

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-105-118

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА: РЕЗУЛЬТАТЫ ШЕСТИМЕСЯЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

*Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Е.А. Великанова, А.В. Синуцкая, А.В. Миронов,
А.Р. Шабаев, М.Ю. Ханова, Е.А. Торгунакова, Л.В. Антонова*

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

Модифицирование поверхности полимерных каркасов лекарственными препаратами во избежание тромбообразования и инфицирования – перспективное направление тканевой инженерии, позволяющее также ускорить их ремоделирование и улучшить долгосрочную проходимость. **Цель:** изучить гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра с атромбогенным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированных в сонную артерию овцы. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга изготовлены матрицы Ø4 мм из поли(ε-капролактона) (PCL) с последующим созданием на их внешней поверхности армирующего спиралевидного каркаса из PCL посредством экструзии. Для предупреждения тромбообразования и инфицирования изготовленные протезы модифицировали илопростом и катионным амфифилом посредством комплексообразования через поливинилпирролидон (PVP). Проведены работы по оценке с помощью ИК-спектроскопии формирования покрытия на основе PVP, изучению физико-механических свойств протезов в продольном и поперечном направлениях, имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы. Для оценки и контроля проходимости имплантированных протезов проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с функцией Доплера на 1-е, 5-е сутки, затем через 1, 3 и 6 месяцев. Эксплантированные образцы изучены методами гистологического и иммунофлуоресцентного анализов, проведена оценка профиля генной экспрессии. **Результаты.** Согласно данным УЗИ-мониторинга, на 1-е и 5-е сутки после имплантации проходимость сосудистых протезов составила 100%. Через 1 месяц проходимость снизилась до 83,3%, к концу срока имплантации (6 месяцев) проходимость составила 50%, без развития аневризмообразования и отслойки армирующего каркаса. Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований проходимых протезов показали формирование на их основе новообразованной трехслойной структуры сосудистой ткани, без признаков воспаления и кальцификации. Однако, несмотря на структурное сходство новообразованной сосудистой ткани с нативной тканью сонной артерии овцы, анализ профиля генной экспрессии выявил различия по генетическому профилю: обнаружено снижение уровня экспрессии генов *CNN* и *SNA12* в неоткани и увеличение уровня *CTSB*, *TNFα*, *TGFβ*. **Заключение.** Модифицированные полимерные сосудистые каркасы показали хорошее ремоделирование стенки протеза, без аневризмообразования. Выявленные генетические отличия новообразованной ткани от нативной логичны ввиду формирования ее на базе искусственного полимерного каркаса. Дальнейшие исследования усиленных полимерных каркасов будут направлены на усовершенствование внутренней поверхности с целью повышения их тромборезистентности.

Ключевые слова: сосудистые протезы, атромбогенная обработка, противомикробная обработка, илопрост, катионные амфифилы.

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

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

HISTOLOGIC AND GENETIC FEATURES OF REMODELING OF TISSUE-ENGINEERED SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS: OUTCOMES OF SIX-MONTH IMPLANTATION IN A SHEEP MODEL

E.A. Senokosova, E.O. Krivkina, E.A. Velikanova, A.V. Sinitskaya, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, M.Yu. Khanova, E.A. Torgunakova, L.V. Antonova

