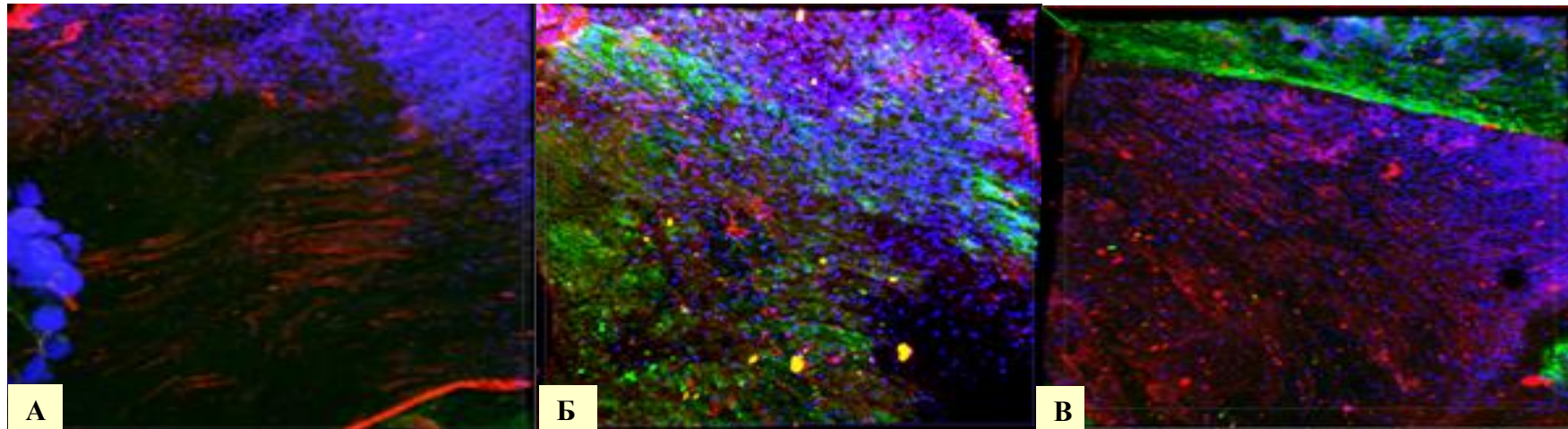


Рисунок 30. Иммуногистохимическое исследование стенки собственной аорты крысы на 20 неделе наблюдения.

Примечание: А) окраска на маркеры гладкомышечных клеток – α SMA (красный цвет) и эндотелиальных клеток - CD31 (зеленый цвет); Б) окраска на маркеры фибронектина (красный цвет) и коллагена (зеленый цвет); В) окраска на маркеры эндотелиальных клеток -isolectin B4 (красный цвет) и фибробластов - CD 90 (зеленый цвет).

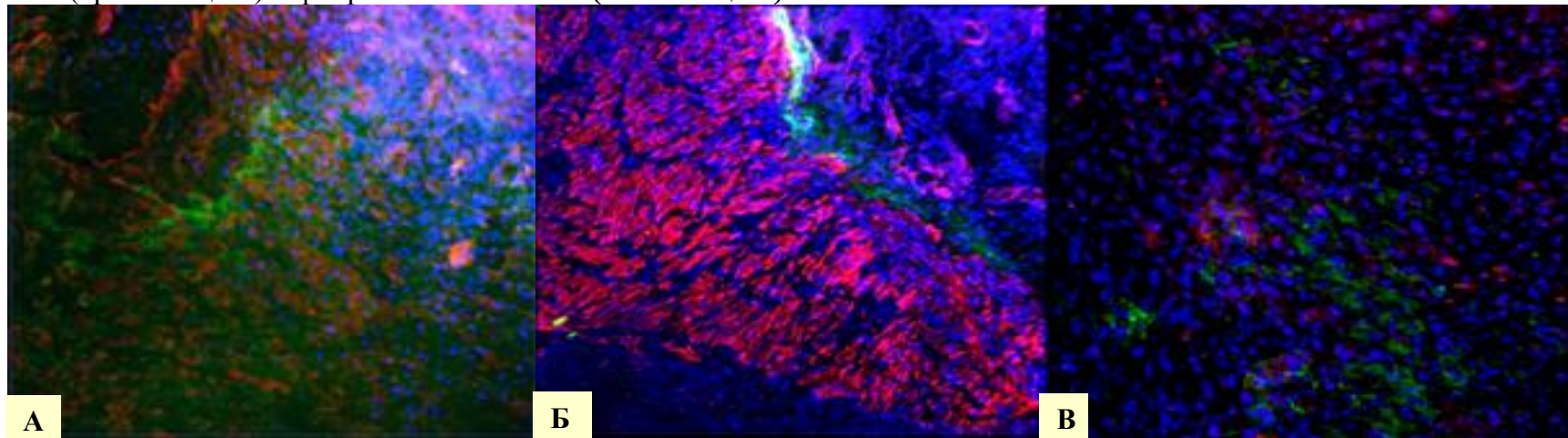


Рисунок 31. Окраска экспериментальных протезов через 2 недели после имплантации на маркеры гладкомышечных клеток – α SMA (красный цвет) и эндотелиальных клеток - CD31 (зеленый цвет)

Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона, желатина и мпвс; В) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, полилактид-ко-гликолида

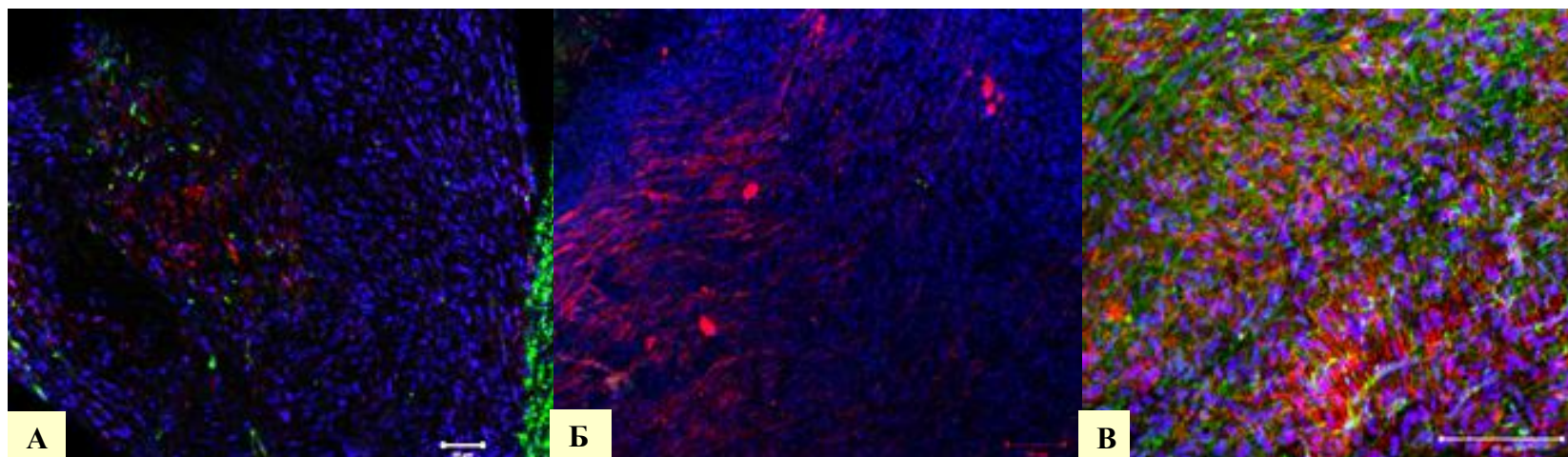


Рисунок 32. Окраска экспериментальных протезов через 4 недели после имплантации на маркеры гладкомышечных клеток – α SMA (красный цвет) и эндотелиальных клеток - CD31 (зеленый цвет)

Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона, желатина и мпвс; В) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, полилактид-ко-гликолида.

