

УДК 616.13-77:577.11

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ IN VITRO БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ИМПЛАНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Л. В. АНТОНОВА¹, В. В. СЕВОСТЬЯНОВА¹, А. М. СЕЙФАЛИАН², В. Г. МАТВЕЕВА¹,
Е. А. ВЕЛИКАНОВА¹, Е. А. СЕРГЕЕВА¹, Т. В. ГЛУШКОВА¹, Е. О. КРИВКИНА¹, М. В. НАСОНОВА¹,
Д. К. ШИШКОВА¹, Ю. А. КУДРЯВЦЕВА¹, О. Л. БАРБАРАШ¹, Л. С. БАРБАРАШ¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

² *Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*

На основе поликапролактона (ПКЛ) и композиции полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона (ПГБВ/ПКЛ) методом электроспиннинга изготовлены сосудистые графты диаметром 2 мм. Структура поверхности графтов изучена методом сканирующей электронной микроскопии, физико-механические свойства – на разрывной машине (n=20), вязкоэластические свойства – на установке артериального пульсирующего потока (n=12). Оценена гемосовместимость и тромборезистентность внутренней поверхности графтов (n=12). С использованием культуры эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 изучены адгезивные характеристики и жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных матриксах в течение 6 суток.

Разработанные ПКЛ- и ПГБВ/ПКЛ-графты состояли из полимерных нитей диаметром до 4 мкм, которые при своем хаотичном расположении формировали поры размером до 40 мкм. ПКЛ-графты были в 2,7 раза менее прочными, но в 10,7 раза более эластичными, чем аутолены (p<0,001). Жесткость ПКЛ-графтов 2,9 раза превысила жесткость аутолен (p<0,001). Добавление в полимерный состав графтов ПГБВ способствовало повышению прочности материала в 1,9 раза и снижению его относительного удлинения в 1,8 раза (p<0,001). Жесткость материала при этом возросла в 6,9 раза (p<0,001). Вязкоэластические свойства полимерных графтов статистически значимо отличались от вязкоэластических свойств артерий (p<0,001), однако были с ними более схожи, чем с аналогичными свойствами сосудистых имплантов из Dacron и ePTFE. После контакта с кровью на внутренней поверхности ПГБВ/ПКЛ-матрикса обнаружили минимальное количество протеинов и форменных элементов крови, активации тромбоцитов не происходило. На поверхности ПКЛ-матрикса отмечена активация тромбоцитов и большее количество белка. После культивирования клеток линии Ea.hy 926 на поверхности ПКЛ-матрикса абсолютное количество клеток оказалось в 1,5 раза меньше, чем на культуральном пластике. Введение в состав полимерной композиции ПГБВ привело к увеличению количества адгезированных клеток, которые располагались как на поверхности, так и внутри матрикса. Достоверного снижения клеточной жизнеспособности при культивировании на полимерных матриксах не отмечено.

Ключевые слова: биodeградируемые полимеры, сосудистый имплант малого диаметра, биосовместимость.

COMPARATIVE IN VITRO TESTING OF BIODEGRADABLE VASCULAR GRAFTS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

L. V. ANTONOVA¹, V. V. SEVOSTYANOVA¹, A. M. SEIFALIAN², V. G. MATVEEVA¹,
E. A. VELIKANOVA¹, E. A. SERGEEVA¹, T. V. GLUSHKOVA¹, E. O. KRIVKINA¹, M. V. NASONOVA¹,
D. K. SHISHKOVA¹, YU. A. KUDRYAVTSEVA¹, O. L. BARBARASH¹, L. S. BARBARASH¹

¹ *Federal State Budgetary Scientific Research Institute
for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

² *University College London, London, United Kingdom*

We prepared polycaprolactone (PCL) and polyhydroxybutyrate/valerate (PHBV)/polycaprolactone (PCL) 2 mm vascular grafts using electrospinning. The structure of the graft surface along with the physico-mechanical and viscoelastic properties were investigated by scanning electron microscopy, universal testing machine (n=20), and arterial pulsatile flow circuit (n=12), respectively. We also assessed hemocompatibility and thromboresistance of the inner graft surface (n=12). Cell adhesion and viability were investigated using EA.hy 926, an endothelial cell line that was cultured on the cultural plate, PCL, and PHBV/PCL scaffolds during 6 days.

PCL and PHBV/PCL grafts consisted of $\leq 4 \mu\text{m}$ diameter fibers which were randomly distributed and formed $\leq 40 \mu\text{m}$ diameter pores. The durability, elasticity, and stiffness of PCL grafts were 2,7-fold lower, 10,7-fold higher, and 2,9-fold higher, respectively, compared to

autologous saphenous veins ($p < 0,001$). However, the durability, elasticity, and stiffness of PHBV/PCL grafts were 1,9-fold higher, 1,8-fold lower, and 6,9-fold higher in comparison with PCL grafts ($p < 0,001$). Viscoelastic properties of both PCL and PHBV/PCL grafts differed from native arteries ($p < 0,001$) but were more similar to them than Dacron and ePTFE grafts. After the contact with blood, inner surface of PHBV/PCL grafts contained minimal amount of proteins and blood cells, and there were no signs of platelet activation. However, PCL grafts contained a high amount of proteins and induced platelet activation. After 6 days of culture, the number of EA.hy 926 cells was lower on PCL scaffolds compared to the PHBV/PCL scaffolds and cultural plate; the viability of the cells was similar.

