

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-3-80-93

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

Л.В. Антонова, Е.О. Кривкина, М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева,
А.В. Миронов, А.Р. Шабает, Е.А. Сенокосова, Т.В. Глушкова, М.Ю. Синицкий,
Р.А. Мухамадияров, Л.С. Барбараш

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

Поверхностное модифицирование полимерных сосудистых матриц – перспективная разработка для предотвращения тромбирования сосудистых протезов, улучшения долгосрочной проходимости и ускорения ремоделирования. **Цель** – изучить результаты долгосрочной проходимости протезов PHBV/PCL/GFmix с илопростом и гепарином, имплантированных в сонную артерию овец. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга изготовлены матрицы Ø4 мм из композиции полимеров поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) и поли(ε-капролактонона) (PCL) с инкорпорированием в их состав эндотелиального фактора роста (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы (SDF-1α). Затем изготовленные матрицы модифицировали илопростом и гепарином посредством комплексообразования через поливинилпирролидон (PVP). В качестве группы сравнения – синтетические протезы Gore-Tex. Оценены физико-механические свойства исследуемых групп матриц, проведена оценка структуры поверхности сосудистых протезов до и после имплантации. Проведены работы по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы. Эксплантированные образцы изучены методами гистологического и иммунофлуоресцентного анализов, также проведен элементный состав полученных образцов сосудистых протезов и оценка профиля генной экспрессии. **Результаты.** Через сутки после имплантации проходимость сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} составила 62,5%, тогда как у синтетических протезов Gore-Tex тромбоз был в 100% случаев. При этом через 18 месяцев имплантации проходимость биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} снизилась до 50%. Проходимые полимерные графты с лекарственным покрытием полностью резорбировались через 18 месяцев имплантации, а на их месте сформировалась аневризматически расширенная новообразованная сосудистая ткань. **Заключение.** Модифицирование поверхности полимерных протезов PHBV/PCL/GFmix лекарственным покрытием из илопроста и гепарина позволило улучшить результаты долгосрочной проходимости в сравнении с синтетическими протезами Gore-Tex.

Ключевые слова: сосудистые протезы, атромбогенная обработка, электроспиннинг, имплантация, гепарин, илопрост.

RESULTS OF PRECLINICAL TRIALS IN A SHEEP MODEL OF BIODEGRADABLE SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS

L.V. Antonova, E.O. Krivkina, M.Yu. Khanova, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva,
A.V. Mironov, A.R. Shabaev, E.A. Senokosova, T.V. Glushkova, M.Yu. Sinitsky,
R.A. Mukhamadiyarov, L.S. Barbarash

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Surface modification of polymer vascular matrices is a promising development for preventing vascular graft thrombosis, improving long-term patency and accelerating remodeling. **Objective:** to study the outcomes of long-term patency of PHBV/PCL/GFmix grafts with iloprost (Ilo) and heparin (Hep) implanted into the carotid

Для корреспонденции: Кривкина Евгения Олеговна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6.
Тел. (908) 946-66-39. E-mail: leonora92@mail.ru

Corresponding author: Evgeniya Krivkina. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation.
Phone: (908) 946-66-39. E-mail: leonora92@mail.ru

artery of sheep. **Materials and methods.** Matrices Ø4 mm were fabricated by electrospinning from a polymer composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly(ε-caprolactone) (PCL) with incorporation of endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and chemoattractant molecule (SDF-1α). The fabricated matrices were then modified with Ilo and Hep by complexation via polyvinylpyrrolidone (PVP). Synthetic Gore-Tex grafts were used as a comparison group. The physical and mechanical properties of the studied matrix groups were evaluated, the surface structure of vascular grafts before and after implantation was assessed. Vascular grafts were implanted into the carotid artery of a sheep. The explanted samples were studied via histological and immunofluorescence analysis, the elemental composition of the obtained vascular graft samples was also assessed, and the gene expression profile was evaluated. **Results.** One day after implantation, the patency of PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} vascular grafts was 62.5%, whereas synthetic Gore-Tex grafts had thrombosis in 100% of cases. At the same time, after 18 months of implantation, the patency of biodegradable PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} vascular grafts decreased to 50%. Permeable drug-coated polymer grafts were completely reabsorbed after 18 months of implantation, and aneurysmally dilated newly-formed vascular tissue was formed in their place. **Conclusion.** Modification of the surface of PHBV/PCL/GFmix polymer grafts with Hep + Ilo coating improved long-term patency outcomes compared to synthetic Gore-Tex grafts.

Keywords: vascular grafts, anti-thrombogenic coating, electrospinning, implantation, heparin, iloprost.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день отмечается непрерывный рост частоты развития атеросклероза среди населения, в том числе с поражением коронарных артерий и периферических кровеносных сосудов [1–5].

В связи с этим возрастает количество хирургических вмешательств по восстановлению эффективного кровотока в поврежденных кровеносных сосудах посредством их протезирования, наложения шунтов или заплат [6]. Наилучшим вариантом для хирургического лечения вышеназванной патологии является использование аутологичного материала (собственных кровеносных сосудов), который в настоящее время является золотым стандартом. Однако данные трансплантаты имеют ограниченную доступность по причине ранее перенесенных операций с использованием данных сосудов, прогрессирующего атеросклероза и других заболеваний [7]. Кроме того, процесс забора и последующая оценка трансплантата перед имплантацией могут повредить сосуд и привести к эндотелиальной дисфункции, провоспалительной реакции и в конечном итоге к тромбозу и окклюзии трансплантата. Высокие показатели неудач делают этот метод лечения в значительной степени неадекватным, что приводит к разработке неаутологичных альтернатив [8–10]. Изделия из ксеногенных и синтетических материалов, применяемые в клинической практике в настоящее время, хорошо подходят для сосудистых протезов большого диаметра, но подвержены высокому риску тромбообразования, а также гиперплазии неоинтимы в отдаленный послеоперационный период при малых диаметрах протезов [7, 11–13].

В связи с этим наиболее актуальной является проблема отсутствия изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии на основе альтернативных материалов, не вызывающих подобных осложнений.

Одной из перспективных современных областей, занимающихся разработкой сосудистых протезов, является сосудистая тканевая инженерия [14–17], позволяющая использовать нестандартные виды материалов для создания медицинских изделий (биodeградируемые полимеры, природные полимеры, аутологичные биологические жидкости и ткани), а также оригинальные подходы к их изготовлению, обеспечивающие пористость создаваемых конструкций и вследствие этого эффективную миграцию в стенку данных конструкций собственных клеток для формирования *in situ* новой здоровой ткани [18–22].

Однако нетканые биodeградируемые матриксы в силу своей высокой пористости и длительной резорбции с привлечением клеток моноцитарно-макрофагальной системы могут также провоцировать тромбообразование [23–26]. Решением может стать дополнительная модификация поверхности тканеинженерных высокопористых сосудистых протезов лекарственными препаратами с антиагрегантной и антикоагулянтной активностью, что способно предотвратить запуск процессов тромбообразования после имплантации подобных протезов в сосудистое русло. Дополнительное введение в структуру протеза биологически активных веществ, таких как ростовые факторы, хемокины, интерлейкины, аминокислоты и прочие, и их пролонгированное высвобождение может имитировать естественные биохимические сигналы и направлять процесс регенерации с формированием всех структурных слоев сосудистой ткани, в том числе эндотелия [27–29].

Таким образом, высокопористые биodeградируемые конструкции нуждаются в дополнительном модифицировании своей поверхности атромбогенными веществами с целью избежания риска несостоятельности после имплантации такой конструкции в сосудистое русло [30, 31].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление сосудистых протезов

Сосудистые протезы PHBV/PCL Ø4 мм и длиной 40,0 мм были изготовлены методом двухфазного электроспиннинга из композиции полимеров 5% поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксивалерата) (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV; Sigma-Aldrich, США) и 10% поли(ε-капролактонона) (poly-ε-caprolactone; PCL; Sigma-Aldrich, США), на аппарате Nanon-01A (МЕСС, Япония). В качестве растворителя использовали хлороформ ХЧ (Вектон, Россия).