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

Surface modification of polymeric scaffolds with drugs to avoid thrombus formation and infection is a promising area in tissue engineering, which also makes it possible to accelerate the remodeling of such scaffolds and improve long-term patency. The **objective** of this paper is to study the histologic and genetic features of remodeling of tissue-engineered small-diameter vascular grafts (SDVGs) with antithrombogenic drug-coated and reinforced external scaffolds, implanted into a sheep carotid artery. **Materials and methods.** Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) matrices, \varnothing 4 mm in diameter, were fabricated via electrospinning, followed by creation of a reinforcing spiral PCL scaffold on their outer surface by extrusion. To prevent thrombus formation and infection, the fabricated grafts were modified with iloprost and cationic amphiphile by complexation through polyvinylpyrrolidone (PVP). The work was carried out to evaluate, by infrared spectroscopy, the formation of PVP-based coating, to study the physical and mechanical properties of the grafts in longitudinal and transverse directions, and to implant the vascular grafts (VGs) into a sheep carotid artery. To assess and control the patency of the implanted grafts, Doppler ultrasound was performed at days 1 and 5, then at 1, 3 and 6 months. The explanted samples were studied via histological and immunofluorescent analyses; gene expression profile was evaluated. **Results.** Ultrasound on days 1 and 5 after implantation showed the patency of vascular grafts to be 100%. At 1 month, the patency decreased to 83.3%; patency was 50% by the end of the implantation period (6 months), without aneurysm formation and detachment of the reinforcing scaffold. Histological and immunofluorescence studies of patent grafts showed the formation of a newly formed three-layer vascular tissue structure on their basis, without signs of inflammation and calcification. However, despite the structural similarity between the newly formed vascular tissue and the native tissue of a sheep carotid artery, analysis of the gene expression profile revealed some differences in terms of genetic profile: *CNN* and *SNAI2* expression levels in the neotissue decreased, and those of *CTSB*, *TNF α* , and *TGF β* increased. **Conclusion.** Modified polymeric vascular scaffolds showed good remodeling of the prosthetic wall, without aneurysm formation. The identified genetic differences between newly formed tissue and native tissue are logical in view of formation on the basis of the artificial polymeric scaffold. Further research on reinforced polymeric scaffolds will be aimed at improving the inner surface in order to improve their thromboresistance.

Keywords: vascular grafts; antithrombogenic treatment; antimicrobial treatment; iloprost; cationic amphiphiles.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающее с каждым годом число сердечно-сосудистых заболеваний – одна из основных причин смерти населения во всем мире [1, 2]. Аутологичные трансплантаты являются предпочтительным материалом для восстановления кровотока в пораженной области сосудистого бассейна. Однако доступность артерий и вен пациентов ограничена из-за качества сосудов, связанного с сопутствующими заболеваниями (повышенное кровяное давление, сахарный диабет и другие) [1].

Альтернативой аутоотрансплантатам можно считать клинически одобренные синтетические сосудистые протезы из полиэтилентерефталата (polyethylene terephthalate, PET, Dacron) и политетрафторэтилена (polytetrafluoroethylene, PTFE). Они демонстрируют высокую эффективность при протезировании круп-

ных сосудов с внутренним диаметром более 6 мм. Однако данные протезы теряют свою эффективность при замене участка сосуда диаметром менее 5 мм, проявляя склонность к тромбозам, стенозам, окклюзии сосудистого просвета и инфицированию [2, 3]. Актуальным подходом к созданию протезов сосудов малого диаметра является тканевая инженерия (ТИ), основанная на различных тактиках работы с биосовместимыми и биodeградируемыми полимерами. Различные методы ТИ позволяют спроектировать искусственные тканеподобные матрицы/ткани с необходимыми структурными и механическими свойствами [4–6]. Сосудистый протез из такого материала обладает способностью к синхронному процессу биodeградации и ремоделирования своей стенки с вектором формирования трехслойной структуры нативного кровеносного сосуда при участии клеток

организма [7–9]. Однако данный процесс достаточно длителен и сопровождается такими рисками, как тромбоз, аневризмобразование и микробное обсеменение [10–12].

Высокопористые тканеинженерные конструкции при контакте с кровью способны провоцировать тромбообразование. Поэтому при разработке изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии данные особенности необходимо учитывать. Поверхностное модифицирование протезов атромбогенными лекарственными препаратами может предупредить тромбоз просвета имплантированных сосудистых протезов как в раннем послеоперационном периоде, так и в процессе длительной биорезорбции основного каркаса протеза [11, 13].

Несмотря на то что за прошедшие годы разработаны различные подходы модифицирования сосудистых протезов для предотвращения их инфекционного заражения и тромбообразования, ни один из них не смог продемонстрировать каких-либо значительных преимуществ [14–16].