Key words: biodegradable polymers, small-diameter vascular graft, biocompatibility.

Введение

По данным о состоянии здоровья населения России, за последние 5 лет доля сердечно-сосудистых заболеваний среди общей патологии достигла 30,55 %. При этом ишемическая болезнь сердца остается одной из наиболее распространенных форм сердечно-сосудистой патологии [1]. Основным методом хирургического лечения ишемической болезни сердца является аорто-коронарное шунтирование. Кондуитом выбора является аутологичная V. Saphena или A. Mammaria [2]. Тем не менее у трети пациентов невозможно использовать аутологичный сосуд в качестве шунта вследствие того, что он уже был использован либо его свойства необратимо изменены сопутствующими заболеваниями.

На сегодняшний день одной из нерешенных проблем, в том числе в кардиохирургии, является отсутствие протезов для замещения артерий малого диаметра [3]. Однако в этом направлении ведутся активные работы, лидирующими из которых являются разработки по созданию биodeградируемых сосудистых имплантов малого диаметра (менее 4 мм) [4]. На основе биосовместимых биodeградируемых полимеров возможно проектировать и создавать различные варианты гибридных сосудистых графтов: клеточные и бесклеточные, с комплексом биологически активных молекул или белками внеклеточного матрикса [5, 6]. Однако требования к характеристикам подобных изделий настолько высоки, что до сих пор не существует идеального сосудистого импланта, который бы повторял свойства нативного сосуда.

На конечные характеристики разрабатываемых конструкций сосудистых протезов огромное влияние оказывают как свойства используемого материала, так и технология изготовления конечного изделия. Поэтому разработка сосудистых графтов на этапе in vitro требует оценки биосовместимости, тромбогенности, механической прочности и вязкоэластичности.

Цель. В экспериментах in vitro провести сравнительное изучение характеристик трубчатых матриксов, изготовленных из биodeградируемых полимеров и их композиций.

Материалы и методы

1. Изготовление полимерных сосудистых графтов

Трубчатые матриксы изготавливали методом электроспиннинга с помощью аппарата для электростатического формования NANON 01A (MECC Inc., Япония) на основе раствора полигидроксibuтирата/валерата (ПГБВ) с включением гидроксивалерата не более 10 % («Sigma-Aldrich», США) и поликапролактона (ПКЛ) с молекулярной массой 80 000 кДа («Sigma-Aldrich», США) в хлороформе ХЧ (Вектон, Россия). Всего были изготовлены два вида образцов: на основе ПКЛ и на основе ПКЛ и ПБГВ в соотношении 2:1. Для изготовления трубчатых матриц использовали следующие режимы: напряжение – 20kV, скорость подачи – 0,3 мл/ч, игла – 22G, диаметр намоточного коллектора – 2 и 4 мм.

2. Сканирующая электронная микроскопия матриксов

Структура внутренней поверхности и стенки графтов изучена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в условиях высокого вакуума на микроскопе Hitachi S 3400 N (Япония) с формированием на поверхности образцов золото-паладиевого токопроводящего покрытия методом вакуумного напыления (установка Quorum Technologies SC 7640) в течение 240 секунд. Расчетная толщина покрытия 300–320 ангстрем.

3. Изучение механических свойств сосудистых графтов

3.1. Физико-механические испытания сосудистых графтов диаметром 2 мм на основе ПГБВ/ПКЛ ($n=10$) и ПКЛ ($n=10$) осуществляли в условиях продольного растяжения однотипно приготовленных образцов на универсальной испытательной машине (Zwick/roell, Германия). Учитывали показатели прочности и упругодеформативных свойств материала. Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении (MPa), упругодеформативные свойства – по относительному удлинению при растяжении, скорректированному с учетом характера разрушения образцов

и модулю Юнга ($E_{\text{мод}}, \text{МПа}$). В качестве контроля использовали образцы нативных вен человека (*V. Saphena*), применяемых для аортокоронарного шунтирования.

3.2. Оценку вязкоэластических свойств (определение комплаентности стенки) графтов на основе ПГБВ/ПКЛ ($n=6$) и ПКЛ ($n=6$) длиной 50 мм и диаметром 2 мм проводили на установке артериального пульсирующего потока с заданными физиологическими параметрами: частота пульсовой волны – 60 уд/мин, температура в резервуаре – 37 °С, средние параметры давления – 30–90 мм рт. ст. с шагом в 30 мм рт. ст. [7]. Для перфузии графтов в установке применяли гепаринизированную цельную кровь, смешанную с физиологическим раствором в соотношении 2:1. Измерение растяжения стенок испытуемых графтов осуществляли с помощью цветного дуплексного сканирования (*Picus, Pie Medical Systems, Maastricht, Нидерланды*). В каждом из трех участков в течение 12 с производилось шесть измерений растяжения стенки и вычислялось среднее.

