

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-99-109

БИОМЕХАНИЧЕСКОЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА *IN SITU*

*Т.В. Глушкова¹, В.В. Севостьянова¹, Л.В. Антонова¹, К.Ю. Клышников¹,
Е.А. Овчаренко¹, Е.А. Сергеева¹, Г.Ю. Васюков¹, А.М. Сейфалиан², Л.С. Барбараш¹*

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

² Centre for Nanotechnology & Regenerative Medicine, UCL Division of Surgery & Interventional Science, University College London (UCL), London, England, UK and NanoRegMed Ltd, London, England, UK

Цель исследования: изучить процессы биомеханического ремоделирования полимерных графтов, модифицированных сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), после имплантации в брюшную аорту крыс. **Материалы и методы.** Сосудистые графты диаметром 2 мм изготавливали из поликапролактона (PCL) и смеси полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона методом электроспиннинга. Модификацию графтов молекулами VEGF осуществляли двухфазным электроспиннингом. Морфологию изготовленных графтов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Физико-механические свойства PCL и PHBV/PCL оценивали по результатам одноосного растяжения и исследования комплаентности. Для PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графтов проводили физико-механические испытания до и после имплантации в брюшную аорту крыс на срок 6 месяцев. Моделирование работы модифицированных графтов осуществляли методом конечных элементов в случае аортокоронарного шунтирования (АКШ). **Результаты.** PCL- и PHBV/PCL-графты по прочности не уступали внутренней грудной артерии человека, но обладали большей жесткостью и способностью к растяжению, а также по вязкоэластическим свойствам были приближены к нативным сосудам. Модификация графтов VEGF способствовала снижению жесткости материалов. После 6 месяцев имплантации PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графты интегрировались с тканями аорты, что способствовало изменению физико-механических свойств графтов в соответствии со свойствами нативного сосуда. Биомеханическое моделирование подтвердило возможность функционирования модифицированных графтов в позиции шунта при АКШ. **Заключение.** PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графты обладают удовлетворительными физико-механическими свойствами и потенциально пригодны для использования при реконструкции кровеносных сосудов.

Ключевые слова: поликапролактон, полигидроксибутират/валерат, сосудистый эндотелиальный фактор роста, сосудистый графт, электроспиннинг.

BIOMECHANICAL REMODELING OF BIODEGRADABLE SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS *IN SITU*

*T.V. Glushkova¹, V.V. Sevostyanova¹, L.V. Antonova¹, K.Yu. Klyshnikov¹, E.A. Ovcharenko¹,
E.A. Sergeeva¹, G.Yu. Vasyukov¹, A.M. Seifalian², L.S. Barbarash¹*

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² Centre for Nanotechnology & Regenerative Medicine, UCL Division of Surgery & Interventional Science, University College London (UCL), London, England, UK and NanoRegMed Ltd, London, England, UK

Aim: to evaluate the biomechanical remodeling of polymer grafts modified with vascular endothelial growth factor (VEGF) after implantation into rat abdominal aorta. **Materials and methods.** Vascular grafts of 2 mm diameter were fabricated by electrospinning from polycaprolactone (PCL) and a mixture of poly (3-hydroxybutyrate-co-

Для корреспонденции: Глушкова Татьяна Владимировна. Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6. Тел. (3842) 64-46-50. E-mail: bio.tvg@mail.ru.

For correspondence: Glushkova Tatyana Vladimirovna. Address: 6, Sosnoviy blvd, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (3842) 64-46-50. E-mail: bio.tvg@mail.ru.

3-hydroxyvalerate) and PCL. The grafts were modified with VEGF by biphasic electrospinning. Morphology of the grafts was assessed by scanning electron microscopy. Physico-mechanical properties of PCL and PHBV/PCL grafts were estimated using uniaxial tensile test and physiological circulating system equipped with state-of-the-art ultrasound vascular wall tracking system. Physico-mechanical testing of PCL/VEGF and PHBV/PCL/VEGF was performed before and after implantation into rat abdominal aorta for 6 months. The modeling of coronary artery bypass grafting (CABG) was performed by finite element analysis for modified grafts. **Results.** Durability of PCL and PHBV/PCL grafts did not differ from that of human internal mammary artery; however, elasticity and stiffness of these grafts were higher compared to internal mammary artery. Viscoelastic properties of the grafts were comparable to those of native blood vessels. Modification of the grafts with VEGF reduced material stiffness. Six months postimplantation, PCL/VEGF and PHBV/PCL/VEGF were integrated with aortic tissue that induced changes in the physico-mechanical properties of the grafts similar to the native vessel. Biomechanical modeling confirmed the functioning of modified grafts in bypass position for CABG. **Conclusion.** PCL/VEGF and PHBV/PCL/VEGF grafts have satisfactory physico-mechanical properties and can be potentially used in the reconstruction of blood vessels.

Key words: polycaprolactone, polyhydroxybutyrate/valerate, vascular endothelial growth factor, vascular graft, electrospinning.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из основных причин смертности населения во всем мире [1]. Большое количество случаев ишемической болезни сердца, заболеваний периферических кровеносных сосудов, цереброваскулярных заболеваний обуславливает высокую потребность в сосудистых протезах малого диаметра для их хирургического лечения. На сегодняшний день клиническим стандартом для проведения шунтирующих операций и реконструкции сосудов малого диаметра являются аутологичные кровеносные сосуды. Однако аутологичные вены и артерии далеко не всегда доступны для проведения операций. В свою очередь, синтетические протезы, такие как Dacron или ePTFE, которые успешно используются для протезирования сосудов большого и среднего диаметра (>6 мм), демонстрируют низкую проходимость при диаметре меньше 5 мм, вследствие тромбоза и гиперплазии неоинтимы [2]. В связи с этим необходимость создания альтернативной замены существующих сосудистых протезов привела к активному развитию тканевой инженерии кровеносных сосудов.

Целью сосудистой тканевой инженерии является создание полноценного кровеносного сосуда, способного функционировать в организме. В настоящее время наиболее перспективным подходом тканевой инженерии является выращивание органа в организме пациента с использованием графтов из биodeградируемых материалов. Сосудистые графты представляют собой временный протез кровеносного сосуда, который заселяется клетками после имплантации, формирующими новую ткань благодаря воспалительному процессу и регенеративным возможностям организма [3].

Для изготовления графтов с целью регенерации тканей *in situ* широко применяют биосовместимые

биodeградируемые полимеры природного происхождения, такие как коллаген, фиброин шелка, хитозан, полигидроксibuтират, а также синтетические полимеры: поликапролактон, полимолочную кислоту, погликолиевую кислоту, полидиоксанон и др. [4, 5]. Однако на сегодняшний день установлено, что несмотря на эффективность используемых материалов, необходима их модификация для ускорения образования эндотелиального слоя на внутренней поверхности сосудистого графта с целью предотвращения тромбообразования и гипертрофии неоинтимы [6]. Ранее нами было показано, что одним из эффективных способов модификации биodeградируемого матрикса для привлечения эндотелиальных клеток является инкорпорирование в его структуру сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) [7].

