

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-94-108

## ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ СОСУДИСТЫЕ ЗАПЛАТЫ – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

Л.В. Антонова<sup>1</sup>, А.В. Миронов<sup>1</sup>, А.Р. Шабаев<sup>1</sup>, В.Н. Сильников<sup>2</sup>, Е.О. Кривкина<sup>1</sup>,  
В.Г. Матвеева<sup>1</sup>, Е.А. Великанова<sup>1</sup>, Е.А. Сенокосова<sup>1</sup>, М.Ю. Ханова<sup>1</sup>, В.В. Севостьянова<sup>1</sup>,  
Т.В. Глушкова<sup>1</sup>, Р.А. Мухамадияров<sup>1</sup>, Л.С. Барбараиш<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация

Проведение каротидной эндартерэктомии с использованием заплаты – наиболее эффективный способ лечения стеноза сонной артерии. Однако применение существующих сосудистых заплат часто ассоциировано с возникновением тромбоза, рестеноза, кальцификации и других осложнений. **Цель исследования:** разработать биodeградируемые заплаты для артериальной реконструкции, содержащие в своем составе VEGF или RGD, и в сравнительном аспекте оценить их биосовместимость и эффективность в экспериментах *in vitro* и в ходе преclinical испытаний на модели крупных лабораторных животных. **Материалы и методы.** Биodeградируемые заплаты из смеси полигидроксibuтирата/валерата (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV) и поликапролактона (poly(ε-caprolactone), PCL) изготовлены методом электроспиннинга и модифицированы фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) или пептидной последовательностью аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) в различных конфигурациях. В экспериментах *in vitro* оценивали структуру поверхности, физико-механические и гемосовместимые свойства. В экспериментах *in vivo* оценивали эффективность разработанных сосудистых заплат в течение 6 месяцев после имплантации в сонную артерию 12 овец. Качество ремоделирования изучали с помощью гистологического и иммунофлуоресцентного исследований эксплантированных образцов. **Результаты.** Заплаты PHBV/PCL/VEGF обладали физико-механическими характеристиками, более приближенными к аналогичным показателям нативных сосудов, а методика их биофункционализации приводила к наименьшему падению прочностных показателей относительно немодифицированных аналогов PHBV/PCL. Модифицирование RGD-пептидами в 2 раза снижало прочность полимерных заплат, не оказывая влияния на их упруго-деформативные свойства. Инкорпорирование VEGF в полимерные волокна снижало агрегацию тромбоцитов при контакте с поверхностью заплат PHBV/PCL/VEGF и не увеличивало гемолиз эритроцитов. Спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец на основе заплат PHBV/PCL/VEGF формировалась полноценная новообразованная сосудистая ткань без признаков сопутствующего воспаления и кальцификации, что свидетельствует о высокой эффективности инкорпорированного в состав заплат сосудистого эндотелиального фактора роста. Напротив, заплаты, модифицированные различными конфигурациями RGD-пептидов, объединяло наличие гиперплазии неоинтимы и хроническое гранулематозное воспаление, присутствовавшее в стенке заплат и развившееся в процессе биорезорбции полимерного каркаса. **Заключение.** Заплаты PHBV/PCL/VEGF обладали лучшей биосовместимостью и более пригодны для реконструкции сосудистой стенки по сравнению с PHBV/PCL/RGD.

*Ключевые слова:* сосудистая заплата, тканевая инженерия, полигидроксibuтират/валерат, поликапролактон, фактор роста эндотелия сосудов, RGD-пептиды, биodeградируемые полимеры, эндотелизация.

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6.  
Тел. (905) 906-04-51. E-mail: antonova.la@mail.ru

Corresponding author: Larisa Antonova. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation.  
Phone: (905) 906-04-51. E-mail: antonova.la@mail.ru

# TISSUE-ENGINEERED VASCULAR PATCHES: COMPARATIVE CHARACTERISTICS AND PRECLINICAL TEST RESULTS IN A SHEEP MODEL

L.V. Antonova<sup>1</sup>, A.V. Mironov<sup>1</sup>, A.R. Shabaev<sup>1</sup>, V.N. Silnikov<sup>2</sup>, E.O. Krivkina<sup>1</sup>,  
V.G. Matveeva<sup>1</sup>, E.A. Velikanova<sup>1</sup>, E.A. Senokosova<sup>1</sup>, M.Yu. Khanova<sup>1</sup>, V.V. Sevostyanova<sup>1</sup>,  
T.V. Glushkova<sup>1</sup>, R.A. Mukhamadiyarov<sup>1</sup>, L.S. Barbarash<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Carotid endarterectomy (CEA) with patch angioplasty is the most effective treatment for carotid artery stenosis. However, the use of existing vascular patches is often associated with thrombosis, restenosis, calcification and other complications. **Objective:** to develop biodegradable patches for arterial reconstruction, containing vascular endothelial growth factor (VEGF) or arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD), and comparatively evaluate their biocompatibility and efficacy in in vitro experiments and during preclinical trials in large laboratory animal models. **Materials and methods.** Biodegradable patches, made from a mixture of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), were fabricated by electrospinning and modified with VEGF or the peptide sequence RGD in different configurations. In in vitro experiments, the surface structure, physicochemical and hemocompatibility properties were evaluated. In in vivo experiments, we evaluated the effectiveness of the developed vascular patches for 6 months after implantation into the carotid artery of 12 sheep. The quality of remodeling was assessed using histological and immunofluorescence studies of explanted specimens. **Results.** The PHBV/PCL/VEGF patches had physicochemical characteristics closer to those of native vessels and their biofunctionalization method resulted in the smallest drop in strength characteristics compared with their unmodified PHBV/PCL counterparts. Modification with RGD peptides reduced the strength of the polymer patches by a factor of 2 without affecting their stress-strain behavior. Incorporation of VEGF into polymer fibers reduced platelet aggregation upon contact with the surface of the PHBV/PCL/VEGF patches and did not increase erythrocyte hemolysis. At month 6 of implantation into the carotid artery of sheep, the PHBV/PCL/VEGF patches formed a complete newly formed vascular tissue without signs of associated inflammation and calcification. This indicates the high efficiency of the VEGF incorporated into the patch. In contrast, the patches modified with different configurations of RGD peptides combined the presence of neointimal hyperplasia and chronic granulomatous inflammation present in the patch wall and developed during bioresorption of the polymer scaffold. **Conclusion.** PHBV/PCL/VEGF patches have better biocompatibility and are more suitable for vascular wall reconstruction than PHBV/PCL/RGD patches.

*Keywords: vascular patch, tissue engineering, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), poly( $\epsilon$ -caprolactone), vascular endothelial growth factor, RGD peptides, biodegradable polymers, endothelialization.*

## ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности и инвалидизации населения всего мира. При этом лидерство сохраняется за атеросклерозом, вследствие которого происходит образование и увеличение атероматозной бляшки, что приводит к нарушению проходимости сосуда и ухудшению кровоснабжения тканей. При этом атеросклероз внутренней сонной артерии (ВСА), приводящий к каротидному стенозу, является причиной 10–15% всех случаев инсульта [1].

Основными способами хирургического лечения стеноза сонной артерии являются каротидная эндартерэктомия (КЭА) и стентирование [2]. В свою очередь, КЭА является «золотым стандартом» хирургического лечения и профилактики острого нарушения мозгового кровообращения, демонстрируя существ-

венное преимущество у асимптомных и симптомных больных с высокой степенью стеноза ВСА [2]. Однако наличие пролонгированных бляшек затрудняет выполнение данной процедуры стандартным и наиболее часто применяемым на практике эверсионным способом каротидной эндартерэктомии. В связи с этим хирурги вынуждены прибегать к закрытию артериотомного доступа с помощью заплаты [3, 4].

На сегодняшний день опубликовано большое количество работ со сравнительными результатами реконструкции сонной артерии с использованием биологических и синтетических заплат. S. Ren с коллегами не выявили разницы по частоте смертности, инсульта и рестеноза при использовании аутоветны, PTFE и Dacron [5]. Однако среднее время оперативного вмешательства было значительно больше при использовании PTFE или Dacron за счет длительного

гемостаза при кровотечениях из проколов иглы, тогда как в случае ангиопластики сонной артерии биологическим материалом (ксеноперикардом) отмечено значительное снижение кровотечений через проколы иглы. При этом использование искусственных заплат ассоциировано с инфицированием и тромбозом, а ксеноперикарда – с высоким риском кальцификации [5].

В недавнем метаанализе восьми рандомизированных контролируемых исследований по оценке эффективности использования заплат PTFE, Dacron и бычьего перикарда не обнаружено достоверных различий по широкому спектру осложнений, включая стеноз в отдаленном периоде [6].

По данным отечественных авторов, частота периперикардальных инсультов в группе с пластикой артерии ксеноперикардом составила 1,5%, а ишемических инсультов в ранний послеоперационный период – 0,26%, при этом данные осложнения не выявлены в группе с заплатами PTFE [7]. В отдаленные сроки наблюдения частота развития гемодинамически значимых рестенозов ВСА более 70% была выше при использовании заплат из PTFE (31,2%), чем при применении ксеноперикардальных лоскутов (9,8%).