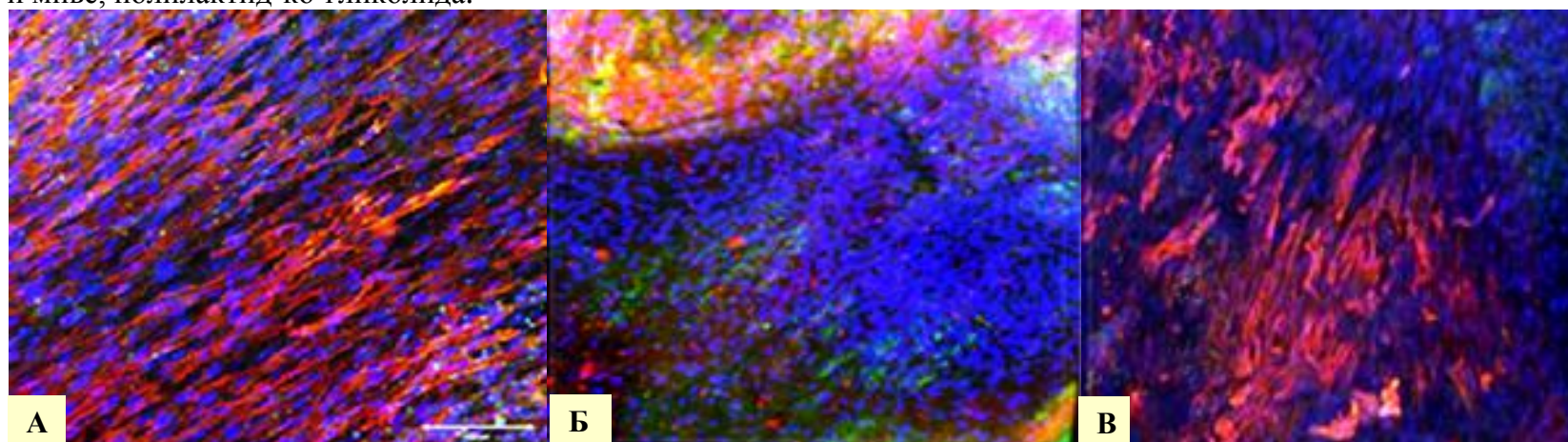


Рисунок 33. Окраска экспериментальных протезов через 20 недель после имплантации на маркеры гладкомышечных клеток – α SMA (красный цвет) и эндотелиальных клеток - CD31 (зеленый цвет)

Примечание: А) протез из поликапролактона; Б) протез из поликапролактона, желатина и мпвс; В) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, полилактид-ко-гликолида.

3.4.3.4 Оценка экстраклеточного матрикса эксплантированных протезов

Наибольшее количество межклеточного матрикса фибронектина и коллагена на 2 неделе наблюдения определялось у протеза из ПКЛ с желатином и мпвс, меньше у протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс и незначительное количество у протеза из ПКЛ. Относительно фибронектина коллаген нарабатывался во всех типах протезов слабее (см. рис. 34).

На четвертой неделе наблюдения у всех трех типов экспериментальных протезов выявлялось одинаково небольшое количество маркеров межклеточного матрикса.

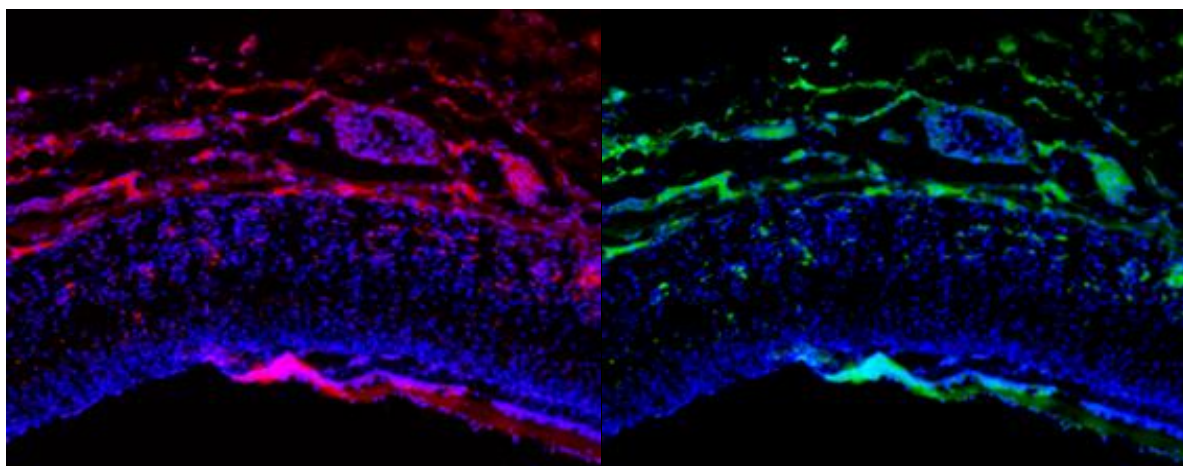


Рисунок 34. Маркеры межклеточного матрикса на 2 недели наблюдения у протеза из поликапролактона, желатина и мпвс.

Примечание: маркер фибронектина – зеленым цветом, коллагена - красным цветом.

Однако на 20 неделе в протезе 1 типа они детектируются в большей степени, чем в протезе 2 типа. При этом в протезе 1 типа видна межклеточная локализация матрикса, а в протезе 2 типа видна тенденция к внутриклеточной локализации коллагена и фибронектина. В 3 типе протеза был более выражен межклеточный фибронектин. Коллаген детектируется, но в отдельных районах.

Резюме

4. Неравномерное распределение клеточных маркеров в области нативной аорты на всех сроках наблюдения, по-видимому, может быть результатом повреждения внутренней поверхности сосуда интраоперационно в процессе имплантации.

5. Наибольшее количество маркеров CD31 было выявлено на 4 неделе у протеза из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс, однако на 20 неделе их количество значительно снижалось. Тогда как у протеза из ПКЛ с желатином и мпвс выявляются обширные области занятые эндотелиоцит-подобными и гладкомышечными клетками, что более характерно для процесса эндотелизации.

6. Отсутствие маркеров фибробластов на 20 неделе наблюдения и присутствие маркеров эндотелиальных клеток дополнительно подтверждает формирование неоинтимы близкой к нативной интима у протеза из ПКЛ с желатином и мпвс.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

По литературным данным более чем в 60% случаев причиной развития критической ишемии нижних конечностей у пациентов является поражение бедренно-подколенного, берцово-стопного сегментов [120]. Собственные артерии и вены остаются оптимальным вариантом для протезирования и в настоящее время, однако это часто ограничено рядом технических причин [31;93;141;147]. В связи с этим проблема выбора сосудистого трансплантата, особенно для пациентов, которым необходимо выполнение повторного реконструктивного вмешательства является актуальной [28;49].

Учитывая высокий интерес исследователей к созданию биоразлагаемых материалов, с целью поиска возможностей усовершенствования трансплантатов в этой работе были изучены современные типы полимеров (синтетические и биологические) и способы изготовления протеза кровеносного сосуда [70;79;83;128;150]. Особое внимание было направлено на изучение безопасности использования экспериментальных трансплантатов, их эффективности и функциональной состоятельности. Разработан протокол, который ранее не был заявлен в мировой литературе, изготовления протезов кровеносного сосуда методом электроспиннинга, имеющих малопроницаемый внутренний слой.