Для инкорпорирования молекул ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул в полимерное волокно раствор PHBV/PCL на хлороформе тщательно смешивали с раствором одного или нескольких дифференцировочных факторов в соотношении 20 : 1, разведенных в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline; PBS; Gibco, США), до получения суспензии. 1/3 внутренней части стенки протеза изготавливали из раствора PHBV/PCL с добавлением эндотелиального фактора роста человека (vascular endothelial growth factor; VEGF; Sigma-Aldrich, США). Внешние 2/3 части стенки протеза изготавливали из раствора PHBV/PCL со смесью рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека (basic fibroblast growth factor; bFGF; Sigma-Aldrich, США) и рекомбинантной хемоаттрактантной молекулы человека – стромальным фактором SDF-1α (stromal cell-derived factor-1α; SDF-1α; Sigma-Aldrich, США).

Формирование атромбогенного покрытия на поверхности биodeградируемых сосудистых протезов

Дополнительное модифицирование поверхности протезов PHBV/PCL/GFmix антиагрегантами и антикоагулянтами с целью повышения тромборезистентности было проведено по собственной оригинальной методике [32].

Для модифицирования внутренней поверхности протеза готовили 10,0% раствор поливинилпирролидона (polyvinylpyrrolidone; PVP; PanReac, Германия) в этиловом спирте. Протез погружали в раствор PVP на 30 минут, при этом полностью заполняя раствором внутренний канал протеза. Далее протез вынимали из раствора и сушили горизонтально в течение 24 часов.

Для проведения прививки PVP к поверхности полимерного протеза изделие помещали в стеклянную пробирку, которую заполняли инертным газом аргоном, и облучали ионизирующим излучением с общей поглощенной дозой 15 кГр.

Перед присоединением лекарственных препаратов проводили трехкратную отмывку остатков непривитого PVP с поверхности сосудистых протезов, помещенных в пробирки со стерильной водой для инъекций. Время каждой отмывки – 30 мин.

В стерильных условиях готовили модифицирующий раствор, состоящий из глицинового буферного раствора (pH = 2,5–2,6) с введенным в его состав антикоагулянтом гепарином (heparin; Нер; Диамед-фарма, Россия) в концентрации 5000 МЕ/мл и антиагрегантом илопростом (iloprost; Ило; Bayer, Германия) в концентрации 0,2 мкг/мл. Для присоединения лекарственных препаратов к оставшимся свободным реакционным группам привитого PVP сосудистые протезы выдерживали в модифицирующем растворе в течение 30 минут. Далее протезы высушивали на воздухе в стерильных условиях в течение 24 часов.

Оценка физико-механических свойств

Оценку механических свойств биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL с лекарственным покрытием до и после формирования дополнительного атромбогенного лекарственного покрытия проводили в условиях одноосного растяжения на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell). Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при растяжении (МПа) до начала разрушения. Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа). В качестве контроля использовали синтетический протез Gore-Tex (ST04010A, USA), нативную внутреннюю грудную артерию человека (a. mammaria) и сонную артерию овцы.

Сканирующая электронная микроскопия

Оценку структуры поверхности биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix до и после формирования атромбогенного лекарственного покрытия, а также синтетических сосудистых протезов Gore-Tex проводили на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ. Перед исследованием образцы протезов размером 0,5 × 0,5 см подвергали золото-палладиевому напылению с получением покрытия толщиной 15 нм при использовании системы для напыления EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия).

Имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец

Все группы сосудистых протезов имплантировали в сонную артерию овец эдильбаевской породы.

Опытная группа протезов PHBV/PCL/GFmix^{Нер/Но} (n = 8) была имплантирована сроком на 18 месяцев.

В качестве группы сравнения выступили синтетические протезы Gore-Tex® (Number ST04010A, USA), (n = 5), имплантированные в сонную артерию овец сроком на 6 месяцев (с учетом их раннего тромбоза спустя 1 сутки после имплантации).

Анестезиологическое пособие

Премедикация: ксилазин (ксиланит) 0,05–0,25 мл на 10 кг массы животного + атропин 1 мг внутримышечно. Вводный наркоз: 5–7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд после вводили 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.%, непрерывная инфузия риделата со скоростью 0,3–0,6 мг/кг/ч.

Основной этап имплантации сосудистых протезов

Доступ к сонной артерии; системная гепаринизация – 5000 ЕД в/в; пережатие сонной артерии, резекция выделенного сегмента под углом 45°, имплантация сосудистых протезов конец в конец непрерывным обвивным швом проксимально, а затем дистально – 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 биодеградируемых протезов: клопидогрел 75 мг перорально 1 р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2 р/сут – в течение 1 месяца.

Послеоперационный УЗ-скрининг проходимости имплантированных сосудистых протезов: 1-е и 5-е сутки, далее – 1 раз в 3 месяца вплоть до предполагаемого срока вывода животного из эксперимента – для проходимых протезов; 1-е и 5-е сутки – для тромбированных протезов.

Гистологическое исследование

Проведено гистологическое исследование эксплантированных образцов протезов с окрашиванием гематоксилином и пикрофуксином по Ван-Гизону,

гематоксилин-эозином, орсеином, ализариновым красным С.

Эксплантированные образцы фиксировали в формалине в течение 24 часов, затем промывали проточной водопроводной водой для удаления фиксирующего раствора и обезжизивали в IsoPrep (BioVitrum, Россия). Пропитывали образцы парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 минут в каждой порции. Пропитанные образцы заливали парафином ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США). Затем образцы помещали в термостат и сушили в течение ночи при 37 °С. После полного высыхания образцы депарафинировали в о-ксилоле (3 порции) в течение 1–2 мин и дегидратировали в 96% спирте (3 порции) в течение 1–2 мин. Далее депарафинированные срезы окрашивали в соответствии с протоколом окрашивания. Образцы исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива $\times 50$, $\times 100$ и $\times 200$.

Конфокальная микроскопия с применением иммунофлуоресцентного окрашивания

Из замороженных эксплантированных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с использованием криотомы (Microm HM 525, Thermo Scientific).

Изготовленные срезы фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин.

Перед окраской на внутриклеточные маркеры проводили пермеабиллизацию срезов раствором Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Окрашивание изготовленных срезов осуществляли с использованием специфических первичных антител: кроличьи антитела к CD31 (Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -SMA, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда (vWF, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену IV типа (Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к коллагену I типа (Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену III типа (Novus Biologicals, США). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4 °С, затем со вторичными антителами осли к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488-conjugated (Thermo Fisher, США) и антителами осли 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 мкг/мл, Sigma–Aldrich, США) в течение 30 минут. Препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Исследование эксплантированных образцов сосудистых протезов методом СЭМ по оригинальной методике

Эксплантированные образцы фиксировали в формалине в течение 24 часов, затем постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в 0,1 М фосфатном буфере и окрашивали 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95% этаноле, обезвоживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1 : 1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60 °С. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10–15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов при помощи сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах проводили на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Исследование элементного состава эксплантированных образцов сосудистых протезов

Для оценки элементного состава исследуемых образцов использовали метод рентгеноспектрального микроанализа, осуществленного с помощью энергодисперсионного спектрометра XFlash 4010 (Bruker), входящего в состав сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi). Элементный анализ был

осуществлен в условиях низкого вакуума (давление в камере микроскопа 20 Па) и при ускоряющем напряжении 15 кВ в режиме сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах, без использования стандартных образцов. На цифровых микрофотографиях идентифицировали макрофаги, гигантские многоядерные клетки, нейтрофилы, гладкомышечные и тучные клетки, определяли их локализацию и взаимодействие между собой и с другими элементами сосудистого протеза.