Тканеинженерные сосудистые заплаты помогут избежать проблем, возникающих при использовании существующих материалов, благодаря восстановлению собственных тканей в месте имплантации. Для достижения такого результата биodeградируемый матрикс должен обладать высокой биосовместимостью, обеспечивать миграцию клеток в толщу материала, их пролиферацию и дифференцировку. При этом необходимость быстрого формирования из аутологичных клеток эндотелиального монослоя на внутренней поверхности заплат потребовала поиска способов стимуляции этого процесса. В ряде работ было показано, что большой потенциал в стимуляции эндотелизации и регенерации сосудистой стенки на основе тканеинженерного матрикса имеет фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) [8, 9]. Являясь основным ангиогенным фактором роста, VEGF стимулирует миграцию и выживание эндотелиальных клеток, а также привлечение прогениторных клеток из тока крови [10, 11].

Пептиды с последовательностью аргинил–глицил–аспарагиновая кислота (RGD) присутствуют в составе большинства белков внеклеточного матрикса. RGD-последовательность можно считать общим интегрин-связывающим мотивом [12]. Тем не менее тропность к эндотелиальным клеткам делает RGD идеальными агентами для модифицирования тканеинженерных конструкций, контактирующих с кровью и требующих скорейшей эндотелизации поверхности. При этом для модифицирования можно использовать как пептидные последовательности, полученные в ходе процедуры экстракции из при-

родного материала, так и искусственно синтезированные. Последние имеют ряд преимуществ: снижен риск иммунного ответа и инфекции, который может быть связан с недостаточной степенью очистки природного материала. При сравнении функциональных свойств естественных RGD-содержащих белков и их искусственных аналогов последние оказались более эффективны [13].

Таким образом, используемые на сегодняшний день заплаты не могут в полной степени удовлетворить потребности сосудистой хирургии, в том числе из-за отсутствия функциональной активности в плане формирования новообразованной сосудистой ткани на своей основе. Поэтому вопрос выбора заплат, которая отвечала бы всем требованиям, необходимым для снижения риска развития осложнений в раннем и отдаленном послеоперационных периодах, остается по-прежнему актуальным.

**Цель исследования** – разработать биodeградируемые заплаты для артериальной реконструкции, содержащие в своем составе VEGF или RGD, и в сравнительном аспекте оценить их биосовместимость и эффективность в экспериментах *in vitro* и в ходе преclinical испытаний на модели крупных лабораторных животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1. Изготовление биodeградируемых заплат с VEGF

Полимерные матриксы изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония) по протоколу, описанному ранее [14]. Готовили смесь полимеров 5% полигидроксипропанат/валерат (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% поликапролактон (poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL, Sigma-Aldrich, США) в трихлорметане в соотношении 1 : 2. Далее в полимерный раствор в соотношении 20 : 1 вводили сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF (Sigma-Aldrich, США), разведенный в физиологическом растворе до концентрации 10 мкг/мл. Эмульсионный электроспиннинг проводили при следующих параметрах: напряжение – 20 кВ, скорость подачи раствора – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние до коллектора – 15 см, игла – 22G. В качестве коллектора использовали металлический штифт диаметром 8,0 мм. Перед снятием со штифта матрикс разрезали вдоль и снимали отслаивающимися движениями.

В качестве группы контроля выступили немодифицированные заплаты, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси PHBV/PCL в трихлорметане в соотношении 1 : 2.

В качестве группы сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут «КемПериплас-Нео»



(ЗАО «НеоКор», Россия), который в настоящее время активно используется в клинике при проведении каротидной эндартерэктомии в качестве сосудистой заплаты.

## 2. Оценка распределения VEGF в процессе инкорпорирования в состав биодеградируемых заплат PNBV/PCL

Для оценки предполагаемой картины распределения VEGF, вводимого в жидкой фазе в раствор полимера, применена аналоговая технология инкорпорирования в состав PNBV/PCL-матрикса бычьего сывороточного альбумина (BSA), меченого флуорохромной меткой. Для этого раствор PNBV/PCL в хлороформе смешивали с раствором BSA-Texas Red® (Invitrogen, США) в фосфатно-солевом буфере (10 мкг/мл) в соотношении 20 : 1. Электроспиннинг проводили при напряжении 20 кВ, скорости подачи 0,5 мл/ч, в качестве коллектора использовали предметное стекло для микроскопии. Полученные образцы исследовали на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием светофильтра BP 546/12 FT 580 LP 590.

## 3. Изготовление биодеградируемых заплат с RGD и детекция аргининсодержащего пептида на поверхности заплат

Полимерные матрицы изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония) по протоколу, описанному ранее [15].

Перед модификацией RGD-пептидами с поверхности матриц PNBV/PCL удаляли остатки масел и пыли, используя смесь 2-пропанола и воды в соотношении 1 : 1 с дальнейшим промыванием деионизированной водой. С целью активации полимерных поверхностей матрицы обрабатывали 10% этилендиамином (ЭДА), растворенным в 2-пропаноле при 37 °С в течение 1 часа. Затем матрицы тщательно промывали 0,3% раствором Tween-20 в деионизированной воде и высушивали на воздухе.

Далее в соответствии с ранее описанной методикой проводили первичную модификацию поверхности заплат аминокетонами, используя в качестве линкерной группы амин 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин (Sigma-Aldrich, США) [16]. Дальнейшую модификацию поверхности заплат PNBV/PCL осуществляли RGD-содержащими пептидами производства «НаноТех-С» (Россия): RGDK (P1), AhRGD (P2), c[RGDFK] (P3) [16]. Таким образом, было получено 3 разновидности RGD-модифицированных заплат: PNBV/PCL/P1, PNBV/PCL/P2, PNBV/PCL/P3.

Методика определения наличия аргининсодержащего пептида была проведена по методу Сака-

гуччи [17]. В качестве положительного контроля использовали раствор аргинина / аспарагиновой кислоты (1 мг/мл в деионизированной воде). Референсные значения были взяты из работы Sedaghati et al. [18]. Окрашивание образца в оранжево-красный цвет свидетельствовало о наличии гуанидиниевой группы аргинина.

## 4. Оценка структуры поверхности сосудистых заплат до и после имплантации в сонную артерию овец

До имплантации образцы заплат PNBV/PCL, PNBV/PCL/VEGF, PNBV/PCL/RGD и «КемПериплас-Нео» размером 0,5 × 0,5 см подвергали золотопалладиевому напылению с получением покрытия толщиной 15 нм при использовании системы для напыления EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия) и изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

## 5. Физико-механические испытания сосудистых заплат

Вырубку образцов немодифицированных и модифицированных заплат (n = 6 в каждой группе) осуществляли в продольном направлении. Механические свойства сосудистых заплат PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/RGD оценивали в условиях одноосного растяжения образцов на универсальной испытательной машине (Zwick/Roell, Германия) по методике, описанной ранее [14]. Оценку прочности и упругодеформативных свойств проводили с использованием датчика с номинальной силой 50 Н и скорости перемещения траверсы при испытании 10 мм/мин. Прочность материала оценивали по максимальному напряжению при растяжении (МПа). Эластичность и жесткость материала оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (%), и модулю Юнга (МПа). Для измерения толщины образцов использовали толщиномер с пределом допустимой погрешности ±0,01 мм (измерительное усилие не более 1,5 Н). В качестве контроля использовали сонную артерию овцы и внутреннюю грудную артерию человека (*A. mammaria*). Сегменты *A. mammaria* человека забирали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на взятие материала. В качестве групп сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут «КемПериплас-Нео» (ЗАО «НеоКор», Россия) и немодифицированные образцы PNBV/PCL. Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении.

## 6. Оценка гемосовместимых свойств заплат

С целью оценки гемосовместимых свойств разработанных заплат исследовали гемолиз эритроцитов и агрегацию тромбоцитов после контакта свежей цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы с поверхностью заплат. Исследования выполнены в соответствии с методиками, описанными в статье [19].

## 7. Имплантация биодеградируемых сосудистых заплат в сонную артерию овец

Серия экспериментов проведена на овцах эдильбаевской породы массой 42–45 кг, все животные – несуклящие самки. Животные оперированы последовательно. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 15 от 11.09.2018 г.).

Была проведена имплантация в сонную артерию овец биодеградируемых сосудистых заплат PNBV/PCL/VEGF ( $n = 3$ ), PNBV/PCL/P1 ( $n = 3$ ), PNBV/PCL/P2 ( $n = 3$ ) и PNBV/PCL/P1 ( $n = 3$ ). Размер заплат  $40,0 \times 4,0$  мм. Продолжительность наблюдения после имплантации составила 6 месяцев.

Анестезиологическое пособие: премедикация – ксилазин (Ксиланит) 0,05–0,25 мл на 10 кг массы животного + атропин 1 мг в/м; вводный наркоз – 5–7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд после вводится атракурия безилат (Риделат) в/в, доза 0,5–0,6 мг/кг. Интубация трахеи эндотрахеальной трубкой диаметром 9,0. Поддержание наркоза: Севоран 2–4 об%, Риделат вводили путем непрерывной инфузии со скоростью 0,3–0,6 мг/кг/ч.

Мониторинг: АД, ЧСС, SpO<sub>2</sub>. ИВЛ: ЧД – 12–15/мин, РЕЕР 7–9 mbar, ДО 6–8 мл/кг, FiO<sub>2</sub> – 40–60%.

Основной этап: доступ к сонной артерии; системная гепаринизация – 5000 ЕД в/в; пережатие сонной артерии, продольный разрез сонной артерии длиной 40 мм, имплантация сосудистых заплат размером  $40 \times 4$  мм отдельными узловыми швами нитью Prolene 6/0 (Ethicon, США). Стандартный протокол профилактики воздушной эмболии и запуск кровотока; ушивание раны нитью Vicril 2,0 (Ethicon, США); обработка шва клеем БФ, эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл; экстубация.