В свою очередь, функционирование сосудистого графта в кровеносном русле после его имплантации сопровождается деградацией полимера. Значительная деградация полимера при не полностью сформировавшихся тканях сосуда, может привести к потере прочности с последующим образованием аневризм и разрыва стенки графта. В связи с этим при разработке тканеинженерного сосудистого графта крайне важно исследовать его физико-механические свойства как до имплантации, так и после его ремоделирования в процессе функционирования в кровеносном русле.

В работе изучено влияние модификации молекулами VEGF на физико-механические свойства биodeградируемых сосудистых графтов и их изменение в процессе функционирования в условиях организма на примере модели имплантации в брюшную аорту крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление графтов. Графты диаметром 2 мм изготавливали методом электроспиннинга на приборе NANON-01A (MECC, Япония) при параметрах, приведенных в табл. 1. Были изготовлены два вида графтов из биodeградируемых полимеров: 14% раствора поликапролактона (polycaprolactone, PCL) (Sigma-Aldrich, США) и 15% раствора смеси полигидроксибутирата/валерата (polyhydroxybutyrate/valerate, PHBV) (Sigma-Aldrich, США) с PCL в соотношении 1 : 2. В качестве растворителя использовали трихлорметан (Вектон, Россия).

Для модификации графтов использовали VEGF крысы (Sigma-Aldrich, США), который разводили в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мкг/мл и вводили в состав PCL и PHBV/PCL растворов в соотношении 1 : 20 с последующим проведением двухфазного электроспиннинга.

Далее изучали физико-механические свойства и морфологию поверхности изготовленных графтов.

Сканирующая электронная микроскопия. Внутреннюю поверхность графтов изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ. Предварительно осуществляли золото-палладиевое напыление образцов толщиной 30–32 нм.

Имплантация полимерных графтов. PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графты длиной 10 мм имплантировали в брюшную аорту крыс-самцов популяции Wistar массой тела 400–450 г (n = 4 животных в каждой группе). Опыты проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Крыс содержали при свободном доступе к пище и воде на рационе питания. Введение животных в наркоз осуществляли 3% изофлураном, операцию проводили при ингаляционном наркозе 1,5% изофлурана. После проведения срединной лапаротомии открывали забрюшинное пространство, выделяли аорту с последующим пережатием ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Проксимальный и дистальные анастомозы выполняли с использованием шовного материала 8-0. Разрез

ушивали послойно с использованием шовного материала 4-0.

После 6 месяцев имплантации графты выделяли с участками прилежащей аорты. Морфологию графтов изучали гистологическими методами с окраской препаратов гематоксилином и эозином, а также оценивали их физико-механические свойства.

Оценка физико-механических свойств. Одноосное растяжение проводили в соответствии с ГОСТ 270-75. Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении сосудистого сегмента. Для контроля использовали нативную внутреннюю грудную артерию человека (*a. mammaria*) как «золотой» стандарт при операциях аортокоронарного шунтирования (АКШ). В качестве группы сравнения использовали подкожную вену нижних конечностей человека (*v. saphena*), которую также применяют при операциях АКШ, и нативную аорту крыс с целью оценки условий, в которых функционировал графт после имплантации. Испытания проведены на универсальной испытательной машине Zwick/Roell (Zwick GmbH, Германия), с использованием датчика с номинальной силой 50 Н, скорость перемещения траверсы при испытании 10 мм/мин.

Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при растяжении (МПа) до начала разрушения. Поскольку исследуемые биологические образцы и графты имеют существенное различие по толщине, и как следствие, площади поперечного сечения, сравнение их прочности через напряжение не является информативным. В этой связи в качестве альтернативного критерия прочности использовали абсолютное значение максимальной силы, приложенной к образцу до начала разрушения (F_{\max} , Н). Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа), который определяли в диапазонах физиологического давления (80–120 мм рт. ст.).

Сегменты *a. mammaria* и *v. saphena* человека забирали при проведении операции АКШ у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на забор материала.

Комплаентность оценивали для PCL и PHBV/PCL-графтов. В качестве контроля использовали

Таблица 1

Параметры электроспиннинга для изготовления полимерных графтов
Electrospinning parameters for the fabrication of vascular grafts

Материал графта	Напряжение, кВ	Скорость подачи раствора, мл/ч	Игла	Расстояние до коллектора, см	Диаметр штифта-коллектора, мм
PCL	15	0,5	22G	15	2
PHBV/PCL	20	0,3	22G	15	2
PCL/VEGF	18	0,5	27G	15	2
PHBV/PCL/VEGF	23	0,3	27G	15	2

v. saphena человека и как группу сравнения синтетические сосудистые графты Dacron и ePTFE, применяемые в клинической практике.

Для анализа комплаентности использовали метод, основанный на ультразвуковом исследовании перемещения сосудистой стенки графта в ответ на изменение давления пульсирующего потока. Исследование выполняли на установке, имитирующей артериальный пульсирующий поток, на базе лаборатории NanoRegMed (Лондон, Англия).

Испытания проводили при имитации частоты пульса – 60 ударов в минуту и температуре – 37 °С. Для перфузии применяли гепаринизированную цельную кровь, смешанную с физиологическим раствором в соотношении 2:1. Использовали сосудистые сегменты длиной 50 мм ($n = 6$ в каждой группе). Для измерения растяжения стенки при изменении давления применяли цветное дуплексное сканирование Picus (Pie Medical Systems, Нидерланды). Диаметр просвета определяли посредством системы отслеживания движений сосудистой стенки Wall Track Version 2 (Pie Medical Systems, Нидерланды). Регистрацию данных осуществляли при давлении в сосуде 30, 60 и 90 мм рт. ст. Комплаентность рассчитывали по формуле (1).

$$\%C = [(Ds - Dd) / Dd] * 10^4 / (Ps - Pd), \quad (1)$$

где D – диаметр сосуда (мм), P – давление (мм рт. ст.), s – систола, d – диастола [8, 9].

Определение напряжения стенки аорты крысы. Давление в аорте крысы измеряли инвазивно с использованием прикроватного монитора Life Score i BSM-2301K (Nihon Kohden, Япония) ($n = 5$). Введение животных в наркоз и доступ к аорте осуществляли аналогично разделу «Имплантация полимерных графтов». Напряжение было рассчитано по видоизмененному уравнению Лапласа, формула (2)

$$\sigma = P * r/h, \quad (2)$$

где P – давление в сосуде (мм рт. ст.), r – внутренний радиус сосуда (мм), h – толщина стенки сосуда (мм) [8, 9].