Сравнительная оценка профиля генной экспрессии, свойственной нативной сосудистой ткани, в стенке эксплантированного сосудистого протеза и нативной сонной артерии овцы

Для оценки генной экспрессии материалом послужили иссеченные участки сосудистого протеза и сонной артерии, а также смыв эндотелиальных клеток, полученный путем промывания сосудов и протезов лизирующим реагентом TRIzol (Invitrogen, США). В качестве генов интереса были отобраны: *IL1B*, *IL6*, *IL10*, *IL8*, *IL12A*, *TNF*, *VEGF*, *CXCR4*, *NR2F2*, *SNAI2*, *ICAM1*, *YAP1*, *IFNG*, *KDR*, *FGF2*, *MMP2*, *TGFB*. Сразу после резекции участок сосудистого протеза либо сонной артерии помещали в пробирку, содержащую 900 мкл лизирующего реагента TRIzol (Invitrogen, США) для дальнейшего выделения РНК. Перед началом эксперимента все рабочие поверхности и лабораторный инвентарь обработаны раствором для деконтаминации RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Invitrogen, США). Образцы гомогенизированы на аппарате (MP Biomedicals, США). Выделение РНК проведено в соответствии со стандартным протоколом по методу Хомчинского (гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформная экстракция). Количество и качество выделенной РНК оценено с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Целостность РНК определена с помощью спектрофотометра Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, США) путем измерения индекса RIQ (RNA Integrity and Quality). На основе 100 нг выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции и коммерческого набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезирована молекула комплементарной ДНК (кДНК). Количество и качество синтезированной кДНК оценено с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Экспрессия генов оценена с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBR на амплификаторе ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США).

На каждый образец приготовлено 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, США), смесь прямого и обратного праймеров в финальной концентрации 500 нМ и 10 нг кДНК. ПЦР проводили в 96-луночной оптической плашке, содержащей помимо анализируемых образцов пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). На каждый анализируемый образец, стандарт и отрицательный контроль готовили по три технических репликата. Амплификация осуществлена по следующей схеме: 2 минуты при 50 °C, 2 минуты при 95 °C, 15 секунд при 95 °C и 1 минута при 60 °C (40 циклов). Специфичность и эффективность реакции проверена путем анализа кривых плавления и графиков амплификации в программе QuantStudio™ Real-Time PCR Software v.1.3 (Applied Biosystems, США). Нормализация результатов кПЦР проведена с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессия изучаемых генов рассчитана по 2-ΔΔCt-методу и выражена в виде кратного изменения относительно контрольных образцов.

Статистический анализ

Результаты исследования обработаны в программе GraphPad Prism (Graph Pad Software). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова – Смирнова. Достоверность различий между двумя независимыми группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уит-

ни. При сравнении трех и более независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, для попарного сравнения групп применяли критерий Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение $M \pm SD$, а также как медиана и 25-й и 75-й процентиля Me (25%; 75%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование механических свойств

Исследование физико-механических свойств позволило выявить статистически значимое повышение жесткости сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix после модифицирования поливинилпирролидоном и последующего комплексообразования с гепарином и илопростом (табл.). Значения модуля Юнга протезов PHBV/PCL/GFmix^{Геп/Ило} в 5,8 раза превысили аналогичный показатель протезов PHBV/PCL/GFmix и в 20,6 – а. mammaria ($p < 0,05$), а сонной артерии овцы – в 100 раз. Также биodeградируемые сосудистые протезы с лекарственным покрытием PHBV/PCL/GFmix^{Геп/Ило} обладали максимальной силой, приложенной к образцу до начала его разрушения (табл.). Относительное удлинение сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix и PHBV/PCL/GFmix^{Геп/Ило} превысило аналогичный показатель а. mammaria почти в 4 раза ($p < 0,05$), а для сонной артерии отмечено уменьшение данного значения в 0,3 раза. По напряжению достоверных различий между а. mammaria и полимерными сосудистыми протезами не выявлено. Синтетические протезы Gore-Tex® имели хо-

Таблица

Механические свойства полимерных графтов PHBV/PCL/GFmix до и после формирования атромбогенного лекарственного покрытия в сравнении с Gore-Tex®, а. mammaria и сонной артерией овцы

Mechanical properties of PHBV/PCL/GFmix polymer grafts before and after formation of anti-thrombogenic drug coating in comparison with Gore-Tex®, а. mammaria and sheep carotid artery

	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга ($E_{\text{мод}}$), МПа
PHBV/PCL/GFmix (n = 9) M (25–75%)	3,045 (2,9; 3,2) ^{&}	121,7 (117,1; 129,6) ^{#&}	8,6 (8,0; 9,64) ^{#&}
PHBV/PCL/GFmix ^{Геп/Ило} (n = 9) M (25–75%)	3,94 (3,78–3,99) ^{&}	109,17 (92,29–116,06) ^{#&}	49,95 (44,9–54,7) ^{*#&}
Gore-Tex® (n = 9) M (25–75%)	22,95 (22,42–23,47) ^{**}	337,0 (332,0–341,8) ^{**}	1,98 (1,36–2,59)
A. mammaria (n = 9) M (25–75%)	2,48 (1,36–3,25) ^{&}	29,72 (23,51–39,62) ^{&}	2,42 (1,87–3,19)
Сонная артерия овцы	1,2 (1,06–1,9)	158,5 (126,0–169,5)	0,49 (0,39–0,66)

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно PHBV/PCL/GFmix; # – $p < 0,05$ относительно а. mammaria; ** – относительно всех рассматриваемых групп; & – относительно Gore-Tex®.

Note. * – $p < 0.05$ relative to PHBV/PCL/GFmix; # – $p < 0.05$ relative to а. mammaria; ** – relative to all groups considered; & – relative to Gore-Tex®.

рошие эластические свойства, схожие с таковыми у нативного сосуда, но при этом обладали большой прочностью. Поэтому сила, приложенная к протезам Gore-Tex® до начала их разрушения, была более чем в 6 раз больше, чем у биodeградируемых протезов, и в 22,9 раза больше, чем у а. tammaria ($p < 0,05$). Повышенная жесткость сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} с лекарственным покрытием, вероятно, обусловлена полимеризацией поверхности протезов с PVP и воздействием ионизирующего излучения.

Сканирующая электронная микроскопия сосудистых протезов до и после поверхностного модифицирования лекарственными препаратами

Модифицирование поверхности протезов PHBV/PCL/GFmix антитромботическими препаратами осуществлено с помощью формирования на его внутренней поверхности гидрогелевого покрытия из поливинилпирролидона, который способен не только связывать лекарственные препараты в результате комплексообразования, но и временно (до своего полного рассасывания) занимать полость пор, тем самым снижая риск адгезии тромбоцитов к поверхности протеза после имплантации протеза в сосудистое русло. Кроме того, известная гидрофильность PVP способствует снижению степени адгезии белковых молекул и форменных элементов крови, в частности тромбоцитов, а также предотвращению конформационных изменений белковых структур. Подвижностью макромолекулярных цепей в гидрогелях, в том числе, обусловлена высокая скорость десорбции молекул белка, дополняющая спектр причин их антитромбогенного потенциала [33, 34]. Протезы PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} состояли из хаотично расположенных микроразмерных полимерных волокон диаметром $1,47 \pm 0,67$ мкм (рис. 1), формирующих при своем переплетении микропоры. На рис. 1 видно, что после отмывки остатков неполимеризованного PVP с поверхности протезов и последующего присоединения гепарина и илопроста к оставшимся свободным реакционным группам PVP сохранилась исходная архитектура поверхности полимерного матрикса, а водорастворимый полимер покрывал лишь поверхность нитей, формирующих трубчатый каркас, без внешнего изменения вида микропор. Сформированного лекарственного покрытия оказалось достаточно, чтобы значительно улучшить гемосовместимые свойства поверхности протезов, что было ранее доказано в экспериментах *in vitro*: максимум агрегации тромбоцитов после контакта с поверхностью протезов с лекарственным покрытием PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} снизился в 2,1 раза в сравнении с аналогичными протезами без лекарственного покрытия PHBV/PCL/