Проделанная работа носила проспективный характер, материал представлен результатами стендовых испытаний и данными, полученными после имплантации в брюшной отдел аорты животных заранее изготовленных трех типов экспериментальных протезов: 1) протез из поликапролактона, 2) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, 3) протез из поликапролактона, желатина и мпвс, полилактид-ко-гликолида. Контрольными точками были 2, 4 и 20 недель. В каждой точке исследовались по 5 животных (крысы линии Wisar).

Учитывая, что группой авторов [62] ранее были получены оптимальные результаты эффективного процесса адгезии и клеточного распределения в матриксе с диаметром волокон от 0,9 до 1,6 мкм, при изготовлении протезов мы также производили волокна ~1 мкм.

Прочность протезов сосудов играет основную роль при его длительном функционировании. В тоже время необходимо помнить, что при увеличении прочности теряется эластичность материала. Из-за несоответствия коэффициента эластичности нативной сосудистой стенки и трансплантата происходит образование зон турбулентности в различных местах анастомоза с повышением адгезии и агрегации тромбоцитов, которые стимулируют гиперпластический процесс, что приводит к чрезмерному образованию неоинтимы [25;41;58]. Представленные на современном рынке синтетические протезы, обладают достаточно большим запасом прочности по сравнению с нативными сосудами. Нетканые протезы превышают прочность естественных сосудов – в 3,5–5 раза, а текстильные протезы – в 15–80 раз [16;35;38;151]. Проведенные физико-механические испытания экспериментальных трансплантатов в представленной работе показывают, что протезы, изготовленные по разработанному протоколу, имеют достаточную прочность для использования их в дальнейшей в клинической практике. Желатин, входящий в состав волокон из которых изготовлены экспериментальные сосудистые протезы, позволяет увеличить прочность материала на 20-30% от исходных значений. Отсутствие структурных изменений ПКС после воздействия гидродинамической нагрузки, а также аневризматического расширения трансплантата на сроке наблюдения до 20 недель, косвенно свидетельствуют о длительном сохранении показателей прочности, медленной деградации полимера, которой достаточно для оптимального формирования нового сосуда.

Чрезмерная пористость протеза сосуда повышает степень интраоперационной кровопотери, делает необходимым выполнение дополнительных предварительных манипуляций по его пропитыванию, что увеличивает длительность операции и, безусловно, играет большую роль для пациентов с тяжелой сопутствующей патологией. В литературе описано огромное количество разных способов уменьшения проницаемости сосудистого протеза, например, пропитывание протеза белками (желатин) и полисахаридами, или синтетическими полимерами и т.д [69;80;82;89;97;131]. Полное отсутствие

пористости также является отрицательной характеристикой для трансплантата, выражающееся в неспособности проникновения клеток и, следовательно, невозможности образования фиксированной оптимальной внутренней выстилки [38;41;59].

В процессе исследования было определено, что протезы без мпвс имеют проницаемость стенки равную $20 \text{ мл/см}^2/\text{мин}$, которая позволяет легко проходить через нее клеткам крови. Дополнительное введение в состав трансплантата мпвс, позволило уменьшить показатель проницаемости до $0,07 - 0,015 \text{ мл/см}^2/\text{мин}$. После положительных результатов, полученных при стендовых испытаниях, для оценки эффективности протезов выполнено их изучение *in vivo*. При имплантации протезов из ПКЛ с желатином и мпвс; ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс, малопроницаемый внутренний слой способствует меньшему пропитыванию их кровью и времени, потраченному на гемостаз ($5,6 \pm 1,1$ мин для 2 группы наблюдения; $5,4 \pm 1$ мин для 3 группы), в отличие от ПКС без такого слоя ($9,2 \pm 1,4$ мин). Наличие желатина, в составе волокна и мпвс, способствует хорошей адгезии и пролиферации клеток, как по внутренней поверхности, так и в толще его стенки.

На примере наиболее часто используемого синтетического протеза (ПТФЭ) многие авторы подтверждают, что именно неоинтимальная фиброзная гиперплазия в зоне анастомоза на путях оттока является ведущим фактором в развитии стеноза с последующим тромбозом трансплантата [34;41;63;136]. Чтобы этого избежать было предложено много способов формирования анастомозов, включая использование венозной вставки или манжеты между протезом и нативной артерией, а также трансплантатов с особой конфигурацией (например, протез из ПТФЭ Distaflo) [110;115]. В нашей работе было отмечено, что протез кровеносного сосуда, изготовленный методом электроспиннинга, позволяет формировать как прямой, так и косой анастомоз с нативной артерией, без подворачивания и "разлохмачивания" краев, при этом он сохраняет свою цилиндрическую форму на протяжении всего этапа имплантации.

Одной из главных причин несостоятельности ангиозаменителей является их тромбоз в послеоперационном периоде [38;71;92;122;126]. Причинами ранней окклюзии шунта, как правило, авторы считают техническую погрешность на операции, нарушение в системе гемостаза, неадекватную предоперационную оценку дистального русла [32], а в отдаленном периоде – гиперплазию неоинтимы в зоне анастомоза, прогрессирование атеросклероза, гнойно-воспалительные осложнения [23;32;127]. В результате исследования был выявлен один случай тромбоза ПКС и один случай аневризматического расширения без признаков тромбоза одной из стенок аорты на уровне дистального анастомоза в 3-й группе на 2 недельном сроке наблюдения. Эти неудачи, вероятно, произошли по причине повреждения самого протеза или аорты во время операции, что привело к истончению стенки аорты с последующей несостоятельностью одного или нескольких узловых швов. В одном протезе кровеносного сосуда из 2-ой группы наблюдения был обнаружен пристеночный тромб. Вероятно, это было связано не с тромбогенностью протеза, а с технической погрешностью хирургического вмешательства (например: грубая манипуляция пинцетом в зоне анастомоза). Однако у всех типов экспериментальных ПКС не было определено достоверной разницы на 20 неделе наблюдения, и их проходимость составила 100%, что свидетельствует о хорошей биосовместимости и тромборезистентности экспериментальных трансплантатов.

На функциональную состоятельность сосудистых заменителей в значительной мере влияет скорость кровотока – чем быстрее и объемнее поток, следовательно, менее продолжителен контакт крови с поверхностью трансплантата, тем меньше возможности образования большого количества фибриновых сгустков [5]. На 2-ой неделе наблюдения в группе с протезом из ПКЛ по данным МРТ отмечались более низкие значения объемной скорости кровотока, что косвенно может свидетельствовать об увеличении внутреннего диаметра протеза. Показатели линейной и объемной скорости кровотока на 20 недели наблюдения по результатам МРТ и УЗДГ между группами ПКС статистически значимо не отличались между собой ($p \geq 0,05$) и от данных представленных у

не оперированных животных, а именно для объемной скорости кровотока это составило - 20 мл/мин, для ЛСК 1 м/с [3]. Выше сказанное позволяет предположить о сохранении достаточного внутреннего просвета сосуда на протяжении длительного времени.

При обзорной микроскопии была выявлена склонность к увеличению диаметра на 15-10% у протезов из чистого ПКЛ на 2 и 4 неделе после имплантации, в отличие от протезов, содержащих мпвс. Причиной этого может быть отсутствие прочных связей между волокнами и электростатических связей между влажными волокнами, способствующее релаксации структуры 3Д матрикса и увеличению его линейных размеров.