Интраоперационное медикаментозное введение: инфузия 0,9% NaCl 500 мл – в/в капельно; Аксетин (цефуруксим) 1,5 г – в/в капельно.

Послеоперационное медикаментозное ведение: антибиотикотерапия (Аксетин (цефуруксим) 1,5 г – в/м 2 р/сут + эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл в течение 5 дней. При доказанной проходимости сосудов с имплантированными заплатами: клопидогрел 75 мг перорально 1 р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2 р/сут).

Послеоперационный УЗ-скрининг проходимости сосудов с заплатами выполняли спустя 1 и 5 суток, далее – 1 раз в 3 месяца вплоть до предполагаемого срока вывода животного из эксперимента.

## 8. Гистологическое исследование эксплантированных образцов биодеградируемых сосудистых заплат

Эксплантированные образцы сосудистых заплат с прилегающими участками сонной артерии делили на 2 части. Одну часть замораживали при температуре  $-140$  °С для последующего иммунофлуоресцентного исследования. Вторую часть использовали для осуществления гистологического исследования с использованием окрасок гематоксилином-эозином, по Ван-Гизону и ализариновым красным С, технология которых описана ранее [14].

После каждого вида окрашивания все образцы исследовали с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 50$ ,  $\times 100$  и  $\times 200$ .

## 9. Иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных образцов биодеградируемых сосудистых заплат

Из замороженных участков эксплантированных сосудистых заплат изготовлены серийные криосрезы толщиной 8 мкм с помощью криотома (Thermo Scientific, США). Препараты фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин. Перед окраской на внутриклеточные маркеры проводили пермеабиллизацию срезов обработкой раствором Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее срезы окрашивали первичными антителами в следующих сочетаниях: кроличьи антитела к CD31 (Abcam, Великобритания) и мышьиные антитела к  $\alpha$ -актину гладкомышечных клеток ( $\alpha$ -SMA, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда (vWF, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену IV типа (Abcam, Великобритания) и мышьиные антитела к коллагену I типа (Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену III типа (Novus Biologicals, США). Срезы инкубировали с антителами в течение ночи

при 4 °С, затем со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488-conjugated (Thermo Fisher, США), и антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 555-conjugated (Thermo Fisher Scientific, США), в течение 1 часа при комнатной температуре. На всех этапах окрашивания для промежуточной отмывки срезов использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,1% Tween (Sigma-Aldrich, США). Для удаления автофлуоресценции срезы обрабатывали Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, США) по методике производителя. Ядра контрастировали при помощи окраски DAPI (10 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут. Окрашенные препараты заключали под покровное стекло с использованием монтирующей среды ProLong (Thermo Fisher, США). Препараты анализировали с помощью сканирующего лазерного микроскопа конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

## 10. Статистическая обработка данных

Анализ полученных данных проводили с помощью Prism (Graph Pad Software). Нормальность

распределения оценивали критерием Колмогорова – Смирнова. При сравнении двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни. При сравнении трех и более независимых групп применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, при попарном сравнении групп использовали критерий Данна. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентиля Me (25%; 75%).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изготовления биodeградируемых сосудистых заплат с VEGF использована технология эмульсионного электроспиннинга, с помощью которой можно вводить в состав полимерного волокна биологически активные молекулы, способные в дальнейшем контролироваться и стабильно высвобождаться из матрикса в процессе его резорбции [20–22].

Для оценки картины распределения VEGF, вводимого в жидкой фазе в раствор полимера, выполнен аналоговый эксперимент с бычьим сывороточным альбумином, меченым флуорохромной меткой Texas Red и инкорпорированным в состав матрикса PHBV/PCL. На рис. 1, а, б, видно, что водные домены

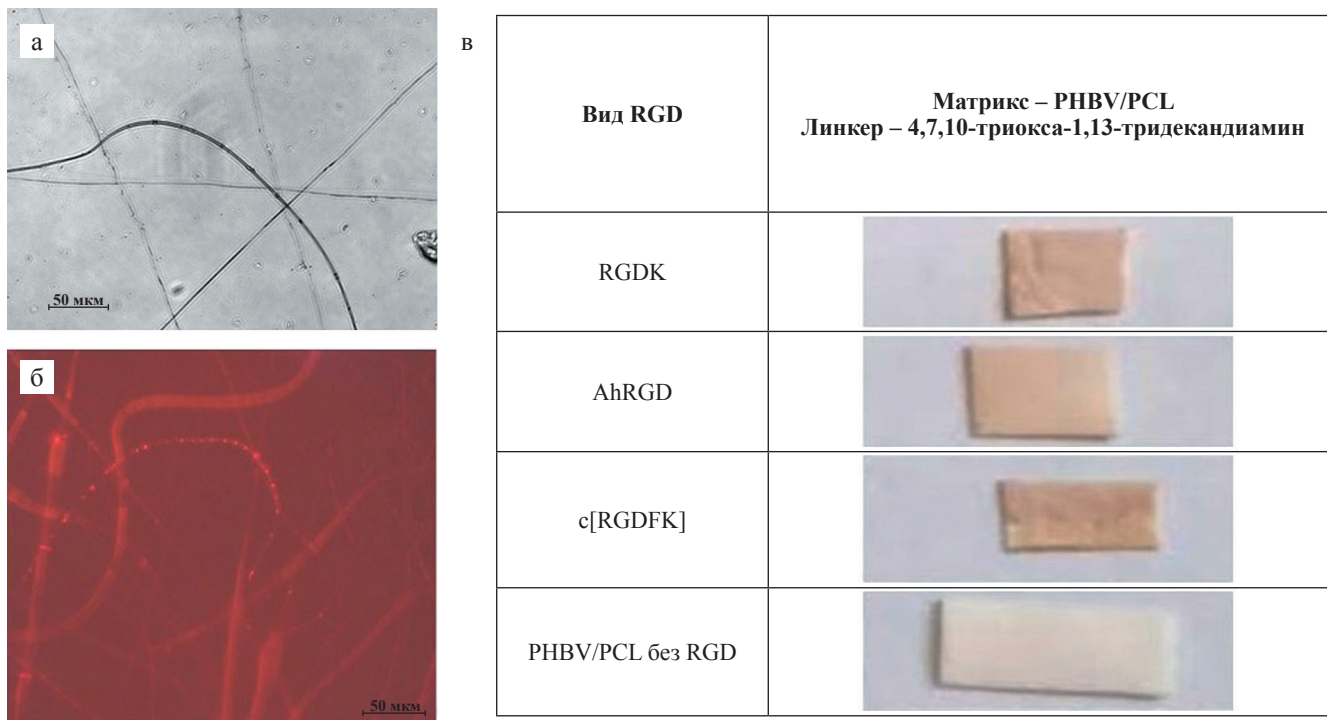


Рис. 1. Результаты тестов, подтверждающие включение/присоединение биологически активных пептидов в структуру / к поверхности матрикса: а, б – инкорпорирование флуоресцентно меченого BSA в состав матрикса PHBV/PCL в процессе эмульсионного электроспиннинга: а – световая микроскопия,  $\times 400$ ; б – флуоресцентная микроскопия,  $\times 400$ ; в – результаты детекции RGD-пептидов на поверхности матриксов PHBV/PCL, полученные с использованием теста Сакагучи

Fig. 1. Test results confirming the incorporation/attachment of bioactive peptides into the structure/ to the matrix surface: а, б – incorporation of fluorescein-labeled BSA into the PHBV/PCL scaffold during emulsion electrospinning: а – light microscopy ( $400\times$ ); б – fluorescence microscopy ( $400\times$ ); в – results of RGD peptide detection on the surface of PHBV/PCL scaffold obtained using Sakaguchi test



с BSA-Texas Red равномерно распределены в толще полимерного волокна по всей его длине. При этом нарушении структуры волокна не выявлено.

Модифицирование RGD-пептидами биodeградируемых заплат PHBV/PCL, изготовленных методом электроспиннинга, было выполнено для биофункционализации внутренней поверхности заплат с целью привлечения и полноценной адгезии зрелых и прогениторных эндотелиальных клеток и формирования эндотелиального монослоя. Трипептид RGD выбран в качестве модифицирующего агента, так как является сайтом клеточной адгезии и присутствует в структуре большинства белков естественного внеклеточного матрикса. Посредством химического синтеза были получены три конфигурации RGD: RGDK (линейная конфигурация молекулы, последовательность Arg-Gly-Asp-Lys), AhRGD (линейная конфигурация молекулы, последовательность Ah-Arg-Gly-Asp и с[RGDFK] (циклическая конфигурация молекулы, последовательность с[Arg-Gly-Asp-Phe-Lys]).

При синтезе линейной молекулы RGDK использовали L-лизин, который содержит две аминогруппы (-NH<sub>2</sub>) и одну карбоксильную группу (-COOH) и используется для поверхностной модификации различных материалов с целью повышения их адгезивных свойств и улучшения биосовместимости [23]. При синтезе линейной молекулы AhRGD к базовому адгезивному трипептиду аргинин-глицин-аспарагиновая кислота был присоединен синтетический аналог L-лизина – аминокaproновая кислота (Ah). Аминокaproновая кислота используется в медицинской практике как антифибринолитический препарат в силу своей способности тормозить процесс фибринолиза. Циклические конфигурации RGD с постоянной геометрией молекулы, по литературным данным, способны демонстрировать максимальное сродство с клеточными рецепторами в сравнении с их линейными аналогами [24]. Поэтому третьей разновидностью RGD, использованного для проведение поверхностной модификации сосудистых заплат, стал циклический RGD-пептид с[RGDFK].