После сбора данных комплаентность (C) рассчитывали по формуле 1:

$$C (\% \text{ мм рт. ст.}^{-1} \cdot 10^{-2}) = \frac{(Ds - Dd)/(Dd \cdot 10^4)}{(Ps - Pd)}, \quad (1)$$

где P, D, s, d – давление, диаметр, систола и диастола соответственно. В качестве контроля использовали сосудистые протезы диаметром 4 мм на основе *Dacron* и *ePTFE (Vascutek, Англия)*, а также участки артерий и вен человека, которые забирали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на забор биоматериала.

4. Изучение гемосовместимости и тромборезистентности

Для оценки гемосовместимых свойств *in vitro* применяли стандартизированные методы [8]. Кровь для исследования брали от условно здоровых доноров посредством пункции локтевой вены в пластиковые пробирки с 3,8 % цитратом натрия в соотношении 1:9. Для контакта с кровью образцы трубчатых матриц длиной 60 мм ($n=6$ для каждой разновидности) закрепляли на штуцерах магистралей многоканального перистальтического насоса *Watson-Marlow 2054U/CA24 (Англия)*. Каждую магистраль с фиксированным образцом заполняли кровью. Скорость циркуляции крови составила 0,04 л в минуту при температуре 37 °С.

Для оценки адсорбции протеинов крови время контакта образцов с кровью составило 30 мин. Для исследования параметров агрегации и адге-

зии тромбоцитов образцы инкубировали в богатой тромбоцитами плазме в течение 5 мин. Для изучения поверхности матриц методом сканирующей электронной микроскопии, образцы после контакта с тромбоцитарной плазмой промыли 0,9 % раствором *NaCl*, затем ополаскивали дистиллированной водой и помещали на 24 часа в раствор параформальдегида. После чего однократно ополаскивали в дистиллированной воде и высушивали в термостате при 37 °С. Структуру поверхности матриц после контакта с кровью изучали методом сканирующей электронной микроскопии в условиях высокого вакуума на микроскопе *Hitachi S 3400 N (Япония)*.

Для оценки количественного и качественного состава белков, сорбированных матрицами из крови, выполняли их десорбцию с внутренней поверхности образцов, после тщательной отмывки от крови раствором 0,9 % натрия хлорида. Каждый трубчатый сегмент разрезали на две части, помещали в емкость, содержащую 3 мл раствора 2 М *NaCl* и устанавливали на шейкер при комнатной температуре на 30 мин. Частота встряхивания составила 30 циклов в минуту. Раствор трижды заменяли и сливали в одну пробирку. Далее полученный раствор помещали в герметичные целлюлозные мембраны (*Sigma-Aldrich*) и подвергали диализу против 0,9 % раствора *NaCl* в течение 24 ч с трехкратной сменой раствора. Затем раствор концентрировали при комнатной температуре до объема 0,5 мл, в котором в последующем определяли количество белка. Оценку суммарного количества сорбированных белков крови осуществляли по методу Бредфорда [9]. Количество белка рассчитывали по формуле:

$$C = K \cdot V,$$

где C – количество белка в пробе в мкг, K – концентрация белка, определяемая по калибровочной кривой (мкг/мл), V – объем пробы белка (мл).

5. Изучение клеточной адгезии, жизнеспособности и проникновения в толщу полимерных матриц

В работе использована культура эндотелиальных клеток *EA.hy 926*, любезно предоставленная *Dr. Cora-Jean C. Edgell* из университета Северной Каролины, США. Культура сохраняет основные морфологические, функциональные и фенотипические свойства, характерные для эндотелиальных клеток. *EA.hy 926* культивировали в полной питательной среде, содержащей *DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США)*, 10 % эмбриональную телячью сыворотку, (*Gibco, США*), 2 % *HAT (Sigma-*

Aldrich, США), 1 % HEPES буфер (Gibco, США), 1 % раствор L-глутамин с пенициллином и стрептомицином (Gibco, США), 0,4 % амфотерицин-Б (Gibco, США) при 5 % CO₂ и температуре 37°. Образцы стерильных нетканых матриц с помощью 0,6 % раствора агарозы LE 2 (Helicon, США) фиксировали на дно 24-луночного культурального планшета. На образцы нетканых матриц и в контрольные (пустые) лунки планшета вносили по 2×10⁵ клеток EA.hy 926 и культивировали в течение 6 дней. Абсолютное количество клеток на 1 мм² поверхности и относительное содержание погибших клеток оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. С этой целью за 2 часа до окончания срока культивирования клеток в среду вносили мембранный флуоресцентный краситель PKH26 (Sigma-Aldrich, США) в количестве 2 мкг/мл среды, за 30 мин до микроскопического исследования добавляли ядерный флуоресцентный краситель Hoechst (Sigma-Aldrich, США) в количестве 2 мкг/мл среды. Флуоресцентная микроскопия выполнена на интертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Для подготовки образцов к микроскопии их отделяли от агарозы и переносили в стерильный 24-луночный планшет клетками вниз. Подсчет количества клеток проводился в 10 различных полях зрения при увеличении 200 с последующим пересчетом на 1 мм² изучаемой поверхности.