Гиперплазия неоинтимы является одной из важных проблем препятствующей длительному функционированию трансплантата, которую исследователи пытаются разрешить на протяжении длительного времени, особенно когда речь идет о протезах малого диаметра [34;136]. При сравнении индукции неоинтимы измеряя толщину стенок протезов, было обнаружено, ее увеличение у всех типов протезов на 2 неделе и уменьшение на 4 неделе. Скорее всего, это связано с первичной реакцией организма на имплантированный чужеродный материал. При этом наименьшая величина толщины стенок протеза определялась в третьей группе, что вероятно связано с наличием мпвс и быстротой деградации ПЛГА, а наибольшая в первой группе, что в свою очередь объясняется отсутствием мпвс и значительным пропитыванием протеза компонентами крови. Однако показатели толщины стенок трансплантатов, эксплантированных после 20 недель функционирования свидетельствуют о превосходстве протеза из ПКЛ с желатином и мпвс (т.е. формирование внутренней выстилки было значительно медленнее, а это косвенно позволяет прогнозировать его более длительное функционирование по сравнению с остальными). В процессе работы было выявлено, что показатели толщины стенки экспериментальных протезов на 20 неделе наблюдения не оказывали существенного влияния на объемную и линейную скорость кровотока, что служит благоприятным прогностическим фактором для кровоснабжаемой области.

Анализируя результаты гистологического исследования можно отметить этапность вживления экспериментальных протезов (см. рис. 35):

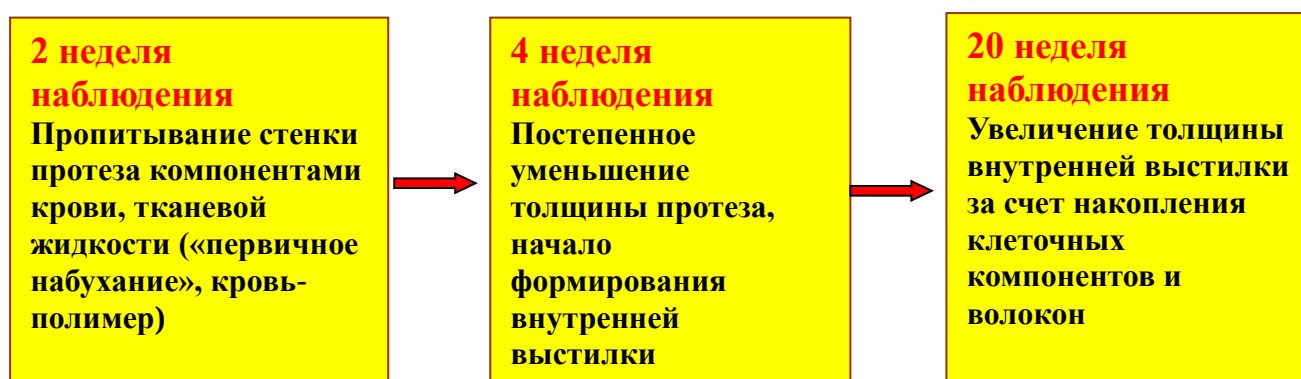


Рисунок 35. Этапы вживления экспериментальных протезов в артериальную позицию.

На всех сроках наблюдения экспериментальные протезы не имели признаков острого или хронического воспаления. Связь трансплантатов с нативным сосудом осуществлялась за счет образования регенеративной ткани, вплетающейся в их концы.

Важной отличительной характеристикой на второй неделе наблюдения у протезов являлась глубина проникновения свежих эритроцитов в их стенку. При этом протезы из чистого поликапролактона характеризовались выраженным пропитыванием форменными элементами крови, тогда как введенный в состав конструкции протеза малопроницаемый внутренний слой ограничивал их проникновение в стенку протеза. С четвертой недели наблюдения у всех типов протезов наружная фиброзная капсула была представлена соединительной тканью богатой кровеносными сосудами, а внутренняя выстилка состояла в большей степени из эластических волокон, ГМК и имела участки с разной степенью утолщения. Во всех группах исследования в области анастомозов слой неоинтимы был более толстый по сравнению со средней частью протеза. Вероятно, это связано с наличием узловых швов, которые изменяют направление пучков коллагеновых и эластических волокон с циркулярного на перпендикулярное по отношению к плоскости стенки сосуда. На четвертой и двадцатой неделях наблюдения определяются явно выраженные отличия в структуре внутреннего

слоя. При этом у протезов с мпвс он имеет наименьшую толщину с клетками, похожими на клетки эндотелия. А у ПКС из поликапролактона представлен рыхлой структурой, причем клетки, похожие на клетки эндотелия в протезах этого типа не выявляются.

По данным ряда авторов ранее формирование эндотелиального слоя на внутренней выстилке протеза способствует повышению биосовместимости трансплантата, сохранению его проходимости в течение более длительного интервала времени [74;86]. В частности на поверхность протезов одно- и двукратно подсаживали эндотелиальные клетки, после чего такие протезы демонстрировали лучшую проходимость [84;103;144]. Однако клеточное покрытие синтетических протезов имеет достаточно сомнительную перспективу, т.к. еще в 1985 году Rosenman и др., в экспериментальной работе на примере протеза из ПТФЭ показали, что в условиях пульсирующего кровотока клетки почти полностью вымываются с поверхности материала (прикрепленными остаются не более 4%) [121]. Для улучшения эндотелизации, применяли различные вещества стимулирующие адгезию и пролиферацию клеток, например, коллаген, фибронектин, эндотелиальный фактор роста (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), однако убедительных положительных результатов продемонстрировано не было [79].

При иммуногистохимическом исследовании в ходе работы было выявлено, что клетки, попав на синтетическую поверхность, активно ее заселяют, начиная с области анастомоза. Увеличение длительности наблюдения позволяет обнаружить прогрессирующие накопление маркеров гладкомышечных клеток во внутреннем слое у протеза из поликапролактона, тогда как маркеры эндотелиальных клеток практически отсутствуют. Эта особенность является неблагоприятным фактором, приводящим к постепенному сужению внутреннего просвета сосуда. Наибольшее количество маркеров эндотелиальных клеток было выявлено у трансплантата из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс на 4 неделе наблюдения, однако к 20 неделе их количество резко снижалось, что, скорее всего, было связано с деградацией ПЛГА и потерей связанного с этим

полимером клеточного слоя. В этом случае формирование эндотелиального слоя может занять много времени. Протез из ПКЛ с желатином и мпвс занимает промежуточное положение по численности клеточного компонента во внутренней выстилке между тремя типами экспериментальных ПКС и характеризуется постепенным формированием обширных областей клеток экспрессирующих маркеры эндотелиальных клеток.

Критериями безопасности и эффективности хирургического лечения в отдаленном послеоперационном периоде (20 недель) служили 100% выживаемость животных и проходимость шунтов. Результаты нашего исследования подтверждают сложившееся мнение о преимуществах использования метода электроспиннинга для создания протеза кровеносного сосуда. Разработанный нами протокол изготовления протезов содержащих малопроницаемый внутренний слой демонстрирует оптимальные физико-химические показатели, а использование этих трансплантатов с диаметром менее 6 мм возможно, т.к. позволяет сохранить достаточным их внутренний просвет и скорость потока крови к кровоснабжаемой зоне в эксперименте не менее 20 недель.