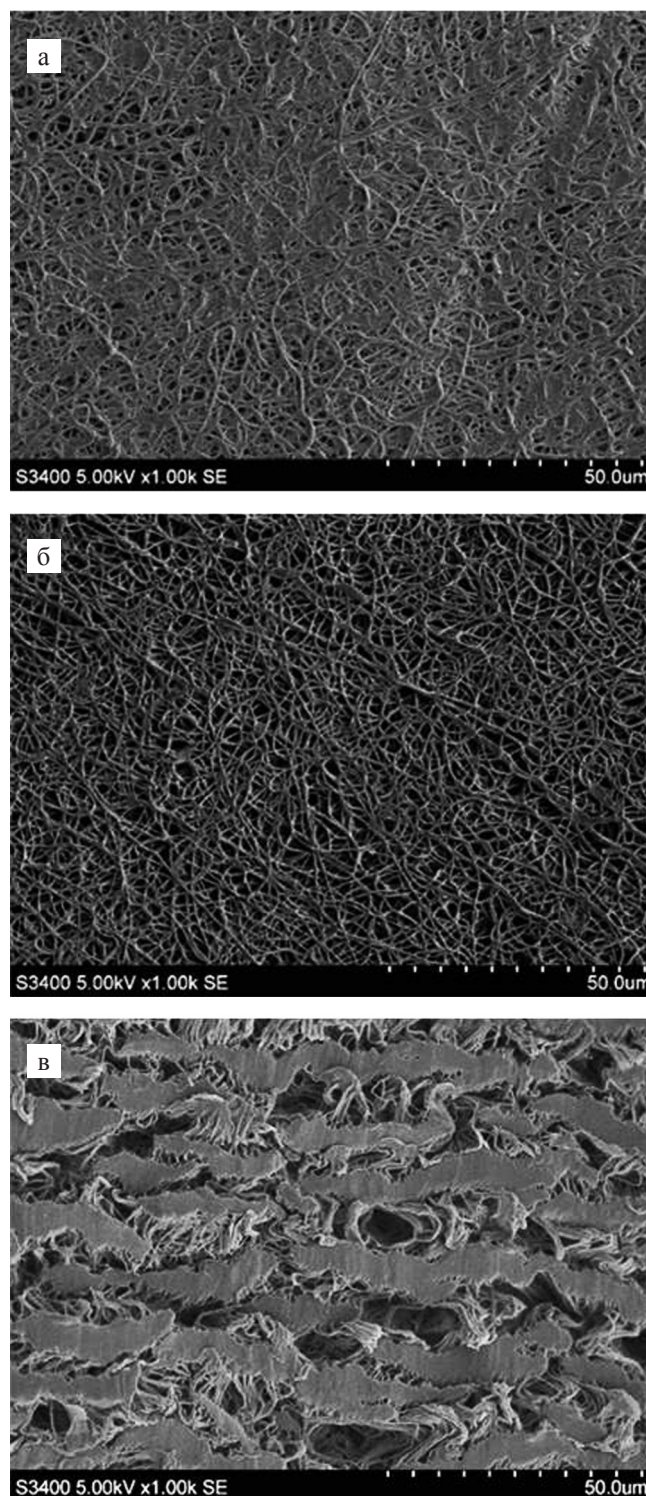


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности биodeградируемых и синтетических сосудистых протезов: а – внутренняя поверхность протеза PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} до отмывки от PVP; б – внутренняя поверхность протеза PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} после отмывки от PVP; в – внутренняя поверхность протеза Gore-Tex®. $\times 1000$

Fig. 1. Scanning electron microscopy of the inner surface of biodegradable and synthetic vascular grafts: а – inner surface of PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} graft before washing against PVP; б – inner surface of PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} graft after washing against PVP; в – inner surface of Gore-Tex® prosthesis. $\times 1000$

GFmix. На этом фоне индекс деформации тромбоцитов после контакта с поверхностью протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} был равен нулю, а с поверхностью протезов PHBV/PCL/GFmix – 2,7 [35].

Внутренняя поверхность синтетических протезов Gore-Tex[®] представлена монолитными фрагментами полимера (рис. 1), чередующимися с пористыми структурами. При этом поры на внутренней поверхности Gore-Tex[®] – большего размера относительно пор на поверхности PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo}.

Результаты имплантации сосудистых протезов

Для проведения преклинических испытаний разработанных протезов использована овечья модель, являющаяся моделью выбора для оценки эффективности сердечно-сосудистых имплантатов *in vivo* [36]. Считается, что овцы пригодны для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к тромбозу и кальцификации, что позволяет провести максимально строгое тестирова-

ние сосудистых протезов на предмет их долгосрочной проходимости и дегенерации *in vivo* [36].

Необходимость формирования атромбогенного лекарственного покрытия была продиктована негативными результатами, полученными ранее при имплантации биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix в сонную артерию овец [37]. Высокая пористость стенки привела к раннему тромбозу вышеуказанных протезов в 100% случаев [37].

С целью сравнительной оценки эффективности разработанных сосудистых протезов с лекарственным покрытием с протезами, используемыми в настоящее время в клинической практике, также была сформирована группа сравнения из синтетических протезов Gore-Tex[®] диаметром 4 мм (Number ST04010A, USA).

Пройодимость протезов с лекарственным покрытием PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} через 1 сутки после имплантации в сонную артерию овец составила 62,5% (5 из 8) (рис. 2). Спустя 18 месяцев проходимость протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} составила 50,0%. Однако во всех проходимых эксплантированных