Биомеханическое моделирование. В исследовании проводили моделирование методом конечных элементов работы графта в случае АКШ в среде инженерного анализа Abaqus/CAE (Simulia, Франция). Для построения моделей корня аорты и участка коронарного русла использовали данные МСКТ ангиографии пациента М., 54 года. При описании элементов корня аорты использовали нелинейные полиномиальные модели II порядка [10, 11]. Для моделирования физиологического давления выбрали два варианта графтов – PCL/VEGF и PNBV/PCL/VEGF с последующей оценкой напряженно-деформированного состояния.

Статистическая обработка данных. Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Для нормального распределения данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Данные, имеющие распределение, отличное от нормального, представлены в виде медианы (M) и 25 и 75% процентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Морфология графтов

Сканирующая электронная микроскопия PCL, PNBV/PCL, PCL/VEGF, PNBV/PCL/VEGF-графтов показала, что все образцы состояли из волокон и имели высокопористую структуру (рис. 1). Средний диаметр волокон из PCL составил $2,05 \pm 0,69$ мкм, PNBV/PCL – $2,63 \pm 1,14$ мкм. Введение VEGF привело к образованию более тонких волокон. Для PCL/VEGF средний диаметр волокна составил $1,83 \pm 0,92$ мкм, а для PNBV/PCL/VEGF – $1,47 \pm 0,67$ мкм. Введение ростового фактора в полимерные конструкции значимо не повлияло на пористость материалов.

Физико-механические свойства полимерных графтов.

Предел прочности и F_{max} , а также относительное удлинение *v. saphena* были больше данных показателей *a. mammaria* в 4, в 7,5 и 2,57 раза соответственно ($p < 0,05$), при этом модуль Юнга *v. saphena* был в 1,9 раза меньше, чем у *a. mammaria* ($p < 0,05$) (табл. 2).

По пределу прочности PCL графты не отличались от *a. mammaria* ($p > 0,05$) и превосходили ее по F_{max} в 2,8 раза ($p < 0,05$). Однако PCL-графты были менее прочны, чем *v. saphena*, по пределу прочности в 2,7 раза и по F_{max} – в 2,9 раза ($p < 0,05$). Показатели упруго-деформативных свойств PCL-графтов превышали данные показатели нативных сосудов: модуль Юнга более чем в 2 раза, а относительное удлинение – на порядок ($p < 0,05$).

Комбинирование PCL с PNBV для изготовления графтов способствовало повышению прочности и модуля Юнга материала в 1,9 и 7 раз соответственно и снижению его относительного удлинения в 1,8 раза ($p < 0,05$). При достоверно меньшей толщине образцов PNBV/PCL-графты не имели отличий от *a. mammaria* по F_{max} ($p > 0,05$) и обладали большим пределом прочности ($p < 0,05$). Модуль Юнга и относительное удлинение превышали данные показатели *a. mammaria* в 10 и 14,4 раза соответственно ($p < 0,05$).

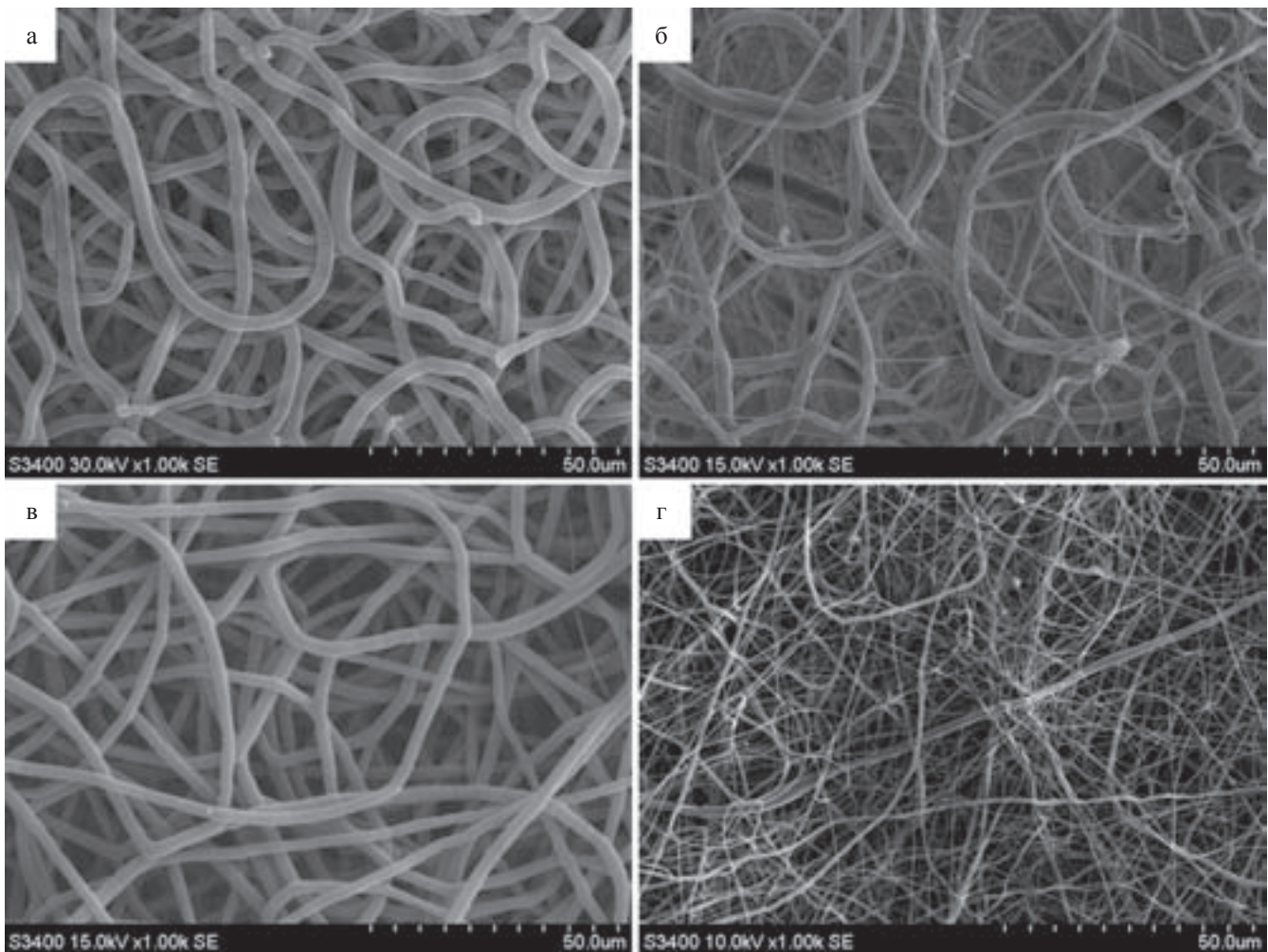


Рис. 1. Изображения сканирующей электронной микроскопии сосудистых графтов, изготовленных методом электроспиннинга: PCL (а), PCL/VEGF (б), PHBV/PCL (в), PHBV/PCL/VEGF (г). $\times 1000$

Fig. 1. Scanning electron microscopy images of electrospun vascular grafts, magnification: PCL (а), PCL/VEGF (б), PHBV/PCL (в), PHBV/PCL/VEGF (г). $\times 1000$

Результаты исследования показали, что комплаентность *v. saphena* нелинейно снижалась с увеличением давления (табл. 3). Комплаентность Dacron и ePTFE была ниже, чем у *v. saphena*, и с повышением давления не изменялась. Графты из PHBV/PCL и PCL показали снижение комплаентности с увеличением среднего кровяного давления, и значения были в 2 раза выше, чем у синтетических протезов ($p < 0,05$).