Количество погибших клеток исследовали с помощью комбинированного окрашивания этидиумом бромидом 0,03 мг/мл (оранжевое окрашивание ядер погибших клеток) и раствором акридинового оранжевого в соотношении 1:10 в фосфатно-солевом буфере (Bio-optica, Италия) (зеленое окрашивание цитоплазмы всех клеток). Красители вносили на образцы за 3 мин до микроскопии. Пробоподготовку и подсчет количества мертвых клеток проводили аналогично описанному ранее способу. Флуоресцентная микроскопия выполнена на микроскопе Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) и на лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Формула для расчета относительного количества погибших клеток: % погибших клеток = (Абсолютное количество погибших клеток на 1 мм² поверхности/Абсолютное количество клеток на 1 мм² поверхности) × 100 %.

б. Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова.

Достоверность различий определяли с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни и Вилкоксона. При всех видах статистического анализа учитывался уровень статистической значимости 95,0 % (p<0,05). Данные представляли как медиана и 25 и 75 процентиля – Me (25 %; 75 %).

Результаты

Морфология полимерных графтов. При изучении структуры внутренней поверхности ПКЛ- и ПГБВ/ПКЛ-графтов с помощью СЭМ выявлено, что внутренняя поверхность матриц была представлена хаотично расположенными нитями толщиной от 1,8 до 4,0 мкм и наличием пор между нитями размером, достигавшим 40,0 мкм (рис. 1).

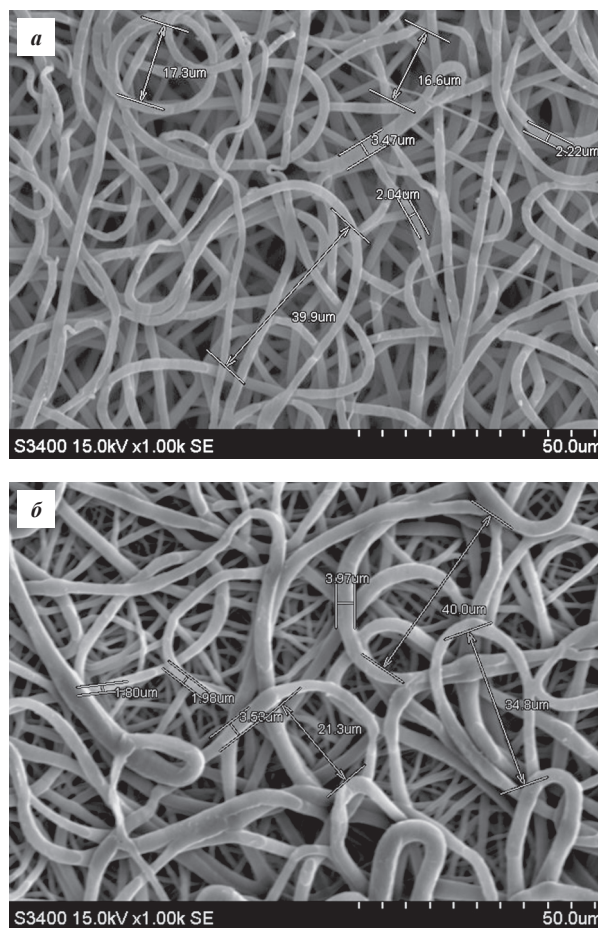


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия полимерных нетканых матриц: а – структура внутренней поверхности ПКЛ-трубчатого матрикса, ув. x 100; б – внутренняя поверхность ПГБВ/ПКЛ-трубчатого матрикса, ув. x 1000

Результаты физико-механических испытаний (табл. 1) показали, что графты, изготовленные из ПКЛ, были в 2,7 раза менее прочными, но в 10,7 раза более эластичными, чем аутолены

($p < 0,001$). Жесткость ПКЛ-графтов 2,9 раза превысила жесткость аутоген ($p < 0,001$). Добавление в полимерный состав графтов ПГБВ способствовало повышению прочности материала в 1,9 раза и снижению его относительного удлинения в 1,8 раза ($p < 0,001$). Однако жесткость материала при этом возросла в 6,9 раза ($p < 0,001$).