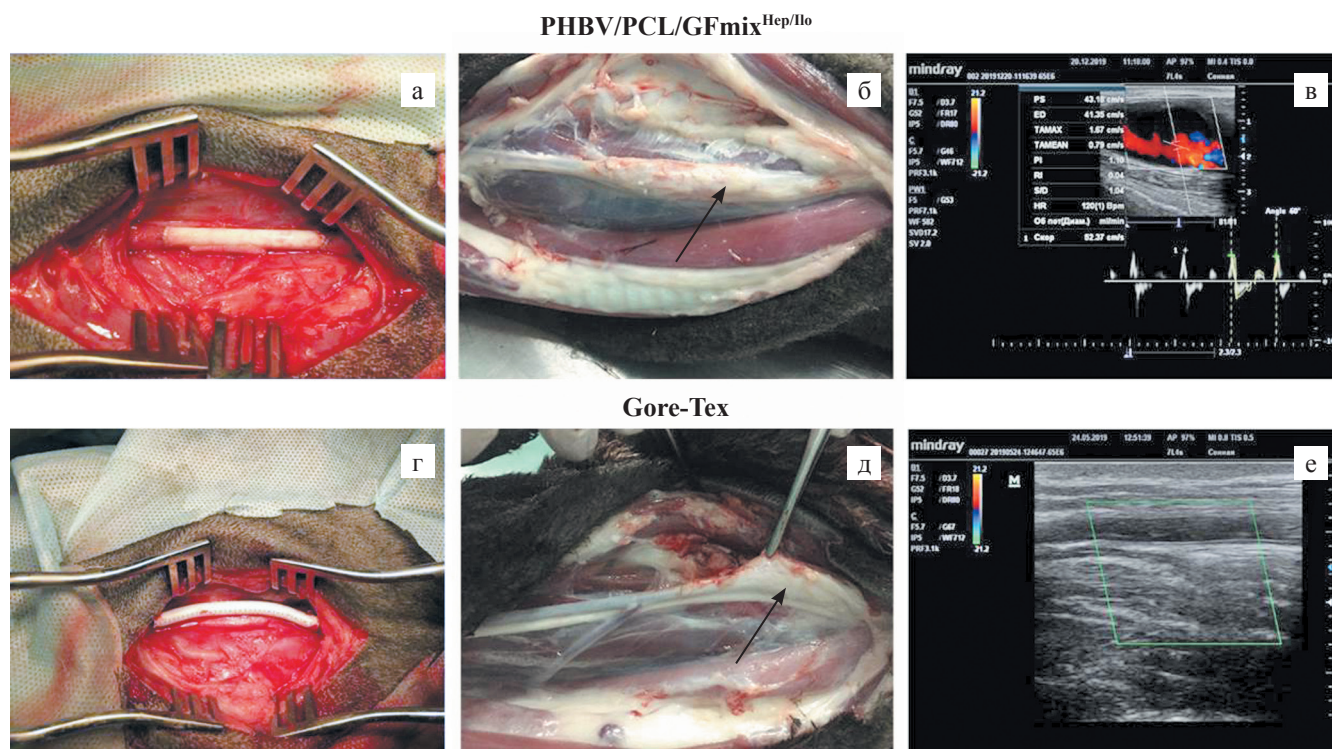


Рис. 2. Внешний вид и анализ проходимости протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} и Gore-Tex: а – PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo}, имплантированный в сонную артерию овцы; б – PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} спустя 18 месяцев после имплантации; в – УЗИ-картина проходимости протеза PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} спустя 18 месяцев после имплантации; г – Gore-Tex, имплантированный в сонную артерию овцы; д – Gore-Tex спустя 6 месяцев после имплантации; е – УЗИ-картина проходимости протеза Gore-Tex

Fig. 2. Appearance and permeability analysis of PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} and Gore-Tex grafts: а – PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} implanted in the sheep carotid artery; б – PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} 18 months after implantation; в – ultrasound image of patency of PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} graft 18 months after implantation; г – Gore-Tex implanted in sheep carotid artery; д – Gore-Tex after 6 months of implantation; е – ultrasound image of Gore-Tex patency

протезах наблюдали аневризматическое расширение стенки на всем протяжении (рис. 2).

Через сутки после имплантации протезов Gore-Tex® в 100,0% случаев (5 из 5) был выявлен тромбоз.

Результаты морфологического исследования эксплантированных протезов

Выявлено, что на месте биodeградируемого сосудистого протеза PNBV/PCL/GFmix^{Нер/Ио} сформировался трехслойный новообразованный сосуд, схожий по строению с нативной сонной артерией. Однако основным отличием новообразованной сосудистой ткани от ткани нативного сосуда стало аневризматическое расширение, отсутствие эластических волокон и четкой вытянутости цитоплазмы гладкомышечных клеток, что, возможно, и обусловлено аневризматическим растяжением образовавшейся сосудистой ткани в условиях пульсирующего тока крови (рис. 3). Небольшой очаг крупнокристаллического кальция был обнаружен в толще лишь одного протеза PNBV/PCL/GFmix^{Нер/Ио} – между медией и адвентицией (рис. 3).

В просвете всех эксплантированных протезов Gore-Tex® спустя 6 месяцев после имплантации выявлен реканализированный тромб. Снаружи вокруг протеза сформировалась толстая соединительно-тканная капсула. Формирование новообразованной ткани в толще протеза отсутствовало (рис. 3). Несмотря на отсутствие кровотока, протезы Gore-Tex® подвергались массивной кальцификации (рис. 3). Также мелкокристаллические очаги кальция обнаружены во внешней соединительно-тканной капсуле. Ничего подобного в тромбированных протезах PNBV/PCL/GFmix, имплантированных ранее в сонную артерию овец сроком на 12 месяцев, не выявлено [37].

При изучении эксплантированных биodeградируемых протезов с лекарственным покрытием PNBV/PCL/GFmix^{Нер/Ио} методом СЭМ выявлены типичные по морфологии эндотелиальные клетки. При изучении толщи эксплантированных протезов выявлено, что новообразованная сосудистая ткань, сформированная на месте резорбированного биodeградируемого трубчатого каркаса, имела три слоя: неоинтиму, состоящую из гладкомышечных клеток и покрытую эндотелием; средний слой, содержащий большое количество коллагеновых волокон, фибробластоподобных клеток, макрофагов, единичных гигантских многоядерных клеток и vasa vasorum. На стыке между неоинтимой и средним слоем обнаружен небольшой участок отложения кальция. За средним слоем следовал внешний слой, содержащий все типичные для адвентиции элементы: vasa vasorum, единичные

клетки инородного тела, периваскулярную жировую ткань, лимфоидные фолликулы.

При детальном послойном изучении методом СЭМ сформировавшихся тканей вокруг эксплантированного протеза Gore-Tex® выявлено, что весь просвет заполнен реканализированным тромбом. Стенка протеза содержала кальциевые включения, занимающие 12–15% площади. Снаружи протез был окружен слоем плотной соединительной ткани, состоящей преимущественно из фиброцитов и коллагеновых волокон с большим количеством новообразованных сосудов. Кальциевые депозиты были представлены бесформенными гетерогенными образованиями, часто не имеющими четко выраженных границ. Внутренняя структура кальцификатов была неоднородной. В областях депозита с минимальным количеством кальция отмечали его наличие только во внешней части образующих протез волокон. При более выраженной кальцификации отложения кальция наблюдали как во внешней структуре волокон, так и в пространстве между ними. В варианте с максимальной кальцификацией практически все пространство было заполнено кальциевыми отложениями, внутри которых присутствовали отдельные некальцинированные волокна.

Результаты конфокальной микроскопии с применением иммунофлуоресцентного окрашивания

Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных протезов с лекарственным покрытием показали, что образовавшаяся на месте резорбированного протеза ткань содержала основные структурные элементы новообразованного сосуда: сформирован эндотелиальный и гладкомышечный слой, выявлено большое количество коллагенов I, III и IV типов. Коллаген IV типа преимущественно откладывался в базальной мембране, коллаген III типа – в базальной мембране и стенке графта, коллаген I типа – в адвентиции (рис. 4). Эндотелиальный слой, выстилавший неоинтиму, на отдельных его участках был представлен двурядным расположением эндотелиальных клеток, активных в плане синтеза vWF, но одновременно экспрессирующих CD31 и α -actin. Подобная картина может косвенно свидетельствовать о наличии эндотелиально-мезенхимального перехода, который способен запускаться в условиях, не являющихся для эндотелия физиологичными. В аневризматически расширенном имплантате в качестве причины, способной запустить эндотелиально-мезенхимальный переход, вполне может выступить турбулентный ток крови. В толще стенки протеза отмечали скопления эндотелиальных клеток, положительные по CD31 и vWF. По внешнему краю