2. Влияние модификации ростовым фактором на физико-механические свойства полимерных графтов

После введения VEGF в состав PCL графтов наблюдали достоверное снижение прочностных свойств и относительного удлинения в 1,5 раза ($p < 0,05$), а также тенденцию к снижению модуля Юнга (табл. 2). Введение VEGF в состав композиции PHBV/PCL привело к уменьшению предела

прочности в 2 раза, модуля Юнга и относительного удлинения – в 2,4 раза ($p < 0,05$).

По прочностным свойствам PCL/VEGF и PHBV/PCL/VEGF графты не имели отличий от *a. tammaria* ($p > 0,05$). Относительное удлинение обоих видов графтов превышало данный показатель *a. tammaria* в 17,6 и 6 раз, а модуль Юнга – в 2 и 5 раз соответственно ($p < 0,05$).

3. Морфология модифицированных графтов после имплантации

Через 6 месяцев после имплантации PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графтов в брюшную аорту крыс не было выявлено повреждений и аневризм стенки (рис. 4, а, г). Все графты PCL/VEGF были полностью проходимы (рис. 4, б). Среди PHBV/PCL/VEGF-графтов проходимы были 3/4 (75%) (рис. 4, д), в одном графте наблюдали наличие пристеночного тромба. На внутренней поверхности

Таблица 2

Физико-механические свойства полимерных графтов, изготовленных методом электроспиннинга, *v. saphena* и *a. mammaria* человека, аорты крыс

Physico-mechanical properties of electrospun polymer grafts, rat aorta, and human *v. saphena* and *a. mammaria*

	Предел прочности, МПа	Сила, приложенная к образцу до начала разрушения, Н	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа	Толщина образца, мм
PCL (n = 6)	3,72 (3,35–4,51) ^{#а}	2,57 (2,23–2,85) ^{#а}	779,92 (743,35–802,31) ^{#а}	5,16 (4,2–6,84) [#]	0,34 (0,26–0,37) ^{#а}
PCL/VEGF (до имплантации) (n = 6)	2,44 (2,39–2,77) [#]	1,34 (0,92–1,36) [#]	525,74 (476,22–529,86) [#]	4,68 (3,85–4,94) [#]	0,23 (0,21–0,25) [#]
PCL/VEGF (после имплантации) (n = 4)	0,78 (0,58–0,92) ^{#а§}	0,784 (0,625–0,795) ^{#а§}	90,59 (76,94–93,67) ^{#а§}	0,744 (0,508–0,948) ^{а§}	0,51 (0,5–0,8) ^{#а§}
PНBV/PCL (n = 6)	7,05 (5,58–8,02) ^{*а}	1,76 (1,51–2,03) [#]	431,33 (397,3–574,55) ^{#а}	28,0 (22,0–32,9) ^{#а}	0,15 (0,09–0,17) ^{#а}
PНBV/PCL/VEGF (до имплантации) (n = 6)	3,54 (2,64–3,56) [#]	1,55 (1,5–1,78) [#]	178,87 (160,98–384,6) [#]	11,8 (11,6–13,1) [#]	0,28 (0,21–0,33) [#]
PНBV/PCL/VEGF (после имплантации) (n = 4)	1,96 (1,4–2,41) ^{#а§}	2,75 (1,68–3,66) [#]	105,04 (89,47–115,57) ^{#а§}	1,19 (0,82–1,66) ^{а§}	0,65 (0,58–0,73) ^{#а§}
<i>V. saphena</i> (n = 6)	10,05 (7,83–12,13) ^{*§}	7,35 (5,75–7,85) ^{*§}	76,9 (62,8–83,9) ^{*§}	1,26 (0,84–1,75) ^{*§}	0,35 (0,3–0,4) ^{*§}
<i>A. mammaria</i> (n = 6)	2,48 (1,09–3,25)	0,92 (0,59–1,72)	29,86 (25,5–41,6)[§]	2,34 (1,53–2,95)[§]	0,27 (0,23–0,33)[§]
Аорта крыс (n = 6)	3,51 (3,08–4,29)	1,05 (1,0–1,39)	326 (309,87–359,88)	0,19 (0,17–0,21)	0,17 (0,17–0,17)

Примечание. * – p < 0,05 относительно показателей *a. mammaria*; # – p < 0,05 относительно показателей *v. saphena*; а – p < 0,05 относительно показателей полимерного графта с VEGF до имплантации; § – p < 0,05 относительно показателей аорты крыс.

Таблица 3

Комплаентность (процент на мм рт. ст. × 10⁻²) сосудистых PCL- и PНBV/PCL-графтов в сравнении с комплаентностью *v. saphena*, Dacron и ePTFE

Compliance (percent per mmHg × 10⁻²) of vascular PCL- and PНBV/PCL-grafts in comparison with that of *v. saphena*, Dacron and ePTFE

Вид образца	PНBV/PCL	PCL	<i>V. saphena</i>	Dacron	ePTFE
Давление					
30 мм рт. ст.	4,4 ± 4,2*	6,1 ± 5,2*	24,2 ± 13,1	1,9 ± 0,8*	1,8 ± 0,5*
60 мм рт. ст.	3,2 ± 2,9	4,7 ± 3,6	3,4 ± 0,9	1,9 ± 0,3**	1,7 ± 0,4**
90 мм рт. ст.	2,5 ± 2,1	2,8 ± 2,1	2,1 ± 1,0	1,8 ± 1,0	0,8 ± 0,2***

Примечание. * – p < 0,05 относительно показателей *v. saphena* при 30 мм рт. ст.; ** – p < 0,05 относительно показателей *v. saphena* при 60 мм рт. ст.; *** – p < 0,05 относительно показателей *v. saphena* при 90 мм рт. ст.