Ранее нами было доказано, что длина линкера значимо влияет на доступность RGD-пептидов для рецепторов клеток, поэтому в настоящей работе при аминокapлизе поверхности матриксов PHBV/PCL был использован протяженный гидрофильный линкер 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine [16]. Введение RGD-пептида выполняли посредством кросс-сшивающего реагента. Наличие пептидов на полимерной поверхности подтверждено с использованием теста Сакагучи на наличие аргинина (рис. 1, в) [17]. После ковалентной пришивки RGD-пептида светло-желтая окраска не исчезала после промывки образцов полимерных заплат PHBV/PCL/RGD. Светло-желтое окрашивание немодифицированных аналогов PHBV/

PCL, не содержащих на своей поверхности RGD, исчезало при промывках.

## Структурные особенности заплат

Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых сосудистых заплат проведена в сравнении с ксеноперикардальной заплатой «КемПериплас-Нео» (ЗАО «Неокор», г. Кемерово), которая активно используется в клинике при эндартерэктомии внутренних сонных артерий. Показана сохранность нативной архитектоники ксеноперикардального лоскута, заключающаяся в рельефности, обусловленной извитостью коллагеновых волокон. Высокая плотность расположения коллагеновых волокон обусловила отсутствие пор.

Сканирующая электронная микроскопия поверхности полимерных заплат до имплантации в сосудистое русло показала, что все биodeградируемые образцы, как немодифицированные, так и содержащие VEGF или RGD, имели высокопористую структуру и состояли из микроразмерных разнонаправленных волокон (рис. 2). Диаметр волокон PHBV/PCL/VEGF составил  $1,47 \pm 0,67$  мкм и был в 1,8 раза меньше данного показателя для PHBV/PCL/RGD и немодифицированных PHBV/PCL ( $2,64 \pm 1,14$  мкм;  $p < 0,05$ ), что связано с использованием эмульсионного электроспиннинга для изготовления заплат с VEGF.

Дополнительное модифицирование RGD не приводило к изменению архитектоники поверхности заплат (рис. 2).

## Механические свойства заплат

Результаты механических испытаний демонстрируют, что прочность заплат PHBV/PCL/VEGF была в 1,7 раза меньше, чем у заплат PHBV/PCL, не содержащих VEGF ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Однако при этом прочность PHBV/PCL/VEGF полностью соответствовала таковой у внутренней грудной артерии человека и в 1,9 раза превышала прочность сонной артерии овцы. Сила, прикладываемая к образцу до начала его разрушения, у заплат PHBV/PCL/VEGF была в 2,1 раза выше, чем у *A. mammaria*, в 1,9 раза выше, чем у сонной артерии овцы, и в 1,5 раза ниже, чем у образцов PHBV/PCL ( $p < 0,05$ ). Отличия показателей между PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL могут быть связаны с тем, что водные домены с ростовым фактором внутри волокна создают дополнительные точки, не способные выдерживать нагрузку. В этих местах чаще всего происходит повреждение полимерной нити, что и влечет за собой снижение прочности и уменьшение силы, необходимой для разрыва.

Также не наблюдали достоверного изменения относительного удлинения в полимерных заплатах после введения ростового фактора по сравнению

с немодифицированными аналогами (табл. 1). Введение VEGF позволило снизить жесткость полимерного матрикса в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

При предварительном изучении физико-механических свойств биодеградируемых заплат, поверхность которых была модифицирована различными

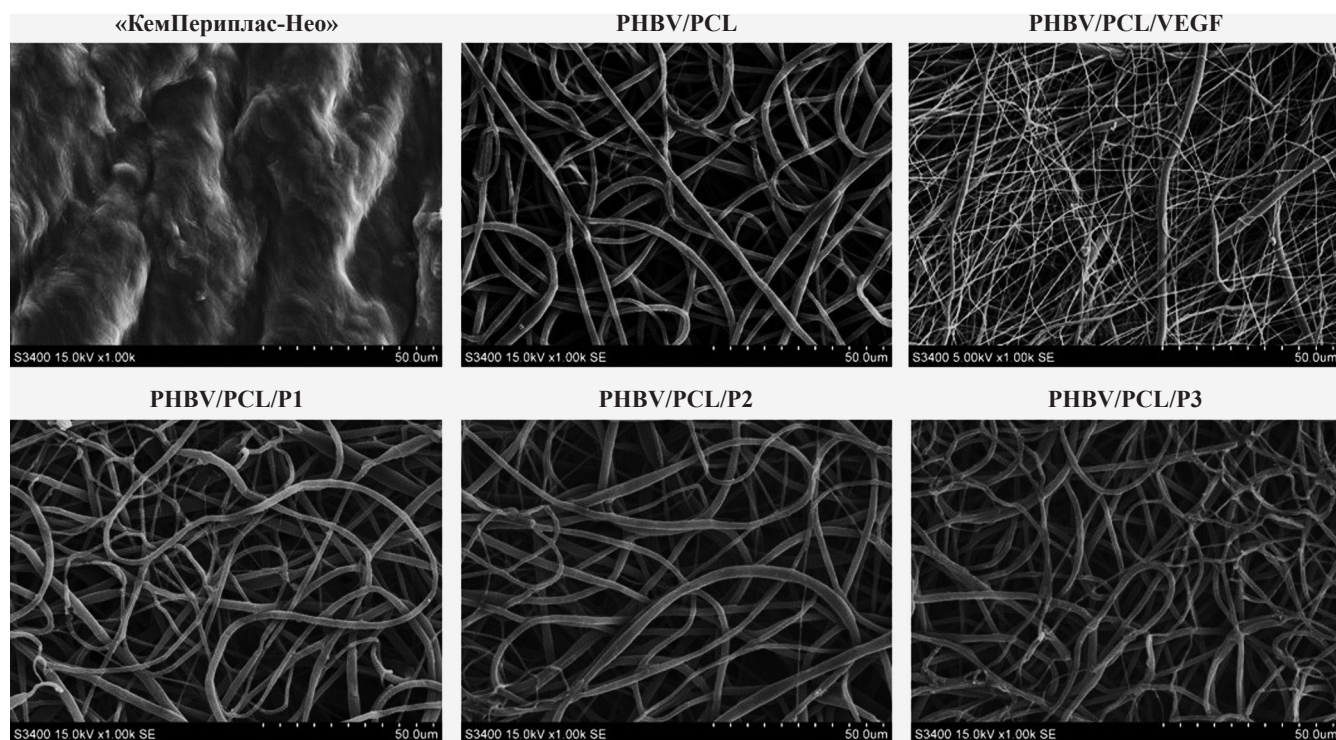


Рис. 2. Морфология внутренней поверхности сосудистых заплат из PHBV/PCL, PHBV/PCL/VEGF, PHBV/PCL/RGD и ксеноперикардальной заплаты «КемПериплас-Нео». Сканирующая электронная микроскопия,  $\times 1000$

Fig. 2. Morphology of the inner surface of vascular patches PHBV/PCL, PHBV/PCL/VEGF, PHBV/PCL/RGD and xeno-pericardial patch KemPeriplas-Neo. Scanning electron microscopy,  $1000\times$

Таблица 1

**Физико-механические свойства полимерных заплат PHBV/PCL до и после инкорпорирования VEGF и модифицирования RGD в сравнении с лоскутом «КемПериплас-Нео» и *A. mammaria*. Данные представлены как Me (25–75%)**

**Physicomechanical properties of PHBV/PCL polymer patches before and after VEGF incorporation or RGD modification in comparison with the KemPeriplas-Neo flap and *A. mammaria*. Data are presented as Me (25–75%)**

	Напряжение, МПа	$F_{max}$ , Н	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа	Толщина образца, мм
PHBV/PCL	3,9 (2,88–4,5)*/**#	3,0 (2,59–3,3)*/**#	102,7 (79,37–106,3)*/**#	21,8 (19,2–25,2)*/**#	0,4 (0,35–0,5)*
PHBV/PCL/VEGF	2,25 (2,14–2,6)**#	1,97 (1,82–2,3)**#	81,83 (77,0–103,4)*/**	16,9 (15,5–17,5)*/**#	0,43 (0,4–0,5)*
PHBV/PCL/RGD	1,2 (1,12–1,3)*#	1,3 (1,2–1,4)#	102,6 (80,38–144,1)*/**#	21,8 (20,15–23,9)*/**#	0,5 (0,49–0,5)*
Сонная артерия овцы	1,2 (1,06–1,9)*	1,01 (0,88–1,42)	158,5 (126,0–169,5)*	0,49 (0,39–0,66)*	0,25 (0,23–0,3)
<i>A. mammaria</i> человека	2,48 (1,36–3,25)**	0,92 (0,59–1,72)	29,72 (23,51–39,62)**	2,42 (1,87–3,19)**	0,27 (0,24–0,3)#
«КемПериплас-Нео»	10,06 (9,12–21,38)*/**#	15,4 (12,6–26,2)*/**#	64,96 (61,08–72,6)*/**#	1,11 (1,02–1,34)#	0,69 (0,63–0,7)*

Примечание. \* –  $p < 0,05$  относительно *A. mammaria*; \*\* –  $p < 0,05$  относительно сонной артерии овцы; # –  $p < 0,05$  относительно PHBV/PCL; # –  $p < 0,05$  относительно «КемПериплас-Нео».

Note. \* –  $p < 0.05$  versus *A. mammaria*; \*\* –  $p < 0.05$  versus sheep carotid artery; # –  $p < 0.05$  versus PHBV/PCL; # –  $p < 0.05$  versus KemPeriplas-Neo.