Помимо вышеперечисленных проблем в случае применения биодеградируемых сосудистых протезов должно быть четкое понимание уровня синхронизации ремоделирования с процессами биодеградации. Уже существуют работы, в которых проведен подробный анализ итогов долгосрочной имплантации биодеградируемых сосудистых протезов с использованием крупной животной модели [6, 8, 12, 17]. Доказано, что тканеинженерные сосудистые протезы замещаются новообразованной сосудистой тканью, превращаясь в подобие аутологических сосудов, что подтверждает способность биодеградируемых протезов к адаптивному росту. Однако при всех многообещающих разработках и успешном тестировании на мелкой животной модели основным итогом преclinical испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели крупных лабораторных животных явилось аневризмобразование в силу ускоренной биорезорбции основного каркаса сосудистого протеза [6, 17].

Поэтому создание внешнего армирующего каркаса позволит предупредить аневризмобразование и другие деформативные изменения стенок протеза в ходе долгосрочного функционирования в сосудистом русле. А использование для поверхностного модифицирования лекарственных препаратов, способных предупредить как тромбообразование, так и инфицирование, увеличит долгосрочную эффективность разрабатываемых для нужд сердечно-сосудистой

хирургии высокопористых тканеинженерных конструкций.

Цель данного исследования – изучить гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра с атромбогенным и противомикробным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированных в сонную артерию овцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление биодеградируемых сосудистых протезов

Сосудистые протезы диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из 12% раствора PCL (Sigma-Aldrich, США) в трихлорметане. Электроспиннинг осуществляли на приборе Nanop-01A (MECC, Япония) при следующих параметрах: напряжение на конце иглы – 22 кВ, скорость подачи раствора полимера – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора 150 мм, игла 22 G.

Создание внешнего армирующего слоя сосудистых протезов

Для предупреждения аневризмобразования на внешней поверхности сосудистых протезов был создан армирующий спиралевидный каркас, который изготавливали из поликапролактона (PCL) молекулярной массой 90 000 Да (Sigma Aldrich, США) на оригинальной установке, состоящей из каретки с экструдером и вращающегося вала, в следующем режиме: скорость вращения вала – 1 об/с, скорость движения каретки – 1 мм/с, скорость подачи пластика – 0,5 мм/с (сопло экструдера – 0,5 мм), температура подачи волокна – 160 °С [13].

Формирование лекарственного покрытия на поверхности сосудистых протезов

Для предупреждения тромбообразования и инфицирования поверхность сосудистых протезов модифицировали лекарственными препаратами. На первом этапе формировали гидрогелевое покрытие из 10% поливинилпирролидона (PVP, PanReac AppliChem, Испания) в 25% этиловом спирте. После протезы в стеклянные пробирках, заполненных аргоном, облучали ионизирующим излучением с общей поглощенной дозой 15 кГр с использованием импульсного линейного ускорителя ИЛУ-10 с энергией пучка 5 МэВ 50 кВТ (производитель – ИЯФ им. Г.И. Будкера СО РАН, Россия). Данная процедура

обеспечила прививку PVP к поверхности PCL за счет радиационно-химического сшивания полимеров. Радиальные центры возникают на поверхности PCL и в структуре нанесенного PVP-слоя в результате ионизирующего воздействия, что приводит к трехмерному сшиванию PVP и его связыванию с поверхностью полимерного графта [18]. Параллельно с прививкой PVP прошла стерилизация трубчатых каркасов протезов.

На втором этапе методом комплексообразования с PVP вводили антиагрегант – илопрост (Ио, Берлимед Са, Испания) и катионный амфифил 1,5-бис-(4-тетрадецил-1,4-диазониабцикло[2.2.2]октан-1-ил) пентан тетрабромид (А, ООО «Нанотех-с», Новосибирск), обладающий антимикробными и противовирусными свойствами [5].

Качество прививки оценивали ранее методом ИК-спектроскопии, анализируя спектры ИК НПВО внутренней поверхности модифицированных протезов на приборе Bruker Vertex 80v (Германия) с приставкой ATR (Германия) в спектральной области $4000\text{--}5000\text{ см}^{-1}$ [19]. Подтверждение образования покрытия из PVP на поверхности протезов, а также оценка кинетики высвобождения лекарственных препаратов, присоединенных методом комплексообразования к слою PVP, сформированному на поверхности протезов, были проведены нами ранее [19].