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. При оценке гемо- и биосовместимости, проходимость для протезов из ПКЛ и протезов из ПКЛ с желатином и мпвс составила 100%, для протезов из ПКЛ с желатином и ПЛГА-мпвс – 93,5%, при этом линейные скорости кровотока во всех типах трансплантатов на 4 и 20 неделях наблюдения не отличались от нормальных. Аневризматического расширения и дефектов трансплантатов не наблюдалось во всех сравниваемых группах, однако внешний диаметр протезов из ПКЛ через 20 недель увеличивается на 10-15%. Толщина стенки протезов варьируется в зависимости от времени имплантации

– увеличиваясь на 2 неделе, слегка уменьшаясь на 4 неделе и значительно увеличиваясь к 20 неделе, при этом протезы с малопроницаемым внутренним слоем способствуют образованию структур соединительной ткани и формированию более тонкой внутренней выстилки с большим количеством эндотелий - подобных клеток в отличие от протезов без такого слоя.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

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

6. Протез не перекручивается и не деформируется во время имплантации, однако необходимо точное соответствие длины и диаметра протеза заменяемому участку сосуда, т.к. его избыток или недостаток может стать

причиной деформации зон анастомозов и, следовательно, его дисфункции. Запрещается использование слишком короткого протеза, т.к. его подтягивание может приводить к отслойке внутреннего слоя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалмасов К.Г. Качество жизни больных с хронической ишемией нижних конечностей / К.Г. Абалмасов, Ю.И. Бузиашвили, К.М. Морозов и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. 2004. -Т.10, -№2. -С.8-12
2. Абалмасов К.Г. Результаты реконструктивных операции у больных с атеросклеротическим поражением артерий дистальнее паховой складки / К.Г. Абалмасов, Ю.И. Бузиашвили, Морозов К.М. с соавт. // Анналы хирургии. 2003. -№2.- С. 47-51.
3. Андреева И. В. Показатели центральной гемодинамики интактных крыс при нагрузочном тесте / И. В. Андреева, А. А. Виноградов, А. В. Савина // Український медичний альманах. 2009. -Т. 12,-№ 3. -С. 7-8.
4. Балюзек Ф.В. Резекция аорты (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Д., 1955. 145с.
5. Барбараш, Л.С. Биологические протезы артерий / Л.С. Барбараш, А.С. Криковцов, И.Ю. Журавлева. -Кемерово, 1996. - 208 с.
6. Барбараш Л. С. 12-летний опыт использования биопротезов для замещения инфраингвальных артерий / Л. С. Барбараш, С. В. Иванов, И. Ю. Журавлева и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. 2006. – Т.12,-№3. –С. 91-97.
7. Белорусов О.С. Отдаленные результаты аллотрансплантации сосудов / О.С. Белорусов, А.З. Трошин, А.Е. Пряников // Тезисы докладов объединенной конференции ангиологов. Тбилиси, 1990. - С.9-10.
8. Бокерия, Л.А. Протезы кровеносных сосудов и кардиохирургические заплаты с тромборезистентными, антимикробными свойствами и нулевой пористостью / Л.А.Бокерия, С.П.Новикова // Бюллетень НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН. 2008 - Т.9. -№4. -С.5-20.
9. Бокерия Л.А. Хирургическое лечение больных с атеротромботическим поражением артерий нижних конечностей – выбор трансплантата при бедренно-подколенном шунтировании / Л.А. Бокерия, М.Б. Темрезев, В.И. Коваленко // Анналы хирургии. 2010. -№2. -С. 5-8.

10. Бурлева Е.П. Значение клинико-эпидемиологического и экономического анализа для организации помощи пациентам с хронической артериальной недостаточностью нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. 2002.-том 8.- №4.-С. 15-20.
11. Буянов В. М. Судьба нейлонового сосудистого протеза // Вестн. хир. им. Грекова. 1959 – № 4 – С. 79–85
12. Волова Т.Г. Материалы для медицины и тканевой инженерии: [Электронный ресурс] учебное пособие / Т.Г. Волова. -Красноярск: Издательство ИПК СФУ, 2009. -262с.
13. Буяновский В.Л. Вена пуповины человека в качестве сосудистого трансплантата: Дис. ... канд. мед. наук / В.Л. Буяновский. -М., 1983. -143 с.
14. Гавриленко А. В. Отдаленные результаты бедренно-подколенных аутовенозных шунтирований реверсированной веной и по методике "in situ". / А.В. Гавриленко, С.И. Скрылев // Ангиология и сосудистая хирургия. 2007. -№3. –Т.13. -С.120-124.
15. Гаспарян С.А. Судьба артериального лиофилизированного гомотрансплантата в организме реципиента. // Архив патологии. 1965. -№7. –С.48-53.
16. Гензер М. С. Производство искусственных кровеносных сосудов из синтетических волокон. – Изв. высш. учебн. завед. Технология легкой промышленности, 1963, N2 (32), -С. 130-137.
17. ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования. –М.:Стандартинформ, 2009. – 19с.
18. ГОСТ Р ИСО 10993-4-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью. –М.:Стандартинформ, 2009. – 32с.
19. ГОСТ 31514-2012 Протезы кровеносных сосудов. Общие технические требования. Методы испытаний. –М.:Стандартинформ, 2012. – 17с.

20. ГОСТ Р ИСО 7198-2013 Имплантаты для сердечно-сосудистой системы. Трубчатые сосудистые протезы. –М.:Стандартинформ, 2013. – 42с.
21. Гущин В.А. Пластика мелких артерий протезами из антимикробного и частично рассасывающегося волокна / В.А. Гущин, Л.В. Лебедев, Н.И. Степанов, Я.С. Кукуруз. // – сб. науч. работ врачей СГВ, 1969, т.2, С. 262-273.
22. Дибиров М.Д. Роль реконструктивных сосудистых операций у больных диабетической ангиопатией / М.Д. Дибиров, Б.С. Брискин, Ф.Ф. Хамитов и др. // Хирургия. 2009. - № 2. - С. 59-63.
23. Диденко Ю. П. Причины выполнения повторных оперативных вмешательств в отдаленные сроки после реконструктивных операций на артериях нижних конечностей у больных облитерирующим атеросклерозом / Ю. П. Диденко, Г. Н. Горбунов // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 11. 2008. Вып. 1. С. 71–76.
24. Доценко Б.М., Тищенко М.А. "Морфологическая перестройка венозного трансплантата в периферической артериальной магистрали" Хирургия 11 (1964): 50-54.
25. Затевахин И.И., Говорунов Г.В., Сухарев И.И. Реконструктивная хирургия поздней реоклюзий аорты и периферических артерий - М. 1993г - 157с.
26. Карпенко, А. А. Гибридные оперативные вмешательства в лечении ишемии нижних конечностей / А. А. Карпенко, А. М. Чернявский, В. Б. Стародубцев и др. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Облитерирующие заболевания сосудов: проблемы и перспективы», Кемерово, 19–20 июня 2009. -Кемерово, 2009. -С. 86–87
27. Кахель Т., Новак В. Поздние результаты трансплантации гомологичных вен в позиции бедренно-подколенного шунта. // Тез.докл. объедин.конф. ангиологов. -Тбилиси, 1990.-с.29-30.
28. Клионер Л.И Ранние и поздние послеоперационные осложнения и повторные реконструктивные операции на бедренно-подколенном сегменте / Л.И. Клионер, Н.И. Беляев // Хирургия. 1981 -№1 -С.88.

29. Княжев В.В. Возможности бедренно-дистального шунтирования аутовеной «in situ» при критической ишемии нижних конечностей. / В.В. Княжев, Д. Големанов, А. Ангелов, А. Анастасов, С. Хрелев, М. Чешмеджиев // Ангиология и сосудистая хирургия. 1999. - Т.5 - №2 - С.79-84.
30. Князев М.Д., Белорусов О.С., Савченко А.Н. Хирургия аорто-подвздошных окклюзий. – Минск: Беларусь, 1980. -256с.
31. Коронарное шунтирование: Рекомендации Американской Ассоциации сердца и Американского кардиологического колледжа ИПК «Платина». – Красноярск, 2000. -199 с.
32. Кохан Е.П. Ранние тромботические осложнения после бедренно-подколенных шунтирований / Е.П. Кохан, О.В. Пинчук, С.В. Савченко // Ангиология и сосудистая хирургия. 2001. -Т.7,- №2. -С. 83-87.
33. Краковский Н.И. Опыт лечения болезни перевязанного сосуда конечностей пластикой лиофильным гомотрансплантатом. // Хирургия. 1960. -№6. –С.120-127.
34. Курьянов П.С. Гиперплазия интимы в зоне сосудистого анастомоза / П.С. Курьянов, Разуваев А.С., Вавилов В.Н. // Ангиология и сосудистая хирургия. 2008.- Т.14.-№4.- С. 146-150
35. Лебедев Л.В. Протезы кровеносных сосудов / Л.В. Лебедев, Л.Л. Плотник, А.Д. Смирнов. –Л., 1981. -192 с.
36. Матвеевский А.С. Экспериментальное и клиническое обоснование использования вены пупочного канатика человека в реконструктивной хирургии периферических артерий нижних конечностей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.С. Матвеевский. –М, 1983. -22 с.
37. Медведев И.А. Демонстрация больной через 1,5 г. после резекции аневризмы дуги аорты с последующей реконструкцией дуги аорты лавсановым протезом. Протокол № 1709 заседания Хирургического общества Москвы и Московской обл. от 08.04.60. Хирургия. 1960. -№9. – С.142-143.
38. Новикова С. П. Анализ физико-механических и структурных характеристик протезов кровеносных сосудов / С. П. Новикова,