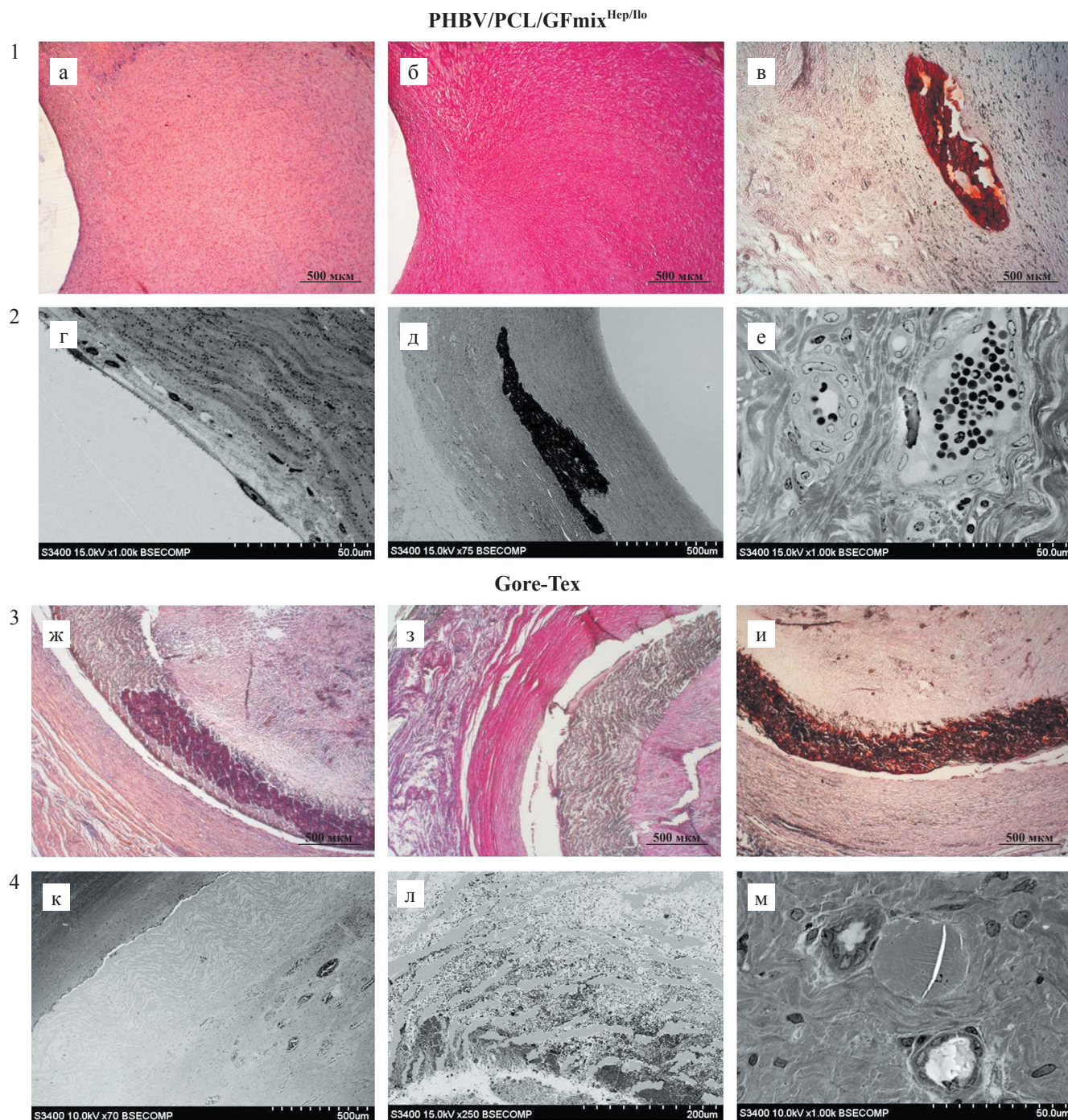


Рис. 3. Результаты морфологического исследования: 1, 2 – эксплантированных сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} спустя 18 месяцев после имплантации; 1 – гистологическое исследование (а – окраска гематоксилином-эозином; б – окраска по Ван-Гизону; в – окраска ализариновым красным С), $\times 50$; 2 – сканирующая электронная микроскопия (г – эндотелий на внутренней поверхности протеза, $\times 1000$; д – поперечный срез стенки эксплантированного графта с участком кальцификации, $\times 75$; е – vasa vasorum, гладкомышечные волокна в среднем слое протеза, $\times 1000$); 3, 4 – эксплантированных сосудистых протезов Gore-Tex[®] спустя 6 месяцев после имплантации; 3 – гистологическое исследование (ж – окраска гематоксилином-эозином; з – окраска по Ван-Гизону; и – окраска ализариновым красным С), $\times 50$; 4 – сканирующая электронная микроскопия (к – поперечный срез, $\times 70$; л – кальций в толще стенки протеза, $\times 250$; м – новообразованные сосуды в ткани внешней оболочки, $\times 1000$)

Fig. 3. Results of morphological study: 1, 2 – of explanted PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} vascular grafts 18 months after implantation: 1 – histological study (a – H&E stain; б – Van Gieson's stain; в – alizarin red S stain), $\times 50$; 2 – scanning electron microscopy (г – endothelium on the inner surface of the graft, $\times 1000$; д – transverse section of the explanted graft wall with a calcification area, $\times 75$; е – vasa vasorum, smooth muscle fibers in the middle layer of the graft, $\times 1000$); 3, 4 – of explanted Gore-Tex[®] vascular grafts 6 months after implantation: 3 – histological examination (ж – H&E stain; з – Van Gieson's stain; и – alizarin red S stain), $\times 50$; 4 – scanning electron microscopy (к – transverse section, $\times 70$; л – calcium in the graft wall thickness, $\times 250$; м – newly formed vessels in the outer sheath tissue, $\times 1000$)

и снаружи протеза PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} обнаружена плотная упорядоченная ткань, образованная актин-секретирующими клетками с концентрически ориентированными скоплениями vWF-секретирующих клеток и тяжами коллагена III типа. Выявлено, что клетки, монослоем выстилавшие поверхность неоинтимы со стороны просвета сосуда, – зрелые эндотелиальные клетки, синтезирующие vWF, однако с признаками эндотелиально-мезенхимально-го перехода (одновременно экспрессируют CD31 и α -actin). Имела место базальная мембрана с коллагеном IV типа. Коллаген III типа обнаружен в стенке и в базальной мембране под слоем эндотелиальных клеток. В толще стенки эксплантата и адвентициальном слое – большое количество новообразованных сосудов и клеточных элементов.

При проведении иммунофлуоресцентного исследования синтетических сосудистых протезов Gore-Tex[®] через 6 месяцев имплантации обнаружен обтурирующий тромб в просвете протезов, выявлено отсутствие эндотелиального слоя, неоинтимы и меди, отсутствие коллагена III типа и лишь незначительное отложение коллагена IV типа в краевой зоне со стороны внутреннего просвета. С наружной поверхности эксплантационного протеза отмечено

формирование соединительно-тканной капсулы с признаками неореваскуляризации.

Результаты исследования элементного состава экспантированных образцов сосудистых протезов

Исследование элементного состава сплошных кальциевых депозитов показало их внутреннюю однородность по содержанию в них кальция и фосфора. Медианное значение отношения кальция к фосфору для различных участков ($n = 6$) было 2,01, при минимальном значении 1,96 и максимальном 2,05. В кальцийсодержащих областях, состоящих преимущественно из кальцинированных волокон, отношение Ca/P в различных волокнах находилось в пределах от 1,2 до 2,32. Вероятно, такие различия в содержании кальция объясняются разными стадиями процесса кальцификации для конкретных волокон. Кроме биологически значимых элементов в составе волокон протеза был обнаружен фтор в количестве около 2%, что косвенно свидетельствует о сохранности самих волокон на начальных этапах кальцификации. В участках со сплошной кальцификацией внутри депозита присутствия фтора не было выявлено. Вероятно, это связано с маскирующим эффектом самого депозита, снижающего доступность