Таблица 1

Физико-механические свойства полимерных графтов и аутоген

Показатель	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	$E_{\text{мол}}$, МПа
ПКЛ, n=10	3,72 (3,35–4,51)*	779,92 (743,35–802,31)*	4,025 (3,52–5,71)
ПГБВ/ПКЛ, n=10	7,05 (5,58–8,02)	431,33 (397,3–574,55)*	28 (22–32,9)*
V. Saphena, n=10	10,09 (8,05–12,13)	73,1 (62,8–81,8)	1,37 (0,89–1,75)

* Достоверность отличия показателя от группы сравнения (V. Saphena), $p < 0,001$.

Вязкоэластические свойства (комплаентность) ПКЛ- и ПГБВ/ПКЛ-графтов были изучены в сравнении с комплаентностью подвздошных артерий и вен человека, а также синтетических сосудистых протезов из Dacron и ePTFE, (табл. 2).

Таблица 2

Комплаентность (С, процент на мм рт. ст. · 10⁻²) полимерных графтов в сравнении с подвздошными артериями и венами человека, сосудистыми имплантатами на основе Dacron и ePTFE

С	ПКЛ	ПГБВ/ПКЛ	Артерия	Вена	Dacron	ePTFE
При 30 мм рт. ст.	6,1± 5,2*	4,4± 4,2*	18,3± 12,8	24,2± 13,1	1,9± 0,8*	1,8± 0,5*
При 60 мм рт. ст.	4,7± 3,6*	3,2± 2,9*	8,9± 7,3	3,4± 0,9	1,9± 0,3*	1,7± 0,4*
При 90 мм рт. ст.	2,8± 2,1	2,5± 2,1	3,5± 1,1	2,1± 1,0	1,8± 1,0	0,8± 0,2

* $p < 0,05$; достоверность различий в сравнении с аналогичными показателями артерий и вен.

Выявлено, что комплаентность артерий снижалась при повышении среднего давления. Сосудистые импланты из Dacron и ePTFE продемонстрировали среднюю комплаентность в 1,8–2 % на мм рт. ст. · 10⁻², и этот параметр достоверно не менялся на всем диапазоне давления, что статистически значимо отличалось от комплаентности артерий ($p < 0,001$). Комплаентность графтов на основе ПКЛ и ПГБВ/ПКЛ статистически значимо отличалась от комплаентности артерий ($p < 0,001$), однако была более схожа с комплаентностью артерий, чем с таковой сосудистых имплантов из Dacron и ePTFE.

Гемосовместимость и тромборезистентность. Гемосовместимый материал – это материал, который не вызывает изменений функций крови и трансформации ее компонентов. Поверхность гемосовместимого материала должна быть устойчивой к адгезии тромбоцитов и не вызывать их активации, а также должна обладать минимальной сорбционной активностью по отношению к белкам крови. Результаты исследований показали, что через 30 мин контакта с кровью на внутренней поверхности ПГБВ/ПКЛ-матрикса обнаруживали минимальное количество протеинов и форменных элементов крови (табл. 3).

Таблица 3

Количество общего белка и альбумина на полимерных нетканых матриксах

№	Вид матрикса	Общее количество белка, мкг/см ² Me(25%–75%)	Альбумин, мкг/см ² Me(25%–75%)
1	ПКЛ	261,28 (215,94–326,79)	31,65 (26,45–33,83)
2	ПКЛ/ПГБВ	167,6 (38,48–220,38)	26,00 (24,34–34,76)

Трубчатые матриксы на основе ПКЛ более пористые и сразу же пропитывались кровью, в отличие от образцов с добавлением ПГБВ, которые дольше сохраняли целостность и равномерно пропитывались кровью на всем протяжении эксперимента. Этим можно объяснить более выраженную сорбцию белков на поверхности ПКЛ-матрикса. Однако доля альбумина по отношению к общему количеству протеинов из группы ПКЛ-образцов составила 12,11 %, а для образцов ПГБВ/ПКЛ – 15,51 %, что свидетельствовало о большей гемосовместимости последних.

На поверхности ПКЛ-матрикса после контакта с кровью в большом количестве визуализировались адгезированные тромбоциты, причем часть из них имела активированную распластанную форму (рис. 2а, б). После контакта поверхности ПГБВ/ПКЛ-матрикса с кровью не происходило активации тромбоцитов, наблюдали лишь единичные адгезированные тромбоциты неизменной формы (рис. 2в, г).