Р. Р. Салохединова, С. В. Лосева, Л. Н. Николашина, А. Ю. Левкина // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2012. №4. С27-33

39. Петровский Б.В., Крылов В.С., Венедиктов Д.Д. К вопросу о хирургическом лечении атеросклероза крупных сосудов. Хирургия. 1959. -№12. -С.127.

40. Покровский А.В. Можно ли предсказать исход реконструктивной операции у больных с ишемией нижних конечностей на основании дооперационных исследований. / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.В. Чупин, А.Ф. Харазов // Ангиология и сосудистая хирургия. 2002. - №3. - С.102-109.

41. Покровский А.В. Отдаленные результаты бедренно-подколенного шунтирования выше щели коленного сустава протезом «Экофлон» у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.Е. Зотиков, А.В. Чупин, А.А. Шубин, М.В., Тедеев А.К. // Ангиология и сосудистая хирургия. 2007. - Т.13. -№2. - С.143-149

42. Покровский А.В. Отдаленные результаты и показания к использованию протеза «Gore-Tex» в бедренно-подколенной позиции у больных с атеросклеротическим поражением артерий нижних конечностей / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.Е. Зотиков, А.В. Чупин, А.А. Шубин, М.В. Чихарев // Ангиология и сосудистая хирургия. 2004.- Т. 10.-№2.- С. 91-97

43. Покровский А.В. Применение биологических трансплантатов в бедренно-подколенно-берцовой позиции / А.В. Покровский, В.Н. Дан, А.В. Чупин, О.Г. Грязнов // Ангиология и сосудистая хирургия. 1996. - №3. -С.91-100.

44. Покровский А.В., Дан В.Н., Харазов А.Ф. Современные тенденции в реконструкции инфраингвинального сегмента // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. -2009. –Т. 10. -№6. -С.117.

45. Покровский, А.В. Состояние сосудистой хирургии в России в 2012 году / А.В. Покровский, В.Н. Гонтаренко // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. – Москва, 2013.

46. Покровский А.В. Сравнительный анализ отдаленных результатов аутовенозного шунтирования «in situ» и реверсированной аутовеной у пациентов

с атеросклеротической окклюзией бедренно-подколенно-тибиального сегмента / А.В. Покровский, Ф.В. Чупин, Д.С. Семененко // Материалы 14 съезда (XVIII) международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов. -Ростов-на-Дону, 2003. –С.243-245.

47. Покровский А.В. Страницы истории сосудистой хирургии в России / А.В. Покровский, Ю.П. Богатов //Ангиология и сосудистая хирургия. -1995.-№1. -С.5-23.

48. Пшениснгов К.П. Пути Улучшения результатов пластики артерий: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ярославль, 1985. -22с.

49. Рахматуллаев Р.Р. Диагностика и хирургическое лечение поздних тромбозов бедренно-подколенных и аорто-подвздошно-бедренных шунтов и стенозов дистальных анастомозов: дис. ... докт. мед. наук / Р.Р. Рахматуллаев. –М., 1999. - 298с.

50. Севастьянов В.И. Биосовместимость. // М.: ИЦ ВНИИГеосистем., 1999. –368 с.

51. Семененко Д.С. Сравнительный анализ ближайших и отдалённых результатов аутовенозного шунтирования "in situ" и реверсированной аутовеной у пациентов с атеросклеротической окклюзией бедренно-подколенно-тибиального сегмента // дис. ... канд. мед. наук, М., 2003. - С. 129.

52. Сидоренко Е.С., Шехтер А.Б., Городков А.Ю. и др. Новые углеродсодержащие материалы для изготовления сосудистых протезов с повышенными тромборезистентными свойствами // Тез. докл. объедин. конф. ангиологов. -Тбилиси, 1990. – С.141-142.

53. Смирнова С.В. Использование имплантируемых материалов для пластики диафрагмы у новорожденных. / С.В. Смирнова, А.Ю. Разумовский // Хирургия. -2012. -№11. –С.90-95.

54. Троицкий А.В. Хирургическое лечение поздних стенотических и окклюзионных поражений артерий бедренно-берцового сегмента: дис. ... докт. мед. наук, М., 2002. - 306с

55. Федоров И.В. Чугунов А.Н. Протезы в хирургии грыж: столетняя эволюция. // Герниология. 2004. -№2. -С.45-53
56. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ). Ч. 1. Периферические артерии. М.: Изд-во НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2010.
57. Abbott W., Green R., Matsumoto T. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: Results of a multicenter randomized prospective trial // Journal of Vascular Surgery. 1997; 25; 28-19.
58. Allen B.T., Reilly J.M., Rubin B.G., Thompson R.W., Anderson C.B., Flye M.W., Sicard G.A. Femoropopliteal bypass for claudication: vein vs. PTFE. // Ann. Vase. Surg. - 1996. - Vol.10,№2-P.178-185.
59. Berger K, Sauvage L, Rao A, Wood S. Healing of arterial prostheses in man: its incompleteness. Ann Surg 1972;175(1):118–27.
60. Blajeski A.L., Kottke T.J., Kaufmann S.H. A multistep model for paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. Exp Cell Res 2001;270:277–88.
61. Bohr D.F., A.Somlyo, H.V. Sparks - The cardiovascular system. - In: Handbook of Physiology, S.R. Greiger Ed., American Physiological Society, Bethesda, 1980, pp. 1-31.
62. Chen M., Patra P.K., Warner S.B., Bhowmick S. Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. Tissue Eng. 2007;13(3):579–587
63. Cole J.S., Wijesinghe L.D., Watterson J.K., Scott D.J. Computational and experimental simulations of the haemodynamics at cuffed arterial bypass graft anastomoses//Proc. Inst. Mech. Eng. [H] - 2002 - Vol.216,№2 - P.135-143.
64. Craig K. Hashi, Nikita Derugin, Randall Raphael R. Janairo, Randall Lee, David Schultz, Jeffrey Lotz, Song Li Antithrombogenic Modification of Small-Diameter Microfibrous Vascular Grafts Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2010;30;1621-1627