Оценка физико-механических свойств биodeградируемых сосудистых протезов

Оценку физико-механических свойств протезов PCL/PVP/Ио/А с внешним армирующим каркасом проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75. В качестве группы сравнения использовали аналогичные протезы без армирующего каркаса. Испытания проведены на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), с использованием тензодатчика номинальной нагрузки 50 Н с пределом допустимой погрешности $\pm 1\%$, скорость подъема траверсы при испытании 50 мм/мин, при температуре окружающей среды $37\text{ }^\circ\text{C}$, поддерживаемой термокамерой. Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при одноосном растяжении (МПа) до разрушения. Упруго-деформативные свойства материала оценивали с помощью модуля Юнга (МПа). Полученные данные экспортировали как отношение относительного удлинения (мм) к напряжению (МПа), претерпеваемому образцом.

Имплантация биodeградируемых сосудистых протезов в сонную артерию овец

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ № 12 от 10.06.2020 г. Работа с животными соответствовала требованиям приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003, «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986), Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (1996).

Сосудистые протезы PCL/PVP/Ио/А ($n = 12$) с внешним армирующим каркасом были имплантированы в сонную артерию овец эдильбаевской породы методом «конец в конец» по схеме: 1 животное – 1 протез. Диаметр протезов составил 4 мм, длина – 40 мм. Срок имплантации составил 6 месяцев. Имплантация протезов и анестезиологическое сопровождение осуществлялось по схеме, приведенной ниже.

Премедикация крупных лабораторных животных производилась ксилазином (Ксиланит) 0,05–0,25 мл с расчетом на 10 кг массы животного и внутримышечным введением 1 мг атропина. Вводный наркоз производился 5–7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд, затем внутривенно вводился атракурия безилат (Риделат), в дозировке 0,5–0,6 мг на 1 кг массы животного. Интубация трахеи овцы – эндотрахеальной трубкой диаметром 9,0. В процессе проведения манипуляций по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы, поддержание наркоза шло на севоране 2–4 об% и риделате – путем непрерывной инфузии со скоростью 0,3–0,6 мг/кг/ч. Параллельно проводился мониторинг жизненных показателей животного: артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), уровня кислорода в крови (SpO_2). Фиксировались показатели при искусственной вентиляции легких (ИВЛ): частота дыхания (ЧД) – 12–15/мин, конечно-экспираторное давление (РЕЕР) 7–9 mbar, дыхательный объем (ДО) 6–8 мл/кг, фракция кислорода во вдыхаемой смеси (FiO_2) – 40–60%.

Для осуществления доступа к сонной артерии овцы проводилась внутривенная системная гепаринизация – 5000 ЕД, с пережатием сонной артерии. Затем производился продольный разрез сонной артерии длиной 40 мм. Непосредственно имплантация

сосудистых протезов осуществлялась отдельными узловыми швами нитью Prolene 6/0 (Ethicon, США). После снятия зажимов с сонной артерии следовали стандартному протоколу профилактики воздушной эмболии с последующим запуском кровотока и ушиванием раны нитью Vicril 2,0 (Ethicon, США). В заключение операции проводилась обработка шва клеем БФ-6, подкожное введение эноксапарина натрия в концентрации 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл и экстубация животного.

Для оценки проходимости имплантированных протезов проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с функцией Допплера на аппарате M 7 Premium (Mindray, Китай) на следующих сроках: 1-е, 5-е сутки, 1, 3 и 6 месяцев.

Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы сосудистых протезов фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum, Россия) в течение суток, затем обезживали в 6 порциях IsoPrep (BioVitrum, Россия) и пропитывали парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 мин в каждой порции. Пропитанные образцы заливали в тугоплавкий парафин ГИСТОМИКС (BioVitrum, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США). Далее их подсушивали в термостате в течение ночи при 37 °С, затем депарафинизировали в 3 порциях о-ксилола в течение 1–2 мин в каждой и дегидратировали в 3 порциях 96% спирта по 1–2 мин. Далее депарафинированные срезы были окрашены гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону и ализариновым красным С, в соответствии с ранее отработанными протоколами окрашивания [19]. Полученные препараты срезов сосудистых протезов исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе АХЮ Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива $\times 50$.