Взаимодействие полимерных матриксах с эндотелиальными клетками. При изучении адгезии и жизнеспособности клеток линии Ea.hy 926 выявлено, что абсолютное количество клеток, культивированных на ПГБВ/ПКЛ-матриксах в течение 6 суток, достоверно не отличалось от такового при культивировании клеток на культуральном пластике (табл. 4). На ПКЛ-матриксах количество клеток оказалось в 1,5 раза меньше по сравнению

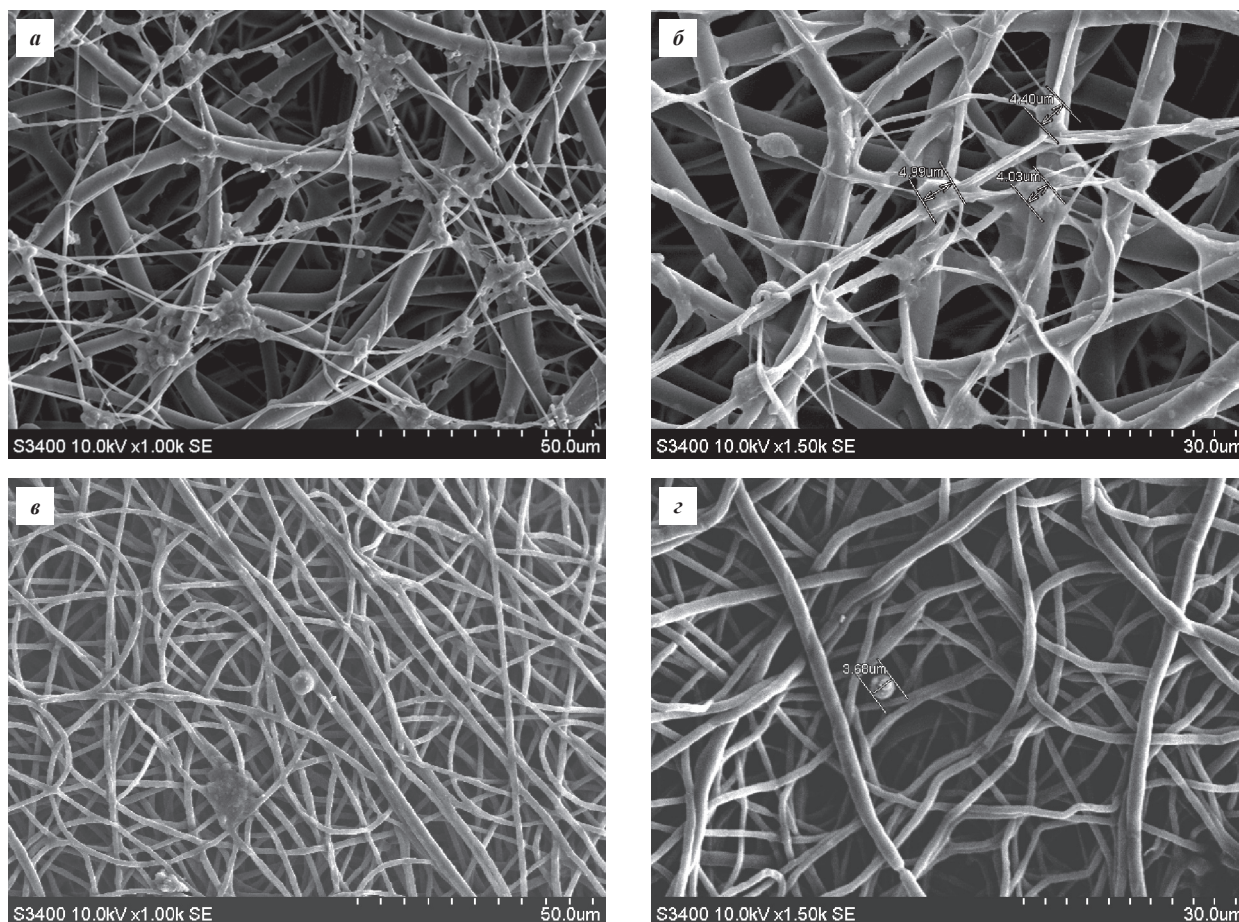


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности трубчатых полимерных матриц после контакта с кровью: а) образец ПКЛ, ув. $\times 1000$; б) образец ПКЛ, ув. $\times 1500$; в) образец ПКЛ/ПГБВ, ув. $\times 1000$; г) образец ПКЛ/ПГБВ, ув. $\times 1500$

с количеством Ea.hu 926 на культуральном пластике спустя 6 суток культивирования ($p < 0,05$). Однако относительное число жизнеспособных клеток, культивированных на полимерных матрицах, достоверно не отличалось от данных по культуральному пластику (табл. 4).

Таблица 4

Результаты клеточной адгезии и жизнеспособности клеток линии Ea.hu 926, культивированных на полимерных матрицах

Вид поверхности	Абсолютное количество клеток линии Ea.hu 926/мм ² , Ме (25%; 75%)	% жизнеспособных клеток линии Ea.hu 926, Ме (25%; 75%)
Культуральный пластик	2 375 (2 367; 2 415)	99,4 (98,93; 99,4)
ПКЛ-матрикс	1 546 (1 529; 1 647)*	97,17 (96,75; 97,38)
ПГБВ/ПКЛ-матрикс	1 842 (1 679; 1 987)	79,3 (72,05; 85,06)

* $p < 0,05$; достоверность различий с группой «культуральный пластик».