обоих видов графтов располагались эндотелиальные клетки. Между неокрашенными полимерными волокнами располагались волокна соединительной ткани и клеточные элементы (рис. 4, в, е). Клетки были представлены фибробластами и макрофагами, а также клетками инородных тел. Все исследованные графты были окружены тонкой соединительно-тканной капсулой и не имели признаков острого воспаления.

Выявлено увеличение толщины стенки всех графтов с VEGF относительно неимплантированных образцов более чем в 2 раза (p < 0,05) (табл. 2).

4. Изменение физико-механических свойств модифицированных полимерных графтов после имплантации в кровеносное русло

По F_{max} и модулю Юнга эксплантированные PCL- и PНBV/PCL-графты с VEGF не имели достоверных различий с *a. mammaria* (p > 0,05). Для PCL/VEGF-графтов после 6 месяцев имплантации наблюдали снижение предела прочности в 3,1 раза, силы – в 1,7 раза, относительного удлинения и модуля Юнга – в 6 раз (p < 0,05). PНBV/PCL/VEGF-графты в процессе функционирования в организме животного сохраняли зна-

чение F_{\max} на уровне значений, характерных для данных графтов до имплантации. При этом наблюдали снижение модуля Юнга в 10 раз и относительного удлинения в 1,7 раза ($p < 0,05$) (рис. 2, 3).

Прочность аорты крыс была аналогична *a. mammaria*, относительное удлинение – боль-

ше в 10 раз и модуль Юнга – меньше в 12 раз (табл. 2, рис. 3). Предел прочности и F_{\max} PCL/VEGF-графтов после имплантации были ниже данных показателей аорты крысы в 4,5 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). F_{\max} PNBV/PCL/VEGF-графта после имплантации была больше, чем у

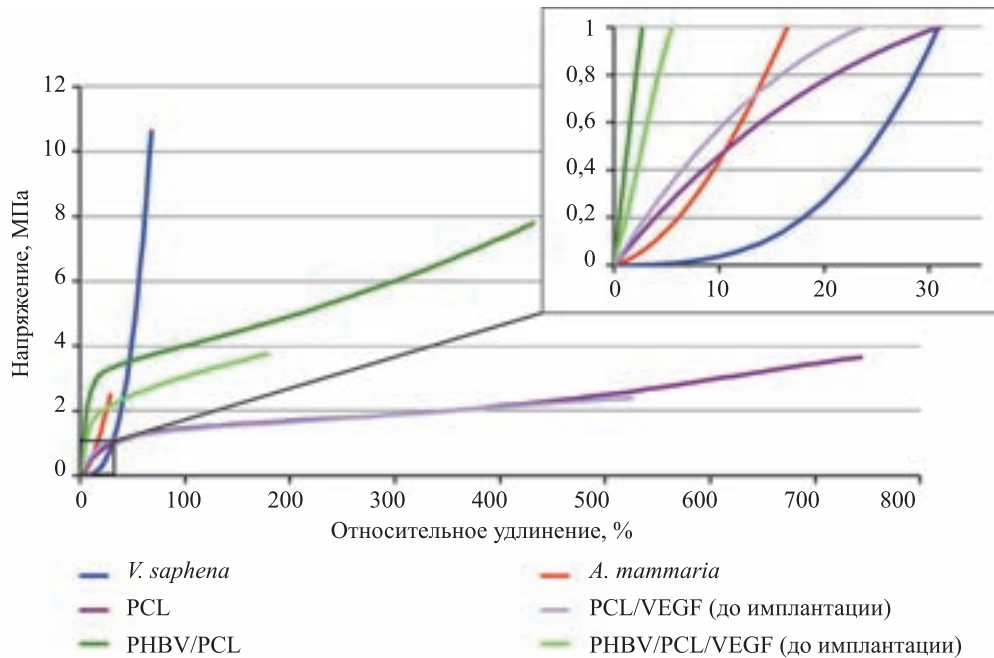


Рис. 2. Физико-механические свойства *a. mammaria* и *v. saphena* человека, полимерных графтов в зависимости от состава

Fig. 2. Physical and mechanical properties of human *a. mammaria*, *v. saphena* and polymer grafts, depending on their composition

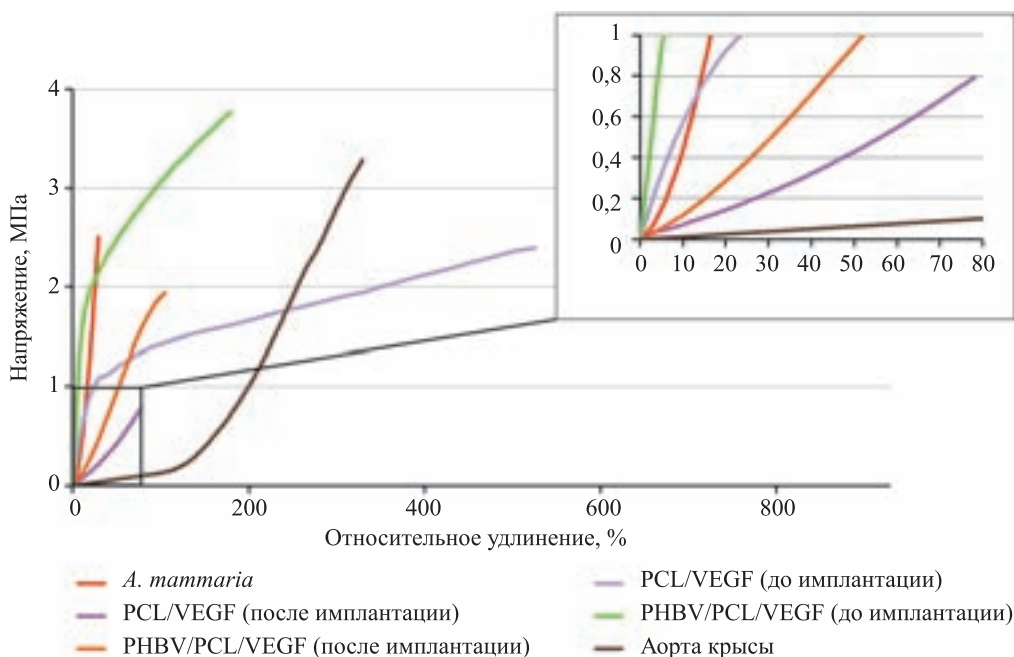


Рис. 3. Физико-механические свойства *v. saphena* и *a. mammaria* человека, аорты крысы, полимерных графтов с VEGF до и после 6 месяцев имплантации в организме крыс

Fig. 3. Physical and mechanical properties of human *a. mammaria* and *v. saphena*, rat aorta, polymer grafts with VEGF before and 6 months after implantation into the body of rats