65. Creech O. J., DeBakey ME, Cooley DA, Halpert B: Structural alterations in human aortic homografts one to two and one-half years after transplantation. // Surg. Gyn. Obstet. 1956; 103; 147-154.
66. Creech O., Deterling R.A., Edwards S. "Vascular Prostheses: Report of the Committee for the Study of Vascular Prostheses of the Society of Vascular Surgery, Surgery, 41:62-80 (1957).
67. Green R.M., Abbott W.M., Matsumoto T., Wheeler J.R., Miller N., Veith F.J., Money S., Garrett H.E. Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized trial. J Vasc. Surg. 2000 Mar;31(3):417-425.
68. Cui W., Zhou Y., Chang J. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery . Science and Technology of Advanced Materials, 2010, 11 (1), 014108
69. Cziperle DJ, Joyce KA, Tattersall CW, et al. Albumin impregnated vascular grafts: albumin resorption and tissue reactions. J Cardiovasc Surg 1992;33:407-14.
70. Mugnai D., Tille J.C., Mrówczyński W., et all. Experimental noninferiority trial of synthetic small-caliber biodegradable versus stable vascular grafts. // Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2013; 146 (2); 400-407
71. Dardik H. The second decade of experience with the umbilical vein graft for lower-limb revascularization. // Cardiovasc. Surg. 1995; 3(3); 265-269.
72. Dardik H., Ibrahim I.M, Sussman B., Kahn M., Sanchez M., et al. Biodegradation and aneurysm formation in umbilical vein grafts. Observations and a realistic strategy. // Ann Surg 1984; 199; 61–68.
73. Del Gaudio C., Ercolani E., Galloni P., et al. Aspirin-loaded electrospun poly(e-caprolactone) tubular scaffolds: potential small-diameter vascular grafts for thrombosis prevention J Mater Sci: Mater Med (2013) 24:523–532
74. Deutsch M., Meinhart J., Fischlein T., Preiss P., Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience.// Surgery. 1999 Nov;126(5):847-55.

75. Devine C., McCollum C. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: A multicenter Trial . J Vasc Surg 2004;40;924-931
76. Drachman D.E., Edelman E.R., Seifert P. et al. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: Change in composition and arrest of growth over six months. J Am Coll Cardiol. 2000;36:2325–2332
77. Edwards W. S., Lyons C. Three years' experience with peripheral arterial grafts of crimped nylon and teflon. – Surg. Gynec. Obstet., 1958, v.107, N1, p. 62-68.
78. Eugster T., Stierli P., Aeberhard P. Intrainguinal arterial reconstruction with autologous vein grafts: Are the results for the in situ technique better than those of non-reversed bypass? A long form follow-up study. // J Card Surg, 42(2), 2001, pp. 221-226
79. Fengxuan Han, Xiaoling Jia, Dongdong Dai, Xiaoling Yang, Jin Zhao, Yunhui Zhao, Yubo Fan, Xiaoyan Yuan Performance of a multilayered small-diameter vascular scaffold dual-loaded with VEGF and PDGF // Biomaterials. 2013; 34; 7302-7313
80. Fu W, Liu Z, Feng B, Hu R, He X, Wang H, Yin M, Huang H, Zhang H, Wang W. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering Int J Nanomedicine. 2014;9:2335-44
81. Groegler FM, Kapfer X, Meichelboeck W. Does carbon improve PTFE bypass material? Proceedings of the 20th World Congress of the International Union of Angiology; 2002 April 7-11; New York.
82. Hajiali H., Shahgasempour S. et all. Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffold and their potential application in vascular tissue engineering. Int J Nanomedicine. 2011;6:2133-41
83. Hasan A., Memic A., Annabi N. et al., “Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts” // Acta Biomaterialia. 2014; 10: 11–25.
84. Herring M., Gardner A., Glover, J. (1978): 'A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium', Surgery, 84, pp. 498-504
85. Hufnagel C. A. The Use of Rigid and Flexible Plastic Prostheses for arterial replacement.- Surgery, 1995, v. 37, N2, p.165-174.

86. Hung H.S., Yang Y.C., Lin Y.C., et al. Regulation of human endothelial progenitor cell maturation by polyurethane nanocomposites. // *Biomaterials*. 2014 Aug;35(25):6810-21
87. Innocente F., Mandracchia, D. et al. Paclitaxel-Eluting Biodegradable Synthetic Vascular Prostheses A Step Towards Reduction of Neointima Formation? *Circulation*. 2009;120:S37-S45
88. Jeanmonod P., Laschke M.W., Gola N. Early host tissue response to different types of vascular prostheses coated with silver acetate or vaporized metallic silver. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014 Jun;47(6):680-8
89. Jonas RA, Ziemer G, Schoen FJ, Britton L, Castaneda AR. A new sealant for knitted Dacron prostheses: minimal cross-linked gelatin. *J Vasc Surg* 1988;7:414-9.
90. Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T. Structural features and mechanical properties in situ bonded meshes of segmented polyurethane electrospun from mixed solvents. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;76:219-29
91. Kimoto, S., Sugia, S. and Tsunoda, M.: Experimental and Clinical Studies on Arterial Homo- and Heterografts Preserved in Alcohol. // *A.M.A. Arch. Surg*. 1954; 69; 549-563.
92. Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, et al. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass: a review of the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;27:357–362.
93. Kota S.K, Kota S.K, Maher L.K , et al.«Surgical revascularization techniques for diabetic foot» *Cardiovasc Dis Res*. Jun 2013; 4; 79-83
94. Kreienberg P.B., Darling R.C., Chang B.B., et al. Early results of a prospective randomized trial of spliced vein versus polytetrafluoroethylene graft with a distal vein cuff for limb-threatening ischemia. *J Vasc. Surg*. 2002;35:299-305
95. Lee S. J., Liu J., Oh S. H., et al. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions *Biomaterials*, 2008, 29, pp 2891–2898

96. Lee J., Tae G., Kim Y. H., et al. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(L-lactide-co-3-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility *Biomaterials* 29 (2008) 1872e1879
97. Li M., Mondrinos M.J., Gandhi M.R., Ko F.K., A.S. Weiss, P.I. Lelkes, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 5999–6008
98. Lindenauer S.M. The fabric vascular prosthesis / S.M. Lindenauer // *Vascular Surgery*. -1989.-Vol. 1, N3. –P.450-460.
99. Liu J., Meisner D., Kwong E., Wu X.Y., Johnston M.R. A novel translymphatic drug delivery system: Implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. *Biomaterials*. 2007;28:3236 –3244.
100. Lopes M. S., Jardini A. L., Filho R. M. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications *Procedia Engineering* 2012;45;1402 –13
101. Lundgren F., Bergquist D., Norgren L. PTFE Bypass to Below-knee Arteries: Distal Vein Collar or Not? A Prospective Randomised Multicentre Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;6: 747-754.
102. Luong-Van E., Grøndahl L., Chua K.N., et al. Controlled release of heparin from poly(e-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials* 2006;27:2042–50.
103. Mansfield, P. B., Wechezak, A. R., Sauvage, L. R. (1975): 'Preventing thrombus on artificial vascular surfaces: true endothelial cell linings', *Trans. Am. Soc. Artif Intern. Organs*, 21, pp. 264-272
104. Marois Y., Paris E., Zhang Z., et al. Vascugraft microporous polyesterurethane arterial prosthesis as a thoraco-abdominal bypass in dogs. *Biomaterials* 1996;17:1289-300.
105. Matsuda T., Ihara M., Inoguchi H., Kwon I.K., Takamizawa K., Kidoaki S. Mechano-active scaffold design of small-diameter artificial graft made of electrospun segmented polyurethane fabrics *J Biomed Mater Res A*. 2005 ;73 :125-31
106. Matthews J. A., Wnek G. E., Simpson D. G., et al. Electrospinning of Collagen Nanofibers *Biomacromolecules*, 2002, 3 (2), pp 232–238