Обращает на себя внимание, что эндотелиальные клетки на ПГБВ/ПКЛ-матрицах располагались как на поверхности, так и внутри матриц (рис. 3а), тогда как на ПКЛ-матрицах клетки находились преимущественно под волокнами (рис. 3б). Данную картину можно объяснить слипанием клеток с поверхности ПКЛ-матриц в силу его большей гидрофобности по сравнению с поверхностью ПГБВ/ПКЛ-матриц и механической задержкой клеток в толще ПКЛ-матриц за счет хаотично переплетенных нитей, формировавших сетчатую структуру.

Обсуждение

Использование биосовместимых биорезорбируемых полимеров в качестве основы для создания органозамещающих каркасов становится популярнее с каждым годом. Разработка биосовместимого биodeградируемого сосудистого импланта малого диаметра – тренд современных мировых исследований [4]. Однако высокие требования к прочностным характеристикам, гемо-

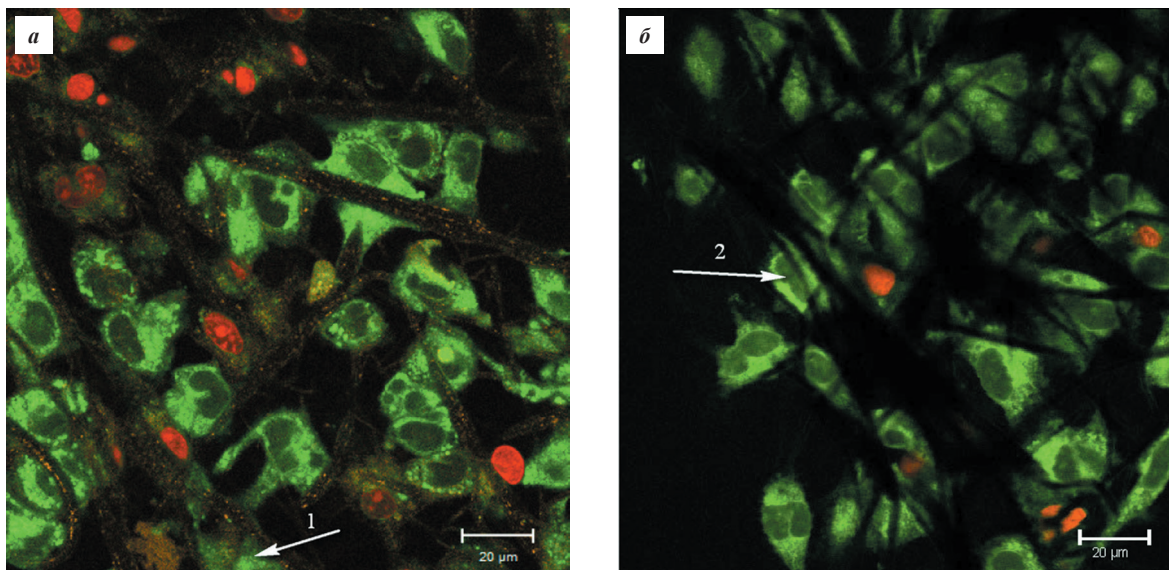


Рис. 3. Лазерная сканирующая микроскопия распределения клеток *Ea.hu 926* на поверхности и в толще полимерных матриц: а) ПГБВ/ПКЛ-матрикс, ув. $\times 400$; б) ПКЛ-матрикс, ув. $\times 400$. Комбинированная окраска клеток флуоресцентными красителями этидиумом бромидом и акридиновым оранжевым. Стрелка 1 указывает на клетку, располагающуюся на поверхности матрикса, стрелка 2 – на клетку, располагающуюся в толще матрикса (под полимерными нитями)

и биосовместимости подобных конструкций значительно усложняют путь к созданию идеального сосудистого имплантата.

Результаты проведенных исследований показали, что на основе одного материала невозможно получить изделие, обладавшее бы максимальной биосовместимостью и схожестью с аутологичным сосудом по физико-механическим характеристикам. Использование комбинации полимеров улучшает определенные характеристики (в частности, гемосовместимость), но одновременно меняет и те, которые были получены ранее. Так, при изучении физико-механических свойств выявлено некоторое несоответствие полимерных графтов биологическому материалу по прочностным и упругодеформативным свойствам. Небольшая жесткость аутоуовен в диапазоне малых деформаций связана со структурными особенностями и обусловлена свободным распрямлением естественной извитости коллагеновых и эластических волокон при нагружении. Показатели жесткости полимерных графтов в разы превысили значения *V. Saphena* по причине отсутствия в структуре графтов материала, подобного коллагеновым и эластиновым волокнам и способного к растяжению и повторной констрикции. Помимо этого, прочность ПКЛ-графтов оказалась достоверно ниже показателей *V. Saphena*. При введении ПГБВ в состав графтов прочность стала сопоставима с прочностью нативного сосуда. При этом относительное удлинение полимерных графтов зна-

чительно превысило данный показатель у *V. Saphena*, что связано с упорядочиванием большого массива полимерных волокон, хаотично расположенных в толще стенок образцов.