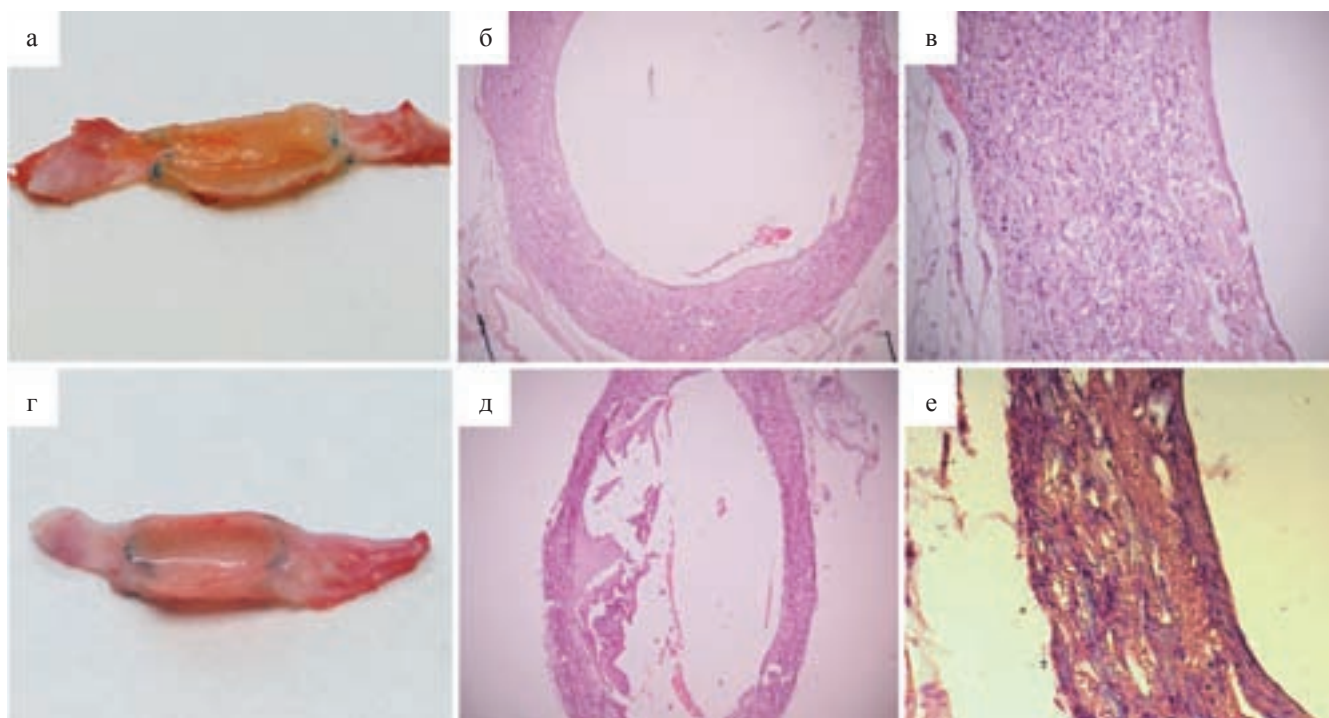


Рис. 4. Сосудистые графты, 6 месяцев после имплантации: макропрепараты графтов PCL/VEGF (а) и PHBV/PCL/VEGF (г) в продольном разрезе; микропрепараты с окраской гематоксилин-эозином PCL/VEGF-графтов с $\times 50$ (б) и $\times 400$ (в), а также PHBV/PCL/VEGF с $\times 50$ (д) и $\times 400$ (е)

Fig. 4. Vascular grafts, 6 months postimplantation: PCL/VEGF (а) and PHBV/PCL/VEGF (г) grafts, longitudinal section; hematoxylin and eosin staining of PCL/VEGF grafts, magnification $\times 50$ (б) and $\times 400$ (в); hematoxylin and eosin staining of PHBV/PCL/VEGF grafts, magnification $\times 50$ (д) and $\times 400$ (е)

аорты крыс, в 2,6 раза, а предел прочности – ниже в 1,8 раза ($p < 0,05$). Модуль Юнга PCL/VEGF- и PHBV/PCL/VEGF-графтов был достоверно выше, чем у аорты крысы, в 3,9 раза и 6 раз, однако на-

блюдалась тенденция к сближению данных показателей (рис. 3).

Давление в брюшной аорте крыс составило 130 ± 10 мм рт. ст. При диаметре брюшной аорты 1,13 мм

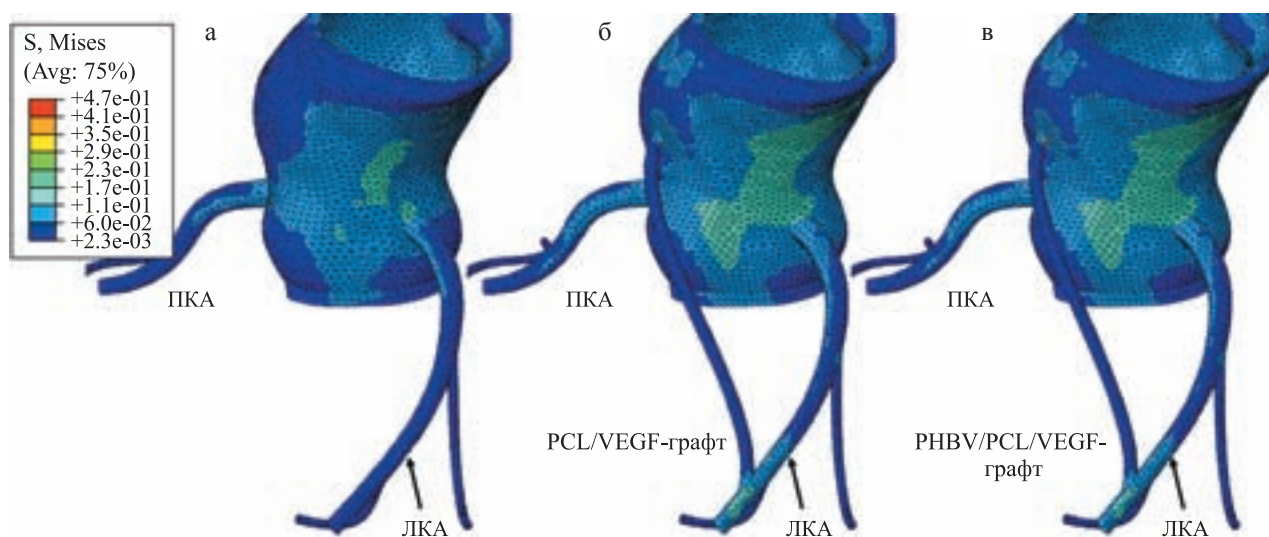


Рис. 5. Распределение напряжения по Мизесу: в случае использования исходной модели корня аорты (а), с PCL/VEGF-графтом (б), с PHBV/PCL/VEGF-графтом (в). Шкала нормирована относительно минимума напряжения модели (а). ПКА – правая коронарная артерия; ЛКА – левая коронарная артерия