Иммунофлуоресцентное исследование

Эксплантированные сосудистые протезы для иммунофлуоресцентного окрашивания замораживали при температуре -140 °С. Далее замороженные образцы фиксировали в криосреде Tissue-Tek (Sakura, Япония) и изготавливали срезы толщиной 8 мкм на криостате CryoStar NX50 (Thermo Scientific, США). Затем проводили не прямое флуоресцентное окрашивание срезов с использованием специфических антител к CD31, фактору фон Виллебранда (vWF), α -актину гладкомышечных клеток, коллагену III,

IV типа (Abscam, Англия). Ядра клеток контрастировали DAPI (Sigma, США). Контрольные образцы готовили аналогично опытным, но вместо первичных антител использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина. Препараты заключали в монтирующую среду ProLong (Life Technologies, США) под покровное стекло и анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Определение уровня мРНК

Для получения эндотелиального лизата с эксплантированных участков нативных артерий и проходимых сосудистых протезов проводили смыв внутреннего эндотелиального слоя лизирующим реагентом TRIzol (Invitrogen, США). Образцы помещали в TRIzol реагент с последующей гомогенизацией (FastPrep-24 Instrument and Lysing Matrix S, MP Biomedicals, США). Качество и количество выделенной РНК определяли на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США) посредством измерения индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). На основе выделенной РНК синтезировали кДНК с использованием набора для обратной транскрипции High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Экспрессию генов определяли методом кПЦР с использованием мастермикса БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2 \times) (MHR033-2040, «Биолабмикс», Россия) и праймеров, синтезированных компанией «Евроген» на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Характеристика генов, включенных в исследование, представлена в табл. 1. Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и выражали в виде кратного изменения относительно нативных сонных артерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-механические свойства протезов

Была проведена сравнительная оценка физико-механических свойств протезов PCL/PVP/По/А до и после формирования внешнего армирующего слоя в продольном и поперечном направлениях. Показатели, полученные в продольном направлении, также были сравнены с аналогичными показателями сонной артерии овцы. Доказано, что формирование на внешней поверхности протезов PCL/PVP/По/А арми-

рующего слоя в виде спирали из поликапролактона способствовало повышению прочности сосудистых протезов в продольном и поперечном направлениях, но при этом в 2 раза увеличивалась жесткость протезов в поперечном направлении, что является нежелательным моментом для подобных изделий (табл. 2). Тем не менее критичное отличие полимерных сосудистых протезов от показателей сонной артерии овцы имело место лишь по Модулю Юнга, который

у протезов PCL/PVP/По/А с армирующей внешней спиралью и без таковой превысил значения модуля Юнга сонной артерии овцы (в продольном направлении) в 13,3 и 17,4 раза соответственно, $p < 0,05$.

В наших предыдущих работах было доказано, что в отличие от немодифицированных сосудистых протезов на основе поликапролактона спектр модифицированных PVP-протезов содержал полосу при 1654 см^{-1} , соответствующую группе $-\text{CONH}_2$ пирро-