ми RGD-содержащими пептидами, достоверных межгрупповых различий не выявлено. Поэтому для дальнейшего сравнения физико-механических параметров модифицированных заплат с немодифицированными аналогами, ксеноперикардальным лоскутом и нативными сосудами человека и овцы все образцы заплат, модифицированные RGD-пептидами, были объединены в одну группу – PNBVCV/PCL/RGD.

Выявлено, что прочность PNBVCV/PCL/RGD была идентична прочности сонной артерии овцы, но оказалась в 2 раза ниже, чем у *A. mammaria* ( $p < 0,05$ ). Сила, приложенная к образцу до начала его разрушения, у заплат PNBVCV/PCL/RGD не отличалась от аналогичного показателя нативных сосудов, но была в 1,5 раза ниже, чем у заплат PNBVCV/PCL/VEGF, и в 2,3 раза ниже, чем у немодифицированных PNBVCV/PCL ( $p < 0,05$ ). Относительное удлинение всех биодеградируемых заплат не отличалось между собой, но было в среднем в 3,2 раза выше, чем у *A. mammaria*, в 1,5 раза выше, чем у ксеноперикардальных заплат, и в 1,7 раза ниже, чем у сонной артерии овцы ( $p < 0,05$ ). Модуль Юнга у немодифицированных заплат и за-

плат PNBVCV/PCL/RGD превысил аналогичный показатель сонной артерии овцы в 44 раза, *A. mammaria* – в 9 раз, ксеноперикардального лоскута – в 19,6 раза, образцов PNBVCV/PCL/VEGF – в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ).

Все биодеградируемые сосудистые заплатки вне зависимости от способа проведенной модификации были достоверно менее прочными и более жесткими, чем ксеноперикардальный лоскут, на что указали такие показатели, как напряжение, сила и модуль Юнга (табл. 1). Однако «КемПериплас-Нео» по своим физико-механическим характеристикам значительно отличался и от *A. mammaria*, и от сонной артерии овцы. Так, напряжение и сила, приложенная к образцу до начала его разрушения, у ксеноперикарда оказалась в 4 и 16,7 раза выше, чем у *A. mammaria*, и в 8,4 и 15,2 раза выше, чем у сонной артерии овцы ( $p < 0,05$ ). При этом модуль Юнга у «КемПериплас-Нео» оказался в 2,6 раза ниже, чем у внутренней грудной артерии, и в 2,3 раза ниже, чем у сонной артерии овцы, хотя толщина ксеноперикардального лоскута в 2,6 раза превышала толщину стенок нативных сосудов ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, заплатки PNBVCV/PCL/VEGF обладали физико-механическими характеристиками, более приближенными к аналогичным показателям нативных сосудов, а методика их биофункционализации приводила к наименьшему падению прочностных показателей относительно немодифицированных аналогов PNBVCV/PCL. Модифицирование RGD снижало прочность полимерных заплат, не оказывая влияния на их упруго-деформативные свойства.

Таблица 2

**Степень гемолиза эритроцитов и максимум агрегации тромбоцитов крови человека после контакта с полимерными заплатами PNBVCV/PCL до и после модифицирования VEGF или RGD в сравнении с ксеноперикардальным лоскутом «КемПериплас-Нео»**

**Degree of hemolysis and maximum aggregation of human blood platelets after contact with PNBVCV/PCL polymer patches before and after VEGF incorporation or RGD modification in comparison with xeno-pericardial flap KemPeriplas-Neo**

Вид образца	Степень гемолиза эритроцитов, %	Максимум агрегации тромбоцитов, %
	Me (25–75%)	Me (25–75%)
PNBVCV/PCL	0,5 (0–1,01)*	87,23 (83,95–89,84)*■
PNBVCV/PCL/VEGF	0,5 (0–1,01)*	81,35 (81,01–88,51)*
PNBVCV/PCL/RGD	0,72 (0–0,72)*	86,15 (82,24–87,43)*■
«КемПериплас-Нео»	<b>2,12 (0,9–3,95)</b>	<b>93,32 (84,24–96,42)■</b>
Интактная обогащенная тромбоцитами плазма	–	<b>74,65 (72,45–75,31)</b>

Примечание. \* –  $p < 0,05$  относительно значений для лоскута «КемПериплас-Нео»; ■ –  $p < 0,05$  относительно интактной обогащенной тромбоцитами плазмы.

Note. \* –  $p < 0,05$  versus values for the KemPeriplas-Neo flap; ■ –  $p < 0,05$  versus intact platelet-rich plasma.

**Результаты гемолиза эритроцитов**

Степень гемолиза эритроцитов после контакта с модифицированными VEGF, RGD, а также немодифицированными заплатами PNBVCV/PCL составила соответственно 0,5; 0,72 и 0,5%, без статистически достоверных различий (табл. 2), что подтверждает их высокую гемосовместимость [25].

Уровень гемолиза эритроцитов после их контакта с поверхностью лоскутов «КемПериплас-Нео» в 3 раза превысил таковые после контакта эритроцитов с поверхностью биодеградируемых заплат, однако не вышел за пределы допустимых значений [25].

**Результаты агрегации тромбоцитов**

Результаты проведенного исследования показали, что агрегационная активность тромбоцитов при контакте с поверхностью заплат PNBVCV/PCL и PNBVCV/PCL/RGD превышала данный показатель интактной ОТП в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Максимум агрегации тромбоцитов после контакта с образцами PNBVCV/PCL/VEGF был самым низким среди всех биодеградируемых образцов.

При контакте тромбоцитов с поверхностью лоскута «КемПериплас-Нео» выявлено самое значительное повышение максимума агрегации до 93,32% (84,24; 96,42), что в 1,3 раза превысило максимум агрегации тромбоцитов интактной ОТП ( $p < 0,05$ ). Достоверной разницы между ксеноперикардальным лоскутом и заплатами PNBV/PCL до и после модифицирования VEGF или RGD не выявлено (табл. 2).

Таким образом, полимерные заплаты PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/RGD вызывали меньшую степень гемолиза эритроцитов и агрегации тромбоцитов, чем лоскут «КемПериплас-Нео».

### Результаты имплантации биodeградируемых сосудистых заплат в сонную артерию овец

Ранее на модели крысы нами была изучена биосовместимость и эффективность заплат с VEGF и различными конфигурациями RGD в сравнительном аспекте с немодифицированными заплатами PNBV/PCL и ксеноперикардальными лоскутами «КемПериплас-Нео» [14, 16]. Биodeградируемые заплаты демонстрировали удобство в имплантации. На протяжении всего эксперимента не отмечали кровотечений и нарушений целостности имплантатов. Было доказано, что спустя 12 месяцев имплантации сосуды, протезированные PNBV/PCL/VEGF, характеризовались 100% проходимостью и отсутствием гиперплазии неоинтимы. Зрелый эндотелиальный монослой на внутренней поверхности заплат PNBV/PCL/VEGF полностью формировался через 3 месяца, в то время как на немодифицированных аналогах PNBV/PCL – только через 12 месяцев. Ремоделирование заплат сопровождалось их заселением клетками с формированием внеклеточного матрикса.

При долгосрочной имплантации в аорту крыс заплат PNBV/PCL/RGD доказано, что на их основе способны формироваться элементы новообразованной сосудистой ткани: происходит как миграция клеточных элементов в толщу заплат, так и образование неоинтимальной выстилки с эндотелиальным слоем со стороны просвета сосуда, в особенности при модифицировании заплат пептидами P3 и P1 [16].

Полимерные заплаты PNBV/PCL, модифицированные VEGF или RGD, подвергались незначительному кальцинозу спустя 12 месяцев имплантации в аорту крыс. При этом заплаты PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/P1 демонстрировали максимальную устойчивость к процессам кальцификации.

Ксеноперикардальные лоскуты «КемПериплас-Нео» были не способны поддерживать на своей основе развитие новообразованной сосудистой ткани и эндотелиального слоя, а также склонны к кальцификации уже после одного месяца имплантации в аорту крысы. Спустя 12 месяцев имплантации лоскутов

«КемПериплас-Нео» выявлено массивное отложение кристаллического кальция в 100% имплантированных лоскутов и расслоение их стенки, приведшее к деформации формы. Также спустя 12 месяцев имплантации в 50% ксеноперикардальных лоскутов обнаружена гиперплазия неоинтимы, толщина которой почти в 3 раза превосходила толщину стенки аорты крысы [14, 16].

Проведенные испытания на модели крысы подтвердили низкую эффективность и биосовместимость ксеноперикардальных лоскутов и недостаточную способность немодифицированных PNBV/PCL формировать на своей основе новообразованную сосудистую ткань. Поэтому в протокол преклинических испытаний на овцах были включены только заплаты PNBV/PCL/VEGF, PNBV/PCL/P1, PNBV/PCL/P2, PNBV/PCL/P3.

Для имплантации разработанных сосудистых заплат использовали овечью модель, которая является оптимальной для тестирования сердечно-сосудистых имплантатов *in vivo*, так как пригодна для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к кальцификации, а крови – к гиперкоагуляции. Поэтому использование овечьей модели позволяет провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов, в том числе на предмет их дегенерации *in vivo* [26–30]. Помимо этого, овцы считаются оптимальной животной моделью для оценки роста, проходимости, эндотелизации, тромборезистентности и постимплантационной визуализации изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Известно, что высокая пористость тканеинженерного матрикса и наноразмерные волокна в его структуре способны обеспечить клеточную миграцию внутрь матрикса и раннюю эндотелизацию его поверхности за счет схожести структуры поверхности со структурой естественного внеклеточного матрикса и большей площади взаимодействия клеток и искусственного матрикса [31–33]. В свою очередь, эффективная инфильтрация клеток в толщу пористого материала способствует его лучшей интеграции с нативными тканями в месте имплантации.