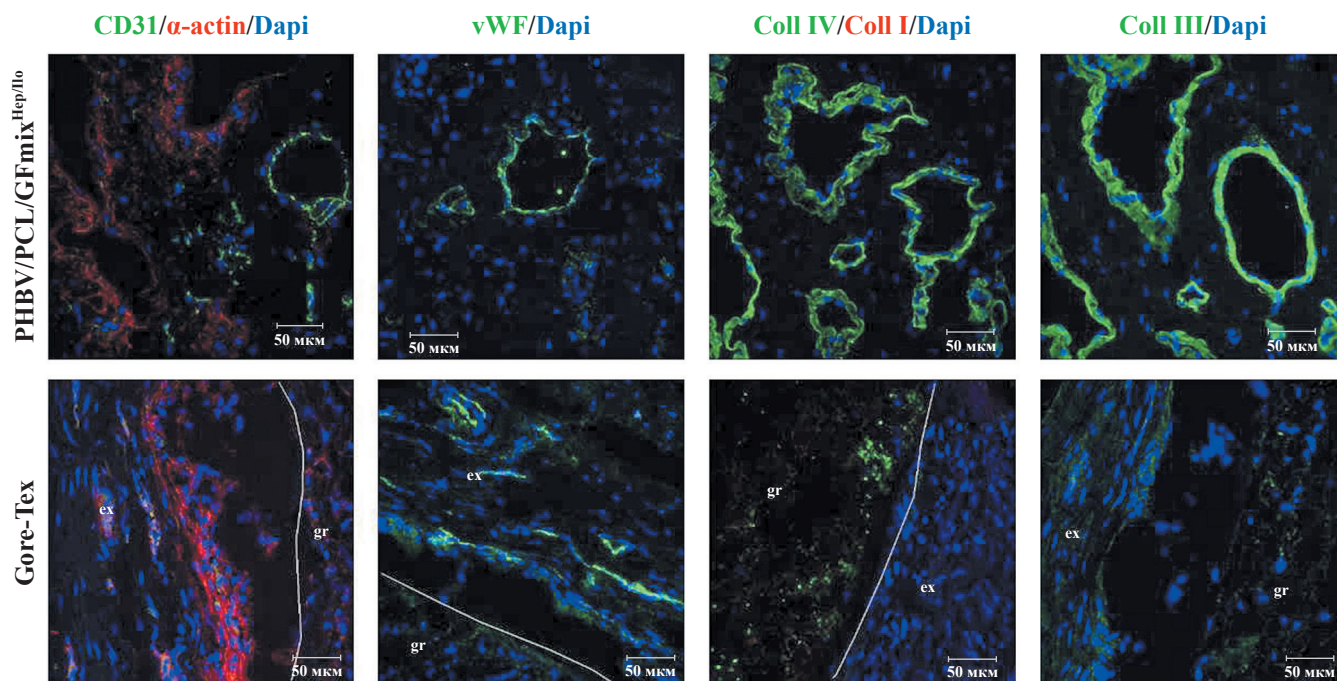


Рис. 4. Конфокальная микроскопия экспантированных сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} и Gore-Tex[®]: окраска специфичными флуоресцентными антителами на CD31 (зрелые эндотелиальные клетки), vWF (фактор фон Виллебранда), α -actin (маркер гладкомышечных клеток), collagen I (коллаген I типа), collagen III (коллаген III типа), collagen IV (коллаген IV типа), DAPI (флуоресцентный ядерный краситель), $\times 200$

Fig. 4. Confocal microscopy of explanted vascular grafts PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} and Gore-Tex[®]: staining with specific fluorescent anti-CD31 antibodies (mature endothelial cells), vWF (von Willebrand factor), α -actin (smooth muscle cell marker), collagen type I), collagen type III, collagen type IV, DAPI (fluorescent nuclear dye), $\times 200$

зондирующего электронного пучка внутрь изучаемой структуры, а не химической деструкцией волокон.

Результаты оценки профиля генной экспрессии

Были изучены профили транскрипции эндотелия и стенки регенерированной артерии по сравнению с таковыми в контралатеральных сонных артериях. Обратная транскрипционно-количественная полимеразная цепная реакция выявила обилие транскриптов, связанных с воспалением (*IL1B*, *IL6* и *CXCL8*), ремоделированием ECM (*MMP2*) и эндотелиально-мезенхимальным переходом (*SNAI2*) в обеих фракциях РНК, полученных из регенерированной артерии (рис. 5). Эндотелиальный лизат был обогащен воспалительными транскриптами (*IL1B*, *IL6* и *ICAM1*) и признаками репрограммирования эндотелия (венозный транскрипт *NR2F2* и маркер эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI2*). Эти наблюдения позволяют предположить, что молекулярный ландшафт сосудистой ткани, формирующейся на месте биодеградируемого сосудистого протеза, может отличаться от соответствующих кровеносных сосудов даже при регенерации артерий в долгосрочной перспективе (18 месяцев после имплантации).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование по модифицированию сосудистых протезов из смеси полимеров PHBV/PCL ростовыми факторами, а также формирование на внутренней поверхности лекарственного покрытия из гепарина и илопроста, присоединенных через гид-

рогелевое покрытие из поливинилпирролидона методом комплексообразования, показало успешное создание высокопористого и функционально активного биодеградируемого сосудистого протеза, на основе которого со временем может формироваться новообразованная сосудистая ткань, схожая по строению с нативной сонной артерией овцы. Также присоединение к поверхности протеза гидрогелевого покрытия с лекарственными препаратами позволило временно сгладить рельефность внутренней поверхности протеза и усилить его атромбогенность благодаря медленному высвобождению гепарина и илопроста после имплантации в сосудистое русло. Однако факт наличия аневризматических расширений говорит о том, что новообразованная ткань оказалась неспособна противостоять циклическим нагрузкам тока крови. Поэтому несмотря на полученные высокие результаты биосовместимости и формирования новообразованной сосудистой ткани без инициации процессов воспаления и кальцификации, разработанная конструкция требует дополнительного укрепления внешнего каркаса.

Исследование выполнено в рамках комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в области разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» (утв. Распоряжением Правительства РФ от 11 мая 2022 года № 1144р).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019; 139 (10): 56–528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659. PMID: 30700139.
2. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020; 141 (9): 139–596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757. PMID: 31992061.

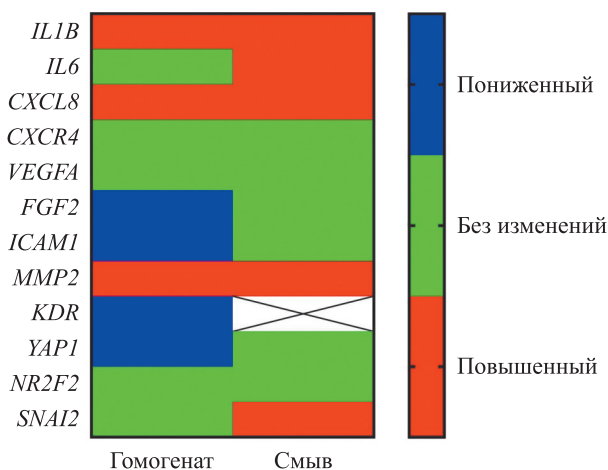


Рис. 5. Транскрипционный профиль регенерированных на месте сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} и интактных контралатеральных сонных артерий через 18 месяцев после имплантации

Fig. 5. Transcriptional profile of *in situ* regenerated PHBV/PCL/GFmix^{Hep/Ilo} vascular grafts and intact contralateral carotid arteries 18 months after implantation

3. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2021; 143 (8): 254–743. doi: 10.1161/CIR.0000000000000950. PMID: 33501848.
4. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016; 22 (1): 68–100. doi: 10.1089/ten.teb.2015.0100. PMID: 26447530.
5. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 76 (25): 2982–3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010. PMID: 33309175.
6. Taggart DP. Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. *Ann Cardiothorac Surg*. 2013; 2 (4): 427–430. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.21. PMID: 23977618.
7. Elliott MB, Ginn B, Fukunishi T, Bedja D, Suresh A, Chen T et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116 (26): 12710–12719. doi: 10.1073/pnas.1905966116. PMID: 31182572.
8. Kimicata M, Swamykumar P, Fisher JP. Extracellular Matrix for Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part A*. 2020; 26 (23–24): 1388–1401. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0201. PMID: 33231135.
9. Matsushita H, Inoue T, Abdollahi S, Yeung E, Ong CS, Lui C et al. Corrugated nanofiber tissue-engineered vascular graft to prevent kinking for arteriovenous shunts in an ovine model. *JVS Vasc Sci*. 2020; 1: 100–108. doi: 10.1016/j.jvssci.2020.03.003. PMID: 34617042.
10. Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shoji T, Shinoka T. Heparin-Eluting Tissue-Engineered Bioabsorbable Vascular Grafts. *Applied Sciences*. 2021; 11 (10): 4563. doi: 10.3390/app11104563.
11. Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Brizzi V, Delmond S, Bareille R et al. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed Mater*. 2017; 12 (6): 065003. doi: 10.1088/1748-605X/aa78d0. PMID: 28604360.
12. Stowell CET, Wang Y. Quickening: Translational design of resorbable synthetic vascular grafts. *Biomaterials*. 2018; 173: 71–86. doi: 10.1016/j.biomaterials. PMID: 29772461.
13. Fernández-Colino A, Wolf F, Rütten S, Schmitz-Rode T, Rodríguez-Cabello JC, Jockenhoevel S, Mela P. Small caliber compliant vascular grafts based on elastin-like recombinamers for *in situ* tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 340. doi: 10.3389/fbioe.2019.00340.
14. Shoji T, Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Transl Pediatr*. 2018; 7 (2): 188–195. doi: 10.21037/tp.2018.02.01. PMID: 29770300.
15. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015; 44 (15): 5680–5742. doi: 10.1039/c4cs00483c. PMID: 26023741.
16. Wissing TB, Bonito V, Bouten CVC, Smits AIPM. Biomaterial-driven *in situ* cardiovascular tissue engineering—a multi-disciplinary perspective. *NPJ Regen Med*. 2017; 2: 18. doi: 10.1038/s41536-017-0023-2. PMID: 29302354.
17. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018; 22 (3): 340–354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009. PMID: 29499152.
18. Malik S, Sundarrajan S, Hussain T, Nazir A, Ramakrishna S. Fabrication of Highly Oriented Cylindrical Polyacrylonitrile, Poly(lactide-co-glycolide), Polycaprolactone and Poly(vinyl acetate) Nanofibers for Vascular Graft Applications. *Polymers*. 2021; 13 (13): 2075. doi: 10.3390/polym13132075. PMID: 34202499.
19. Drews JD, Pepper VK, Best CA, Szafron JM, Cheatham JP, Yates AR et al. Spontaneous reversal of stenosis in tissue-engineered vascular grafts. *Sci Transl Med*. 2020; 12 (537): eaax6919. doi: 10.1126/scitranslmed.aax6919. PMID: 32238576.
20. Cui H, Zhu W, Huang Y, Liu C, Yu ZX, Nowicki M et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of 3D bioprinted small-diameter vasculature with smooth muscle and endothelium. *Biofabrication*. 2019; 12 (1): 015004. doi: 10.1088/1758-5090/ab402c. PMID: 31470437.
21. Radke D, Jia W, Sharma D, Fena K, Wang G, Goldman J et al. Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater*. 2018; 7 (15): e1701461. doi: 10.1002/adhm.201701461. PMID: 29732735.
22. Matsuzaki Y, 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.athoracsur.2020.06.112. PMID: 32946845.
23. Matsuzaki Y, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang YC, 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.
24. Fang S, Ellman DG, Andersen DC. Review: Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts and Their *In Vivo* Evaluation in Large Animals and Humans. *Cells*. 2021; 10 (3): 713. doi: 10.3390/cells10030713. PMID: 33807009.
25. Jia W, Li M, Weng H, Gu G, Chen Z. Design and comprehensive assessment of a biomimetic tri-layer tubular scaffold via biodegradable polymers for vascular tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 110: 110717. doi: 10.1016/j.msec.2020.110717. PMID: 32204029.

26. Norouzi SK, Shamloo A. Bilayered heparinized vascular graft fabricated by combining electrospinning and freeze drying methods. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019; 94: 1067–1076. doi: 10.1016/j.msec.2018.10.016. PMID: 30423687.
27. Liu Yue, Jiang Ziyi, Li Jingjing, Meng Kai, Zhao Hu-ijing. Cell co-culture and *in vivo* biocompatibility of poly(L-lactic caprolactone)/silk fibroin small-diameter artificial blood vessels[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*. 2022; 26 (22): 3505–3513. doi: 10.12307/2022.278.
28. Yao W, Gu H, Hong T, Wang Y, Chen S, Mo X et al. A bi-layered tubular scaffold for effective anti-coagulant in vascular tissue engineering. *Materials & Design*. 2020; 194: 108943. doi: 10.1016/j.matdes.2020.108943.
29. 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 chemo-attractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 25–36. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36.
30. Stowell CET, Li X, Matsunaga MH, Cockreham CB, Kelly KM, Cheetham J et al. Resorbable vascular grafts show rapid cellularization and degradation in the ovine carotid. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020; 14 (11): 1673–1684. doi: 10.1002/term.3128. PMID: 32893492.
31. Zhu T, Gu H, Ma W, Zhang Q, Du J, Chen S et al. A fabric reinforced small diameter tubular graft for rabbits' carotid artery defect. *Composites Part B: Engineering*. 2021; 225: 109274. doi: 10.1016/j.compositesb.2021.109274.
32. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Резцова МА, Кривкина ЕО, Кудрявцева ЮА, Барбараиш ОЛ, Барбараиш ЛС. Технология изготовления функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием: пат. 2702239. Заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) (RU); № 2019119912; заявл. 25.06.2019; опублик. 07.10.2019, бюл. № 28. Antonova LV, Sevostyanova VV, Rezvova MA, Krivkina EO, Kudryavtseva YuA, Barbarash OL, Barbarash LS. Manufacturing technology of functionally active biodegradable vascular prostheses of small diameter with drug coating: Pat. 2702239. Applicant and patentee Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases» (NII KPSSZ) (RU); No. 2019119912; dec. 06/25/2019; publ. 07.10.2019, bull. No. 28 [In Russ].
33. Abd El-Mohdy HL, Hegazy El-SA. Preparation of Polyvinyl Pyrrolidone-Based Hydrogels by Radiation-Induced Crosslinking with Potential Application as Wound Dressing. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2008; 45 (12): 995–1002. doi: 10.1080/10601320802454128.
34. Godakanda, VU, Li H, Alquezar L, Zhao L, Zhu LM, de Silva R et al. Tunable drug release from blend poly (vinyl pyrrolidone)-ethyl cellulose nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 562: 172–179. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.035.
35. Антонова ЛВ, Резцова МА, Севостьянова ВВ, Ткаченко ВО, Глушкова ТВ, Акентьева ТН, Кудрявцева ЮА, Барбараиш ЛС. Разработка технологии формирования атромбогенного лекарственного покрытия для биodeградируемых сосудистых протезов. *Современные технологии в медицине*. 2020; 12 (6): 6–14. Antonova LV, Rezvova MA, Sevostyanova VV, Tkachenko VO, Glushkova TV, Akent'eva TN, Kudryavtseva YuA, Barbarash LS. Razrabotka tekhnologii formirovaniya atrombogenicnogo lekarstvennogo pokrytiya dlya biodegradiruemyykh sosudistykh protezov. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*. 2020; 12 (6): 6–14.
36. 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.
37. Antonova LV, Mironov AV, Yuzhalin AE, Krivkina EO, Shabaev AR, Rezvova MA. et al. Brief Report on an Implantation of Small-Caliber Biodegradable Vascular Grafts in a Carotid Artery of the Sheep. *Pharmaceutics*. 2020; 13: 101. doi: 10.3390/ph13050101.

Статья поступила в редакцию 13.04.2022 г.
The article was submitted to the journal on 13.04.2022