Fig. 5. Von Mises stress distribution in a model of the aortic root (а) with PCL/VEGF graft (б), with PHBV/PCL/VEGF graft (в). The scale is normalized to the minimum stress of the model (а). RCA – right coronary artery; LCA – left coronary artery

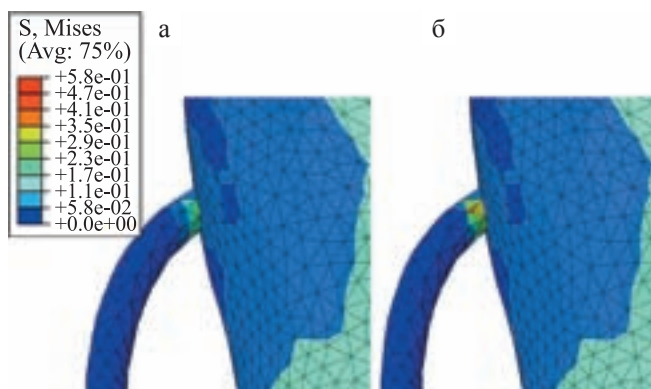


Рис. 6. Возникновение раздела сплошных сред в зоне анастомоза «графт – стенка аорты»: PCL/VEGF-графт (а), PHBV/PCL/VEGF-графт (б)

Fig. 6. The effect of the interaction between objects of different stiffness at the site of graft and aortic wall anastomosis: PCL/VEGF graft (a), PHBV/PCL/VEGF graft (б)

и толщине стенки 0,17 мм напряжение, которое испытывает материал в данной позиции, составило 0,058 МПа.

5. Модель работы графтов при аортокоронарном шунтировании

Напряжение по Мизесу в области коронарных артерий составило – 0,11, 0,13 и 0,045 МПа при использовании PCL/VEGF-, PHBV/PCL/VEGF-графтов и без графта соответственно. Аналогичное распределение исследуемого параметра было зафиксировано и в области соединения графта со стенкой корня аорты – 0,589, 0,585 и 0,42 МПа (рис. 5). Качественный анализ распределения напряжения в зоне данного анастомоза показал наличие высокого градиента при использовании полимерных графтов (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты физико-механических испытаний нативных кровеносных сосудов человека, которые используют при операциях АКШ, показали, что *a. mammaria* выдерживает в значительной степени меньшую нагрузку, чем вены, при этом она более упругая и менее подвержена растяжению, чем *v. saphena*.

Полимерные графты, изготовленные из PCL, не уступают *a. mammaria* по показателям прочности, однако менее прочны, чем *v. saphena*. Кроме того, PCL-графты более способны к растяжению, чем нативные сосуды, и обладают большей жесткостью, что может негативно отразиться на их гемосовместимости и гемодинамических свойствах в условиях циклической нагрузки. Использование PCL в комбинации с PHBV способствует значительному повышению прочности материала, приближая ее к

значениям данных показателей *v. saphena*, но увеличивает жесткость материала.

Механическое поведение материала обусловлено его структурой. В нативных сосудах при нагружении, в первую очередь, происходит выпрямление естественной извитости коллагеновых волокон, при этом напряжение создается волокнами эластина, вследствие чего удлинение материала происходит без существенного увеличения напряжения. Данное поведение материала характеризуется невысоким модулем Юнга. С увеличением деформации волокна коллагена выпрямляются и в большей мере участвуют в создании напряжения, и так как они более жесткие, чем волокна эластина, то кривая напряжения–деформации смещается в сторону увеличения напряжения при малом удлинении [12].

Полимерные графты, несмотря на то что имели высокопористую структуру, при нагружении отвечали повышением напряжения без существенного удлинения, что определяет их большую жесткость. Вероятнее всего, при изготовлении матрикса методом электроспиннинга каждый последующий слой стабилизирует подлежащий, образуя пористую структуру. Исходя из представленной гипотезы, первое усилие тратится на разрыв жесткой связи в местах пересечения волокон, вследствие чего исходные «петли» нитей распрямляются под действием дальнейшего растяжения.

Для нативных сосудов снижение комплаентности при повышении давления является закономерным, однако данная особенность не выявлена при физиологических условиях ни у одного из доступных на данный момент протезных материалов. Стоит отметить, что несмотря на высокую жесткость, PCL- и PHBV/PCL-графты показали хорошую комплаентность относительно Dacron и ePTFE в сравнительном аспекте с *v. saphena*. На основании полученных результатов и данных литературы по вязкоэластическим свойствам графты были более приближены к *v. saphena*, *a. mammaria* и коронарным артериям человека, чем протезы из Dacron и ePTFE [8]. Возможно, что при применении PCL- и PHBV/PCL-графтов в качестве трехмерного каркаса с инкорпорированием клеток их комплаентность будет более близкой к нативным сосудам в сравнении с экспериментами *in vitro*.

Одним из способов улучшения свойств графтов является их функционализация биологически активными молекулами. По результатам исследования модификация полимерных графтов VEGF способствовала снижению показателей упруго-деформативных свойств, что должно благоприятно отражаться на гемосовместимых свойствах материала в условиях пульсирующего кровотока. Однако степень снижения в данном случае была недостаточна для того, чтобы говорить об оптимальности физико-ме-

ханических свойств полимерных композиций. Также эффектом от добавления VEGF можно считать снижение прочностных характеристик, которое является следствием наличия водной фазы внутри волокна. Несмотря на это, полимерные графты с VEGF обладают идентичными с *a. mammaria* прочностными свойствами и потенциально могут быть использованы как ее аналоги. Однако необходимо оценить, достаточно ли будет данной прочности при имплантации с учетом скорости биодеградации данного материала и замещения его биологическими тканями *in situ*.

Эксперимент по имплантации полимерных графтов с VEGF продемонстрировал удовлетворительные результаты. PCL- и PNBV/PCL-графты с VEGF в процессе функционирования *in vivo* в течение 6 месяцев характеризовались хорошей проходимостью. В то же время, по литературным данным, процент проходимости синтетических коммерческих протезов кровеносных сосудов значительно ниже в сравнении с аутологичными, особенно при реконструкции артерий малого диаметра (менее 6 мм) или артерий с небольшим объемом кровотока, таких как коронарные [13]. Хорошая проходимость PCL/VEGF- и PNBV/PCL/VEGF-графтов, клеточная инфильтрация стенки, образование внеклеточного матрикса и формирование тонкой фиброзной капсулы вокруг имплантатов свидетельствует об их хорошей интеграции с тканями нативного кровеносного сосуда.