Две овцы (с имплантированными заплатами PNBV/PCL/P1 и PNBV/PCL/P2) не дожили до предполагаемого срока вывода из эксперимента, погибнув спустя 14 дней из-за образования массивных паравазальных гематом вокруг оперированных сосудов. Скорее всего, это было связано с микроповреждениями стенки заплат, возникшими в ответ на пульсовую волну после имплантации, так как сразу после имплантации кровотечения из зон наложенных швов не наблюдали и гемостаз был достигнут в течение 2 минут.

Все овцы с имплантированными заплатами PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/P3 дожили до предполагае-

мого срока вывода из эксперимента. На протяжении шести месяцев наблюдения сосуды с имплантированными заплатами сохраняли свою проходимость. Аневризматического расширения сосудов в зоне имплантированных заплат не обнаружено. Однако во всех сосудах с заплатами, содержащими RGD, выявлено повышение скорости кровотока, что может быть косвенным отображением сужения просвета сосуда.

По результатам морфологического исследования (гистологическое исследование и сканирующая электронная микроскопия) заплат с сосудистым эндотелиальным фактором роста видно, что спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец на основе данных заплат сформировалась полноценная трехслойная новообразованная сосудистая ткань (рис. 3).

Тонкая неоинтима, покрытая слоем эндотелиоподобных клеток со стороны просвета сосуда, выстилала всю внутреннюю поверхность заплат. Основную толщину неоинтимы составили гладкомышечные клетки. Далее следовала собственно заплата. Отмечены процессы видимой биодegradации полимерного матрикса, сопровождавшиеся нарушением его целостности, видимой только при микроскопии образцов. Заплата PNBV/PCL/VEGF была заполнена клеточными элементами (макрофагами, фибробластоподобными и гладкомышечными клетками, немногочисленными гигантскими клетками инородного тела), пронизана пучками коллагеновых волокон. В толще заплат встречались *vasa vasorum*. Внешний слой заплат содержал все структурные элементы, свойственные естественному адвентициальному слою: волокна коллагена, фибробласты и фиброциты, единичные гигантские клетки инородного тела, лимфоидные фолликулы и *vasa vasorum*. Признаки кальцификации отсутствовали.

При изучении гистологической картины эксплантированных образцов заплат PNBV/PCL/RGD получена однотипная картина – во всех образцах присутствовала гиперплазия неоинтимы. Толщина неоинтимы при этом соответствовала толщине стенки самой заплаты. Поверхность неоинтимы, обращенная в просвет сосуда, была покрыта монослоем клеток. Стенки заплат были частично резорбированы и содержали умеренное количество гигантских многоядерных клеток инородного тела. Также в стенках заплат присутствовали макрофаги, гладкомышечные и фибробластоподобные клетки, пучки коллагеновых волокон, формировались *vasa vasorum*.

Гистологическое исследование с окраской ализариновым красным С показало, что отложение кальция в эксплантированных заплатах PNBV/PCL/RGD отсутствовало.

Большая протяженность имплантированных заплат позволила при проведении иммунофлуоресцентного исследования выполнить срезы таким образом,

чтобы напротив заплат находилась стенка сонной артерии, в которую имплантировали заплату (рис. 4). Данное расположение привело к лучшей визуализации сходства новообразованной сосудистой ткани, сформированной на основе заплат за 6 месяцев их имплантации, с нативной сонной артерией овцы. Доказано, что неоинтима, сформировавшаяся на внутренней поверхности заплат PNBV/PCL/VEGF, состояла из гладкомышечных клеток, о чем свидетельствовало присутствие в клетках  $\alpha$ -актина. Со стороны просвета сосуда неоинтима на всем своем протяжении была выстлана зрелыми эндотелиальными клетками CD31+, секретирующими фактор фон Виллебранда vWF+. Коллаген IV типа формировал базальную мембрану, на которой располагались эндотелиальные клетки, и в большом количестве определялся как в толще стенки заплаты, так и в стенке сонной артерии овцы. Коллаген III типа формировался во всей толще заплат с преимущественной концентрацией у базальной мембраны и в неоинтимае.

Таким образом, на основе биодegradуемой заплаты VEGF спустя 6 месяцев ее имплантации в сонную артерию овцы формировалась полноценная новообразованная сосудистая ткань. Исключение составил эластин, который не определялся ни после имплантации заплат в аорту крыс, ни после имплантации заплат в сонную артерию овец. Тем не менее инкорпорированный VEGF способствовал гармонизации процессов формирования ткани *in situ* без признаков развития хронического гранулематозного воспаления, гиперплазии неоинтимы и кальцификации.

При проведении иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплат PNBV/PCL/RGD выявлены те же структурные элементы новообразованной сосудистой ткани, что и в заплатах PNBV/PCL/VEGF: эндотелиальный монослой, состоявший из зрелых эндотелиальных клеток CD31+vWF+; коллаген I, III и IV типа. Однако обращает на себя внимание большее количество гладкомышечных клеток в неоинтимае и высокая общая клеточность стенки заплат, обусловленная наличием хронического гранулематозного воспаления, а также меньшее количество коллагена III типа относительно заплат PNBV/PCL/VEGF.

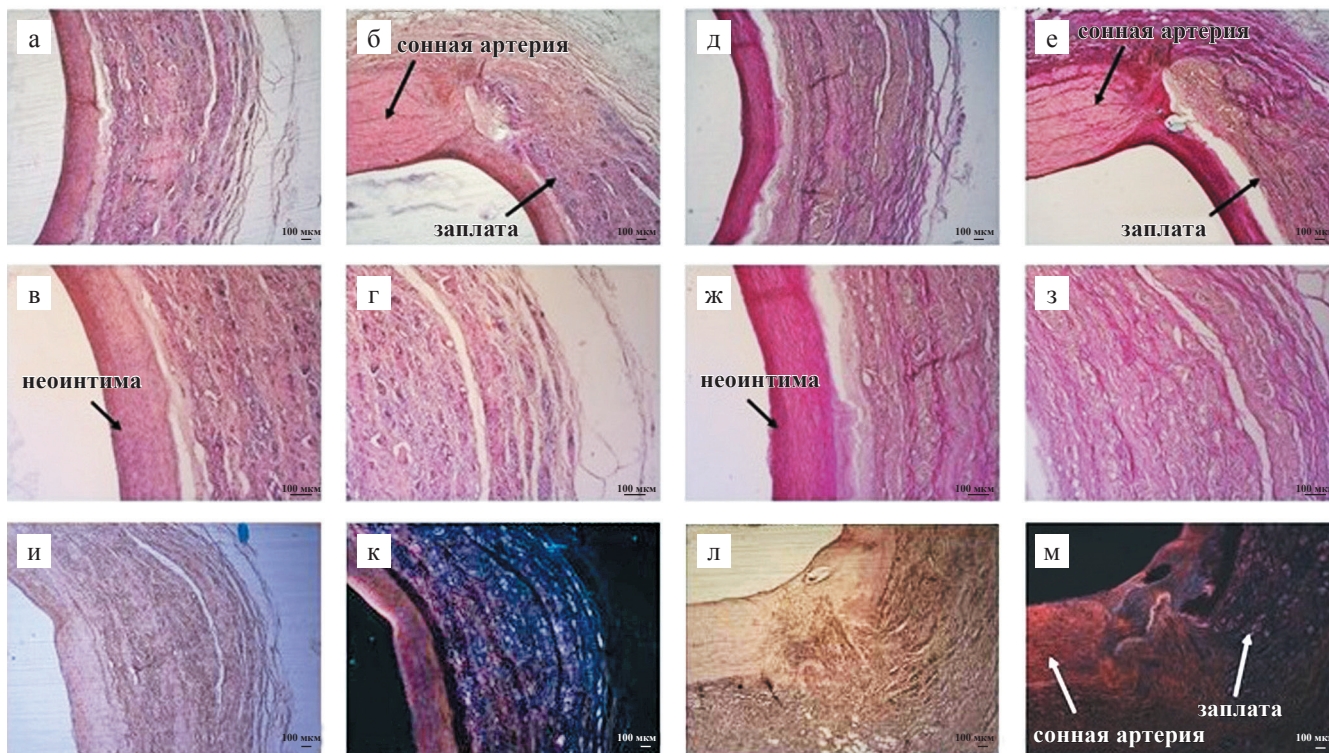
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность использования проангиогенного ростового фактора VEGF и различных конфигураций RGD-пептидов, а также различных подходов к модифицированию изделия была оценена в сравнительном аспекте *in vitro* и в преclinical испытаниях на модели овцы.