Известно, что артерии не подчиняются закону Гука при деформации и не отвечают на давление линейным растяжением [10]. Кроме того, комплаентность артерий уменьшается при повышении давления. Данная особенность описана как анизотропия артерий и не выявлена ни у одного из доступных на сегодняшний день протезных материалов, которые ведут себя изотропически (с малым изменением комплаентности или вовсе его отсутствием при изменении давления). При сравнительном анализе результатов исследования комплаентности полимерных графтов, нативных сосудов и сосудистых имплантов на основе Dacron и ePTFE выявлено, что вязкоэластические свойства ПКЛ- и ПГБВ/ПКЛ-графтов соответствуют комплаентности артерий и вен человека больше, чем вязкоэластические свойства имеющихся на рынке синтетических сосудистых протезов на основе Dacron и ePTFE. Поэтому в случае устранения излишней жесткости и инкорпорирования клеток в толщу стенки вязкоэластические свойства ПКЛ- и ПГБВ/ПКЛ-графтов могут приблизиться к свойствам артерий.

Биосовместимость, гемосовместимость и тромборезистентность материала, из которого изготавливаются сосудистые графты, способны обеспечить их долгосрочную проходимость в организме

после имплантации. В своих экспериментах мы наглядно продемонстрировали, что изменение состава полимерного материала (в частности, использование комбинации ПГБВ+ПКЛ) улучшает гемосовместимость и тромборезистентность внутренней поверхности полимерных графтов и обеспечивает полноценность клеточной адгезии. Адгезия клеток с последующим сохранением клеточной жизнеспособности является необходимым свойством в случае заселения внутренней поверхности сосудистых графтов эндотелиальными клетками in vitro.

Таким образом, полученные результаты подтверждают потенциальную возможность использования полимерных графтов на основе поликапролактона и комбинации полигидрокситутирата/валерата и поликапролактона в качестве основы для создания сосудистых имплантов малого диаметра.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бокерия Л. А., Гудкова Р. Г. Сердечно-сосудистая хирургия 2013. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М.; 2014.
Bokeriya L. A., Gudkova R. G. Serdechno-sosudistaya khirurgiya 2013. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya. M.; 2014.
2. Desai M., Seifalian A. M., Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2011; 40 (2): 394–398.

3. Бокерия Л. А., Бершвили И. И., Солнышков Л. Э. и др. Повторные операции у больных ишемической болезнью сердца – современное состояние проблемы. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН. 2009; 10(3): 5–27.

Bokeriya L. A., Berishvili I. I., Solnyshkov L. E. i dr. Povtornye operatsii u bol'nykh ishemicheskoy bolezniyu serdtsa – sovremennoe sostoyanie problemy. Byulleten' NTSSKh im. Bakuleva RAMN. 2009; 10(3): 5–27.

4. Hasan A., Memic A., Annabi N., Hossain M., Haul A., Dokmeci M. R. et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. Acta Biomater. 2014; (10): 11–25.

5. Catto V., Fare S., Freddi G., Tanzi M. C. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. ISRN Vasc. Med. 2014; Article ID 923030: 1–27. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/923030>.

6. Patel H., Bonde M., Srinivasan G. Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. Trends Biomater. Artif. Organs. 2011; 25 (1): 20–29.

7. Seifalian F. M., Salacinski H. J., Tiwari A., Edwards A., Bowald S., Hamilton G. In vivo biostability of a poly(carbonate-urea)urethane graft. Biomater. 2003; (24): 2549–2557.

8. ГОСТ Р ИСО 10993-4-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью. С. 16.

GOST R ISO 10993-4-2009. Izdeliya meditsinskikh izdeliy. Otsenka biologicheskogo deystviya meditsinskikh izdeliy. Chast' 4. Issledovanie izdeliy, vzaimodeystvuyushchikh s krov'yu. С. 16.

9. Шоно Н. И. Метод определения белка по Бредфорду: область применения, преимущества, недостатки. Лабораторное дело. 1989; (4): 4–7.

Shono N. I. Metod opredeleniya belka po Bredfordu: oblast' primeneniya, preimushchestva, nedostatki. Laboratornoe delo. 1989; (4): 4-7.

10. Tai N. R., Salacinski H. J., Edwards A., Hamilton G., Seifalian A. M. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. Br. J. Surg. 2000; (87): 1516–1524.

Статья поступила 09.10.2015

Для корреспонденции:

Антонова Лариса Валерьевна
Адрес: 650002, г. Кемерово,
Сосновый бульвар, д. 6
Тел. 8 (3842) 64-42-38
E-mail: antolv@kemcardio.ru

For correspondence:

Antonova Larisa
Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo,
650002, Russian Federation
Tel. +7 (3842) 64-42-38
E-mail: antolv@kemcardio.ru