107. McClure M. J., Sell S. A., Simpson D. G., et al. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6, pp 2422–2433
108. McClure M.J., Wolfe P.S., Rodriguez I.A., et al. Bioengineered vascular grafts: improving vascular tissue engineering through scaffold design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2011;21:211-227
109. McKenna K.A., Hinds M.T., Sarao R.C., et al. Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials *Acta Biomaterialia* 2012;8:225–233
110. Miller J. H., Foreman R. K., Ferguson L., Faris A. Interposition vein cuff for anastomosis of prostheses to small artery. *Aust NZ J Surg*, 1984, 54 : 283-285.
111. Mirensky T.L., Nelson G.N., Brennan M.P. et all. Tissue-engineered arterial grafts: long-term results after implantation in a small animal model. *J Pediatr Surg*. 2009 Jun;44(6):1127-32
112. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al. Fowkes F.G.R. and on behalf of the TASC II Working Group Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*.2007;33 (Suppl.):S1-S75.
113. Neville R. F., Tempesta B., Sidawy A. N. Tibial bypass for limb salvage using polytetrafluoroethylene and a distal vein patch. *J Vasc Surg*, 2001, 33 : 266-72.
114. Olivier Goëau-Brissonnière, Frédéric Mercier, Marie Hélène Nicolas Treatment of vascular graft infection by in situ replacement with a rifampin-bonded gelatin-sealed Dacron graft. *J Vasc Surg* 1994;19:739-744
115. Panneton J.M., Hollier L.H., Hofer J.M. Multicenter randomized prospective trial comparing a pre-cuffed polytetrafluoroethylene graft to a vein cuffed polytetrafluoroethylene graft for infragenicular arterial bypass. *Ann Vasc Surg*. 2004;18:199-206
116. Pugsley M.K., R. Tabrizchi - The vascular system. An overview of structure and function. - *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 44 (2), 333-40, 2000.

117. Ratner BD. 2nd ed. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, XII, Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; -2004. –P 851
118. Reedt Dortland RWH van, Leeuwen MS van, Steijling JJF, et al. Long-term results with vein homograft in femoro-distal arterial reconstructions. // Eur J Vasc Surg 1991; 5; 557- 564.
119. Reiber G.E. Epidemiology of foot ulcers and amputations in diabetic foot. In: Levin and O’Neal’s. The Diabetic Foot (6th ed.). Mosby 2001; 13—32
120. Reuda C., Nehler M., Perry D., McLafferty R., Casserly I., Hiatt W., Peyton B. Patterns of artery disease in 450 patients undergoing revascularization for critical limb ischemia: Implications for clinical trial design. J. Vasc. Surg. 2008; 47: 5: 995–1000.
121. Rosenman, J. E., Kempczinski, R. E, Pearce, W. H. et al. (1985b): 'Kinetics of endothelial cell seeding', J Vasc. SurE., 2, pp. 778-784
122. Rossi G, Munteanu FD, Padula G, Carillo FJ, Lord JW. Nonanastomotic aneurysms in venous homologous grafts and bovine heterografts in femoropopliteal bypasses. // Am J Surg 1976; 132; 358-362
123. Rutherford R.B., Baker J.D., Trnst C., Jonhston K.W., Porter J.M., Ahn S., Lones D.N. Recommended for reports dealing with lower extremity ischemia Revised version. J. Vasc. Surg. 1997; 26: 516 – 538.
124. Rutherford Vascular Surgery: 2-Volume Set, 6th Edition By Robert B. 2005
125. Rutherford R.B., Jones D.N. et al. Factors affecting the patency of the infrainguinal bypasses //J.Vasc.Surg. - 1988. - Vol.8. - P.236-246.
126. Rychlik I.J. et al. A meta-analysis to compare Dacron versus polytetrafluroethylene grafts for above knee femoropopliteal arterybypass. // J Vasc Surg. 2014 ; 60; 2; 506-515
127. Sanchez L.A.. Suggs W.D., Veith FJ, Marin ML, Wengerter ICR, Panetta TF. Is surveillance to detect failing Polytetrafluoroethylene bypasses worthwhile?: Twelve-year experience with ninety-one grafts //J. Vase. Surg. - 1993 - Vol.18, №6.,- P.981-989.

128. Sarra de Valence, Jean-Christophe Tille, et all. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model // Article Biomaterials. 2012; 33; 38-47
129. Scales J.T. Tissue reactions to synthetic materials / Scales, J.T. // Proc. R. Soc. Med. -1953. – V46.-P647-651
130. Schaner P.J., Martin N.D., Tulenko T.N., Shapiro I.M. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. J Vasc. Surg. 2004 Jule; 40(1):146-153.
131. Scott SM, Gaddy LR, Sahmel R, Hoffman H. A collagen coated vascular prosthesis. J Cardiovasc Surg (Torino) 1987;28:498-504.
132. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States. Results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. Circulation. 2004; 110:738-43
133. Siddique M.K., Bhatti A.M. A two-year experience of treating vascular trauma in the extremities in a military hospital. J. Pak. Med. Assoc. 2013;63(3);327-330
134. Soletti L, Hong Y, Guan J, Stankus JJ, El-Kurdi MS, Wagner WR, et al. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. Acta Biomaterialia. 2009;6:110–22.
135. Soliman S, Sant S, Nichol JW, et al. Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2011;96A:566–74.
136. Sottiurai V.S. Distal anastomotic intimal hyperplasia: histocytomorfology, pathophysiology, etiology and prevention. Int.J.Angiol. 1999; Jan: 8(1): 1-10
137. Soyer T., Lempinen M., Cooper P. et al. A new venous prosthesis. // Surg. 1972; 72; 864 – 872
138. Stegemann J.P., Kaszuba S.N., Rowe S.L. Review: Advances in vascular tissue engineering using protein-based Biomaterials. Tissue Engineering. 2007;13:2601–13.

139. Stekelenburg M., Rutten M.C., Snoeckx L.H., Baaijens F.P. Dynamic straining combined with fibrin gel cell seeding improves strength of tissue-engineered small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering - Part A*. 2009;15:1081–9.
140. Stitzel J., Liu J., Lee S. J., Komura M., et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute *Biomaterials*; 2006; 27; pp1088–1094
141. Stoney R.J. The arterial autograft / R.J. Stoney, D.P.Connelly // *Vascular Surgery*. –Colorado, 1995. –V.1. –P.475-481
142. Szilagyi D.E., Elliot J.P., Hagemann J.H. et al. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes. // *Ann. Surg.* 1973; 178; 232-246.
143. Tanzi M.C., Fare S, Petrini P. In vitro stability of polyether and polycarbonate urethanes. *J Biomater Appl* 2000;14:325-48.
144. Tiwari A., Kidane A., Salacinski H. et all. Improving endothelial cell retention for single stage seeding of prosthetic grafts: use of polymer sequences of arginine-glycine-aspartate. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 Apr;25(4):325-9.
145. Uttayarat P., Perets A., Li M., Pimton P., et all. (2010). Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts, *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, No. 11, pp. 4229–4237, ISSN 1742-7061
146. Vaz CM, van Tuijl S, Bouten CVC, Baaijens FPT. Design of scaffolds for blood vessel tissue engineering using a multi-layering electrospinning technique. *Acta Biomater* 2005;1:575–82.
147. Veith F.J., Moss C.M., Sprayregen S., et al. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity. *Surgery* 1979;85:253–256.
148. Vukobratov V., Kaanski M., Pasternak J., et al. Femoro-popliteal reconstructions: "in situ" versus "reversed" technique: comparative results. *Medicinski Pregled*. 2006;59:360-364 UI 17140037
149. Wise S. G., Byrom M. J., Waterhouse A., et al. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomater* 2011;7:295–303

150. Wu H., Fan J., Chu C.C., Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Dec;21(12):3207-15
151. Xue L., H.Greisler - Biomaterials in the development and future of vascular grafts. - *J. Vasc. Surg.*, 37 (2), 472-480, 2003
152. Zhang Y., Huang Z. M., Xu X., Lim C. T., «Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin bi-component nanofibers by coaxial electrospinning» *Chemistry of Materials*, 2004, 16 (18), pp 3406–3409
153. Zhang Z., Marois Y., Guidoin R.G., et al. Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoro-popliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. *Biomaterials* 1997;18:113-24.