Выявленное преимущество биодegradуемых заплат PNBV/PCL/VEGF заключалось в том, что инкорпорирование VEGF в состав заплаты в процессе ее



## PHBV/PCL/VEGF



## PHBV/PCL/RGD

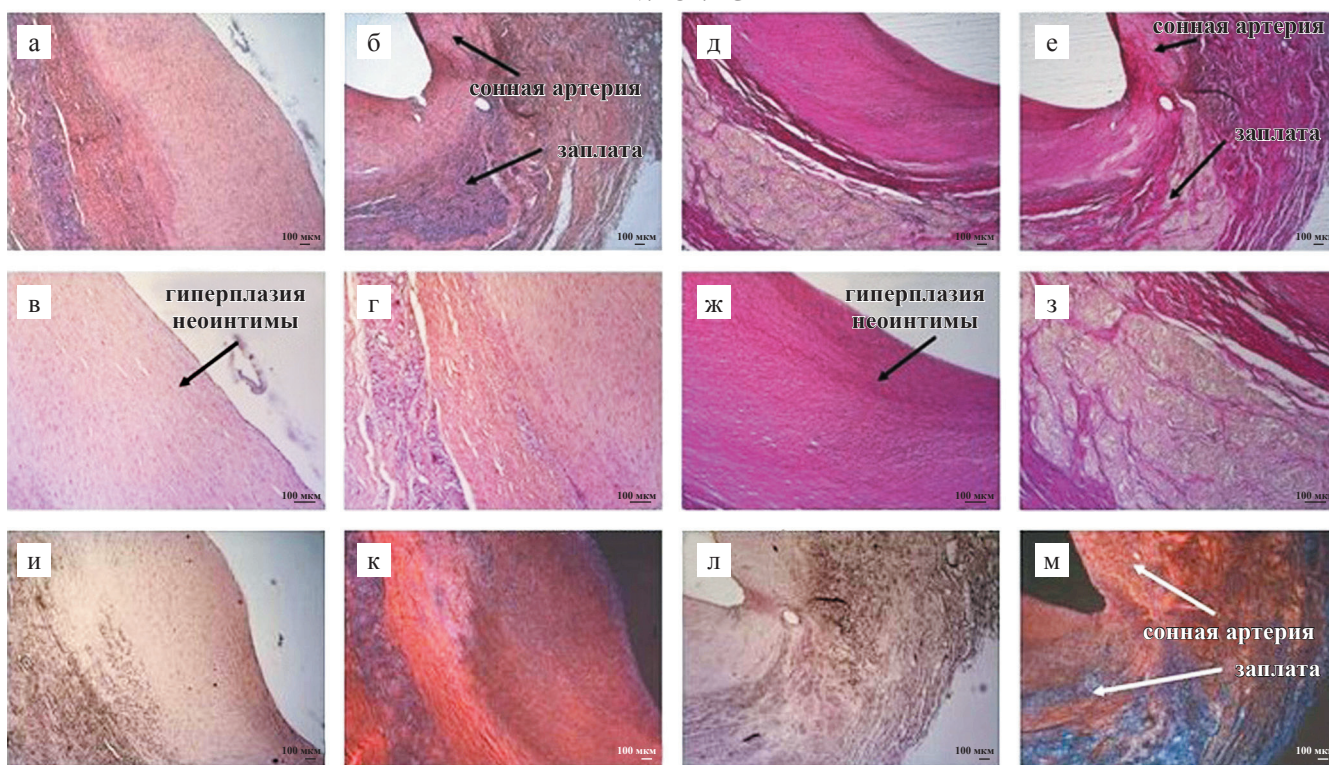


Рис. 3. Результаты гистологического исследования сосудистых заплат PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: а-г – окраска гематоксилином-эозином; д-з – окраска по Ван-Гизону; и-м – окраска ализариновым красным С (и, л – световая микроскопия; к, м – флуоресцентная микроскопия); а, д, и, к – центральная часть заплата; б, е, л, м – стык заплата и сонной артерии в зоне анастомоза; в, ж – внутренний и средний слой стенки заплата; г, з – средний и наружный слой стенки заплата; а, б, д, е, и-м –  $\times 50$ , в, г, ж, з –  $\times 100$

Fig. 3. Results of histological examination of vascular patches PHBV/PCL/VEGF and PHBV/PCL/RGD after 6 months of implantation in the carotid artery of sheep: а-г – hematoxylin-eosin staining; д-з – staining according to Van Gieson; и-м – staining with alizarin red C (и, л – light microscopy; к, м – fluorescence microscopy); а, д, и, к – the central part of the patch; б, е, л, м – junction of the patch and the carotid artery in the anastomosis zone; в, ж – inner and middle layer of the patch wall; г, з – middle and outer layer of the patch wall; а, б, д, е, и-м –  $\times 50$ , в, г, ж, з –  $\times 100$



изготовления методом эмульсионного электроспиннинга и отсутствие последующих манипуляций по модифицированию поверхности с использованием агрессивных поверхностно-активных веществ привело к сохранению физико-механических характеристик заплат, не снижая прочности и не увеличивая жесткости конечного изделия, что наблюдали после модифицирования RGD-пептидами поверхности биodeградируемых заплат. Гемосовместимость заплат PHBV/PCL/VEGF оказалась самой высокой даже в сравнении с ксеноперикардальным лоскутом, который активно используется в клинике.

На овечьей модели заплаты с RGD вне зависимости от конфигурации пептида способствовали эндотелизации, однако провоцировали гиперплазию неоинтимы и гранулематозное воспаление, тогда как заплаты PHBV/PCL/VEGF на модели овцы продемонстрировали оптимальную способность формировать на своей основе здоровую новообразованную сосудистую ткань с формированием тонкой неоинти-

мы, выстланной эндотелием, среднего гладкомышечного слоя и адвентиции, содержащей все основные структурные элементы, свойственные данному слою: пучки коллагеновых волокон, фибробластоподобные клетки и *vasa vasorum*. Все это свидетельствует о высокой эффективности инкорпорированного в состав заплат сосудистого эндотелиального фактора роста.

*Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflict of interest.*

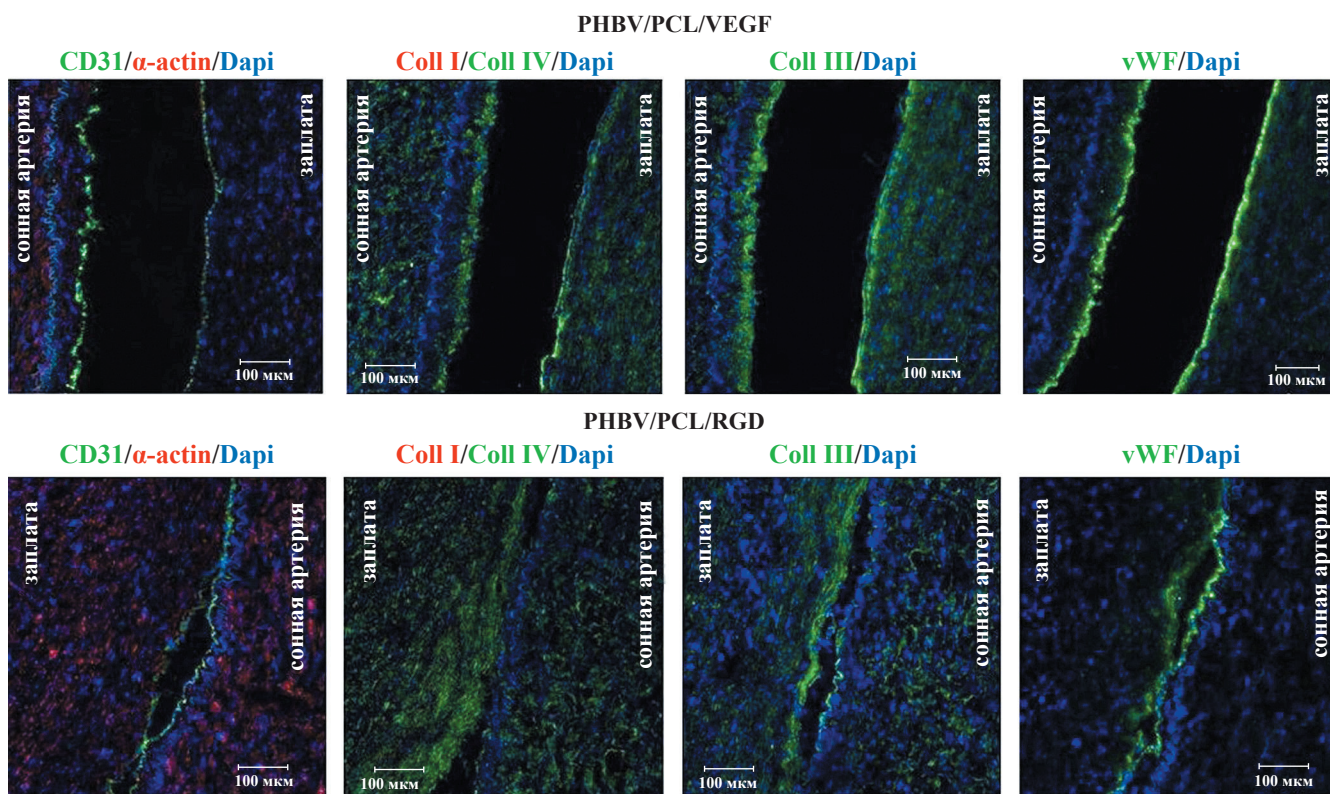


Рис. 4. Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплат PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD с прилегающими участками сонной артерии овцы: панель CD31/α-actin/Dapi: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие α-actin (красное свечение); панель Coll I/Coll IV/Dapi: коллаген I типа (красное свечение), коллаген IV типа (зеленое свечение); панель Coll III/Dapi: коллаген III типа (зеленое свечение); панель vWF/Dapi: фактор фон Виллебранда (зеленое свечение). Ядра всех клеток окрашены ядерным красителем Dapi (синее свечение). ×100