Несмотря на увеличение толщины стенок графтов, связанной с заселением стенок клетками и формированием в их толще и на поверхности соединительной ткани, PCL-графты с VEGF претерпевали достоверное снижение прочностных характеристик. Однако снижение данных показателей не явилось критичным, нарушений кровотока и аневризм не было выявлено. В свою очередь, увеличение толщины PNBV/PCL-графтов с VEGF позволило сохранить значение F_{\max} , необходимой для разрушения материала, на уровне значений, характерных для этих графтов до имплантации. Увеличение толщины не привело к негативным изменениям упруго-деформативных свойств графтов обоих видов.

Учитывая значение напряжения, которое испытывает стенка аорты крысы в процессе функционирования, можно утверждать, что нативные сосуды при статичном нагружении выдерживают нагрузки, в сотни раз превышающие фактическую нагрузку, которую они испытывают в организме. Поэтому снижение прочности PCL/VEGF-графтов до 0,78 МПа при замещении полимерных волокон на собственную соединительную ткань не стало критичным для адекватного функционирования графта в организме животного при сроке имплантации 6 месяцев. Кроме того, можно предположить, что

ремоделирование имплантированного графта происходит с учетом адаптации под физиологические условия, в которые он помещен.

Для прогнозирования поведения графта в организме пациента был использован пациент-специфический подход. В ходе анализа биомеханического поведения сосудистого графта было показано увеличение напряжения в месте контакта изделия и биологических компонентов относительно исходного состояния, что может являться результатом соединения компонентов с разными физико-механическими характеристиками, в том числе различия в комплаентности объектов.

С другой стороны, полученные значения напряжения по Мизесу оказались существенно ниже пределов прочности, характерных для стенки корня аорты (1,4 МПа [14]), коронарных артерий (0,39–0,45 МПа [11]) и самих сосудистых графтов (2,44 и 3,54 МПа). Кроме того, предполагается, что используемый графт будет подвержен биодеградации с замещением собственными тканями реципиента, что, возможно, позволит нивелировать исходные различия в свойствах до накопления существенных циклических деформаций. Однако данный аспект носит гипотетический характер и должен быть исследован отдельно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разрабатываемые биодеградируемые сосудистые PCL- и PNBV/PCL-графты, модифицированные VEGF, при функционировании в кровеносном русле в течение 6 месяцев не достигают критического предела снижения прочности, а их упруго-деформативные свойства приближаются к свойствам нативных сосудов. Также биомеханическое моделирование демонстрирует возможность применения данных графтов для операций аортокоронарного шунтирования. Таким образом, данные графты являются перспективными для использования в качестве временных протезов с целью формирования тканей кровеносного сосуда *in situ*.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, Barber R, Nguyen G, Feigin VL et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1333–1341. DOI: 10.1056/NEJMoa1406656.
2. Desai M, Seifalian AM, Hamilton G. Role of prosthetic conduits in coronary artery bypass grafting. *Eur Cardiothorac Surg*. 2011; 40 (2): 394–398. DOI: 10.1016/j.ejcts.2010.11.050.

3. Li S, Sengupta D, Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *WIREs Systems Biology and Medicine*. 2014; 6 (1): 61–76. DOI: 10.1002/wsbm.1246.
4. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014; 20 (6): 628–640. DOI: 10.1089/ten.TEB.2014.0123.
5. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Сейфалиан АМ, Матвеева ВГ, Великанова ЕА, Сергеева ЕА и др. Сравнительное тестирование *in vitro* биodeградируемых сосудистых имплантов для оценки перспективы использования в тканевой инженерии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2015; 4: 34–41. DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-34-41. Antonova LV, Sevostyanova VV, Seifalian AM, Matveeva VG, Velikanova EA, Sergeeva EA. Comparative *in vitro* testing of biodegradable vascular grafts for tissue engineering applications. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015; 4: 34–41. DOI: 10.17802/2306-1278-2015-4-34-41 [In Russ, English abstract].
6. Melchiorri AJ, Hibino N, Fisher JP. Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013; 19 (4): 292–307. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0577.
7. Севостьянова ВВ, Головкин АС, Антонова ЛВ, Глушкова ТВ, Барбараш ОЛ, Барбараш ЛС. Модификация матриц из поликапролактона сосудистым эндотелиальным фактором роста для потенциального применения в разработке тканеинженерных сосудистых графтов. *Гены & Клетки*. 2015; X (1): 91–97. Sevostyanova VV, Golovkin AS, Antonova LV, Glushkova TV, Barbarash OL, Barbarash LS. Modification of polycaprolactone scaffolds with vascular endothelial growth factors for potential application in development of tissue engineered vascular grafts. *Genes & Cells*. 2015; X (1): 91–97 [In Russ, English abstract].
8. Montini-Ballarín F, Calvo D, Caracciolo PC, Rojo F, Frontini PM, Abraham GA et al. Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2016; 60: 220–233. DOI:10.1016/j.jmbbm.2016.01.025.
9. Catto V, Farè S, Cattaneo I, Figliuzzi M, Alessandrino A, Freddi G et al. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, *in vitro* biodegradability, and *in vivo* biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015; 54: 101–111. DOI: 10.1016/j.msec.2015.05.003.
10. Овчаренко ЕА, Клышников КЮ, Глушкова ТВ, Бурого АЮ, Журавлева ИЮ. Нелинейная изотропная модель корня аорты человека. *Технологии живых систем*. 2014; 6: 43–47. Ovcharenko EA, Klyshnikov KU, Glushkova TV, Burago AY, Zhuravleva IY. Nelinejnaja izotropnaja model' kornja aorty cheloveka. *Technologii zhivyyh sistem*. 2014; 6: 43–47 [In Russ, English abstract].
11. Claes E, Aienza JM, Guinea GV, Rojo FJ, Bernal JM, Revuelta JM et al. Mechanical properties of human coronary arteries. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010; 2010: 3792–3795. DOI: 10.1109/IEMBS.2010.5627560. PubMed PMID: 21096878.
12. Singh C, Wong CS, Wang X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J. Funct. Biomater*. 2015; 6 (3): 500–525. DOI:10.3390/jfb6030500.
13. Tiwari A, Cheng KS, Salacinski H, Hamilton G, Seifalian AM. Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003; 25 (4): 287–295. PMID: 12651165.
14. Ovcharenko EA, Klyshnikov KU, Yuzhalin AE, Savrasov GV, Kokov AN, Batranin AV et al. Modeling of transcatheter aortic valve replacement: Patient specific vs general approaches based on finite element analysis. *Computers in Biology and Medicine*. 2016; 69: 29–36. DOI: 10.1016/j.combiomed.2015.12.001.

Статья поступила в редакцию 22.04.2016 г.
The article was submitted to the journal on 22.04.2016