Fig. 4. Results of immunofluorescence study of explanted PHBV/PCL/VEGF and PHBV/PCL/RGD patches with surrounding sections of the sheep carotid artery: CD31/alpha actin/Dapi panel: mature endothelial cells (green glow), smooth muscle and other cells containing alpha actin (red glow); panel Coll I/Coll IV/Dapi: collagen type I (red glow), collagen type IV (green glow); Coll III/Dapi panel: collagen type III (green glow); vWF/Dapi panel: von Willebrand factor (green glow). The nuclei of all cells were stained with Dapi nuclear dye (blue glow)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bonati LH, Dobson J, Featherstone RL, Ederle J, van der Worp HB, de Borst GJ, Mali et al. Long-term outcomes after stenting versus endarterectomy for treatment of symptomatic carotid stenosis: the international carotid stenting study (ICSS) randomised trial. *Lancet*. 2015; 385: 529–38. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61184-3. PMID: 25453443.
2. Abbott AL, Paraskevas KI, Kakkos SK, Golledge J, Eckstein HH, Diaz-Sandoval LJ et al. Systematic review of guidelines for the management of asymptomatic and symptomatic carotid stenosis. *Stroke*. 2015; 46: 3288–3301. doi: 10.1161/strokeaha.115.003390. PMID: 26451020.
3. Гавриленко АВ, Куклин АВ, Фомина ВВ. Классическая и эверсионная каротидная эндартерэктомия у пациентов со стенозом внутренней сонной артерии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (2): 87–92. Gavrilenko AV, Kuklin AV, Fomina VV. Conventional and eversion carotid endarterectomy for internal carotid artery stenosis. *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova*. 2018; (2): 87–92. [In Russ]. doi: 10.17116/hirurgia2018287-92.
4. Zannetti S, Cao P, De Rango P, Giordano G, Parlani G, Lenti M et al. Intraoperative assessment of technical perfection in carotid endarterectomy: a prospective analysis of 1305 completion procedures. Collaborators of the EVEREST study group. Eversion versus standard carotid endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999; 18 (1): 52–8. doi: 10.1053/ejvs.1999.0856. PMID: 10388640.
5. Ren S, Li X, Wen J, Zhang W, Liu P. Systematic review of randomized controlled trials of different types of patch materials during carotid endarterectomy. *PLoS one*. 2013; 8 (1): e55050. PMID: 23383053. doi: 10.1371/journal.pone.0055050.
6. Texakalidis P, Giannopoulos S, Charisis N, Giannopoulos S, Karasavvidis T, Koullias G et al. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. 2018; 68 (4): 1241–1256. doi: 10.1016/j.jvs.2018.07.023. PMID: 30244928.
7. Карпенко АА, Кужугет РА, Стародубцев ВВ, Игнатенко ПВ, Ким ИН, Горбатов ВН. Непосредственные и отдаленные результаты различных методов реконструкции каротидной бифуркации. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2013; 17 (1): 21–24. Karpenko AA, Kuzhuget RA, Starodubtsev VB, Ignatenko PV, Kim IN, Gorbatykh VN. Immediate and long-term outcomes of carotid bifurcation remodeling. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2013; 17 (1): 21–24. [In Russ]. doi: 10.21688/1681-3472-2013-1-21-24.
8. Antonova LV, Sevostyanova VV, Mironov AV, Krivkina EO, Velikanova EA, Matveeva VG et al. *In situ* vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 25–36. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36.
9. Smith RJ, Yi T, Nasiri B, Breuer CK, Andreadis ST. Implantation of VEGF-functionalized cell-free vascular grafts: regenerative and immunological response. *The FASEB Journal*. 2019; 33 (4): 5089–5100. doi: 10.1096/fj.201801856R.
10. Krilleke D, Ng YS, Shima DT. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: A structure-function study. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37 (6): 1201–1206. doi: 10.1530/JOE-15-0342. PMID: 19909247.
11. Miyazu K, Kawahara D, Ohtake H, Watanabe G, Matsuda T. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at *in situ* capture of endothelial progenitor cell. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010; 94 (1): 53–63. doi: 10.1002/jbm.b.31623.
12. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14 (7): 13447–1362. doi: 10.3390/ijms140713447. PMID: 23807504.
13. Hsu SH, Chu WP, Lin YS, Chiang YL, Chen DC, Tsai CL. The effect of an RGD-containing fusion protein CBD-RGD in promoting cellular adhesion. *Journal of Biotechnology*. 2004; 111 (2): 143–150. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.03.014. PMID: 15219401.
14. Севостьянова ВВ, Миронов АВ, Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Матвеева ВГ, Великанова ЕА и др. Тканеинженерная заплатка, модифицированная фактором роста эндотелия сосудов, для реконструкции сосудистой стенки. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2020; 24 (4): 114–128. Sevostianova VV, Mironov AV, Antonova LV, Krivkina EO, Matveeva VG, Velikanova EA et al. Tissue-engineered patch modified by vascular endothelial growth factor for reconstruction of vascular wall. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2020; 24 (4): 114–128. [In Russ]. doi: 10.21688/1681-3472-2020-4-114-128.
15. Антонова ЛВ, Сильников ВН, Ханова МЮ, Королева ЛС, Серпокрялова ИЮ, Великанова ЕА и др. Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 142–152. Antonova LV, Silnikov VN, Khanova MYu, Koroleva LS, Serpokrilova IYu, Velikanova EA et al. Adhesion, proliferation and viability of human umbilical vein endothelial cells cultured on the surface of biodegradable non-woven matrices modified with RGD peptides. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (1): 142–152. [In Russ]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-142-152.
16. Sevostianova VV, Antonova LV, Mironov AV, Yuzhalin AE, Silnikov VN, Glushkova TV et al. Biodegradable patches for arterial reconstruction modified with RGD peptides: results of an experimental study. *ACS Omega*. 2020; 5 (34): 21700–21711. doi: 10.1021/acsomega.0c02593. PMID: 32905385.



17. Lin HB, Sun W, Mosher DF, Garciaecheverria C, Schaufelberger K, Lelkes PI et al. Synthesis, Surface, and Cell Adhesion Properties of Polyurethanes Containing Covalently Grafted RGD-peptides. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28 (3): 329–342. doi: 10.1002/jbm.820280307. PMID: 8077248.
18. Sedaghati T, Jell G, Seifalian A. Investigation of Schwann cell behaviour on RGD-functionalised bioabsorbable nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *New Biotechnology.* 2014; 31 (3): 203–213. doi: 10.1016/j.nbt.2014.01.002. PMID: 24503165.
19. Антонова ЛВ, Миронов АВ, Сильников ВН, Глушкова ТВ, Кривкина ЕО, Акентьева ТН и др. Биодegradуемые сосудистые заплатки: сравнительная характеристика физико-механических и гемосовместимых свойств. *Якутский медицинский журнал.* 2019; 4 (68): 35–39. Antonova LV, Mironov AV, Silnikov VN, Glushkova TV, Krivkina EO, Akent'eva TN et al. Biodegradable vascular patches: comparative characteristics of physical-mechanical and hemocompatible properties. *Yakut Medical Journal.* 2019; 4 (68): 35–39. doi: 10.25789/YMJ.2019.68.08.
20. Wei K, Li Y, Mugishima H, Teramoto A, Abe K. Fabrication of core-sheath structured fibers for model drug release and tissue engineering by emulsion electrospinning. *Biotechnology Journal.* 2012; 7 (5): 677–685. doi: 10.1002/biot.201000473. PMID: 22125296.
21. Spano F, Quarta A, Martelli C, Ottobrini L, Rossi RM, Giglic G et al. Fibrous scaffolds fabricated by emulsion electrospinning: from hosting capacity to *in vivo* biocompatibility. *Nanoscale.* 2016; 8 (17): 9293–9303. doi: 10.1039/C6NR00782A.
22. Yarin R.L. Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies.* 2011; 22 (3): 310–317. doi: 10.1002/pat.1781.
23. Ward AS, Cormier JM. Operative techniques in arterial surgery Dordrecht: Springer Netherlands. 1986.
24. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24 (24): 4385–4415. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0. PMID: 12922151.
25. Jolee Bartrom BS. ASTM Hemolysis. *NAMSA.* 2008; 1–12.
26. Malm CJ, Risberg B, Bodin A, Bäckdahl H, Johansson BR, Gatenholm P et al. Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model. *Scand Cardiovasc J.* 2012; 46 (1): 57–62. doi: 10.3109/14017431.2011.623788. PMID: 22029845.
27. Ahmed M, Hamilton G, Seifalian AM. The performance of a small-calibre graft for vascular reconstructions in a senescent sheep model. *Biomaterials.* 2014; 35 (33): 9033–9040. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.008. PMID: 25106769.
28. Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD. Tissue engineered vascular grafts – preclinical aspects. *Int J Cardiol.* 2013; 167 (4): 1091–1100. PMID: 23040078. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.069.
29. Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24 (5): 916–925. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.005. PMID: 23769861.
30. Hoerstrup SP, Cummings Mrcs I, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation.* 2006; 114 (1 Suppl): I159–I166. doi: 10.1161/circulationaha.105.001172. PMID: 16820566.
31. Catto V, Fare S, Freddi G, Tanzi MC. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. *ISRN Vasc Med.* 2014; 923030. doi: 10.1155/2014/923030.
32. Matsuzaki Yu, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang Yu-C, Miyamoto S, Kelly J et al. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model. *Acta Biomater.* 2020; 115: 176–184. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.011. PMID: 32822820.
33. Matsuzaki Yu, Miyamoto S, Miyachi H, Iwaki R, Shoji T, Blum K et al. Improvement of a Novel Small-diameter Tissue-engineered Arterial Graft With Heparin Conjugation. *Ann. Thorac. Surg.* 2021; 111 (4): 1234–1241. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.011. PMID: 32822820.

Статья поступила в редакцию 02.06.2022 г.  
The article was submitted to the journal on 02.06.2022