Таблица 1

Характеристика праймеров
Characteristics of primers

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>IL1B</i>	5'-TGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	5'-ACCCAAGGCCACAGGAATCTT-3'
<i>IL6</i>	5'-TGTCATGGAGTTGCAGAGCAGT-3'	5'-CCAGCATGTCAGTGTGTGTGG-3'
<i>IL10</i>	5'-ATGCCACAGGCTGAGAACCA-3'	5'-TCGCAGGGCAGAAAACGATG-3'
<i>IL12A</i>	5'-GCAGAAGGCCAGACAAACCC-3'	5'-TGGAAGCCAGGCAACTCTCA-3'
<i>IL12B</i>	5'-AGAGCCTGCCATTGAGGTC-3'	5'-GGTTCTTGGGTGGGTCTGGT-3'
<i>CXCR4</i>	5'-CTGGAGAGCAAGCGGTTACCA-3'	5'-ACAGTGGGCAGGAAGATCCG-3'
<i>CXCL8</i>	5'-CTTCCAAGCTGGCTGTTGCTC-3'	5'-ATTTGGGGTGGAAAGGTGTGG-3'
<i>IFNG</i>	5'-TGAACGGCAGCTCTGAGAAAC-3'	5'-TGGCGACAGGTCATTATCA-3'
<i>TNF</i>	5'-CTTCTGCCTGCTGCACTTCG-3'	5'-TGGCTACAACGTGGGCTACC-3'
<i>ICAM1</i>	5'-GTCACGGGGAACAGATTGTAGC-3'	5'-TGAGTTCTTCACCCACAGGCT-3'
<i>NOS3</i>	5'-CTTCCGTGGTTGGGCAAAGG-3'	5'-CGTTTCCAGCTCCGTTTGGG-3'
<i>FGF2</i>	5'-AGAGCGACCCCTCACATCAAAC-3'	5'-TCAGTGCCACATACCAACTGGA-3'
<i>VEGFA</i>	5'-GCTTCTGCCGTCCTATTGAG-3'	5'-ATGTGCTGGCTTTGGTGAGG-3'
<i>TGFB1</i>	5'-TGAGCCAGAGGCGGACTACT-3'	5'-ACACAGGTCAGGCACTGCT-3'
<i>KDR</i>	5'-ACAGAACCAAGTTAGCCCCATC-3'	5'-TCGCTGGAGTACACAGTGGTG-3'
<i>MMP2</i>	5'-ACCCCGCTACGGTTTTCTCG-3'	5'-ATGAGCCAGGAGCCCGTCTT-3'
<i>NR2F2</i>	5'-GCAAGCGTTTTGGGACCTT-3'	5'-GGACAGGTAGGAGTGGCAGTTG-3'
<i>SNAI2</i>	5'-ACCCTGGTTACTGCAAGGACA-3'	5'-GAGCCCTCAGATTGGACCTG-3'
<i>YAP1</i>	5'-TGCTTCGGCAGGAATTAGCTCT-3'	5'-GCTCATGCTCAGTCCGCTGT-3'
<i>CXCL1</i>	5'-AACATGCAGAGCGTGAAGGTG-3'	5'-CGGGGTGAGACACACTTCCT-3'
<i>CD14</i>	5'-AATCAAGGCTCTGCGCGTTC-3'	5'-CGTTGGGCCAGTTACCTCCA-3'
<i>CD40LD</i>	5'-ACTGAGAGCTGCAAACACCCA-3'	5'-AAACACCGAAGCACCTGTT-3'
<i>CNN</i>	5'-CCAACCACACGCAAGTGCAG-3'	5'-TCCTGCTTCTCCGCGTATTTCA-3'
<i>CTSB</i>	5'-AGTGTGGGGACGGCTGTAAC-3'	5'-AGGGAGGGATGGAGTACGGT-3'
<i>CXCL1</i>	5'-AACATGCAGAGCGTGAAGGTG-3'	5'-CGGGGTGAGACACACTTCCT-3'
<i>CXCL10</i>	5'-AGTACCTTCAGTTGCAGCACCA-3'	5'-TGGGCAGGATTGACTTGCAG-3'
<i>EDN1</i>	5'-GCGACAGTCCACAGGAAGAGA-3'	5'-GGTTGTCCCAGGCTTTCTCC-3'
<i>EDNRA</i>	5'-AGGAACGGCAGCCTGAGAAT-3'	5'-AGGGAACCAGCACAGAGCAA-3'
<i>IL1A</i>	5'-TGACCTGGAAGCCATTGCCA-3'	5'-TGAGGGCGTCGTTTCAGGATG-3'
<i>IL4</i>	5'-GGCGTATCTACAGGAGCCACA-3'	5'-ACTCGTCTTGGCTTCATTACACA-3'
<i>IL18</i>	5'-AGGAAGCTATTGAGCACAGGCAT-3'	5'-CTGATTCCAGGTCTTCGCCAT-3'
<i>KLF4</i>	5'-AGGACGGCCACTCACACTTG-3'	5'-ACTTCCACCCACAGCCATCC-3'
<i>MIF</i>	5'-TGCCGATGTTCTGTTGTTGAA-3'	5'-GGTCATGAGCTGGTCTGGGA-3'
<i>SELE</i>	5'-CACTGGACCCCAAGCACTTACA-3'	5'-GCTGATGGCTGCACAGGTTAC-3'
<i>SELP</i>	5'-TTCCACTGCGCTGAAGGGTA-3'	5'-TGGACTGGTGTGGAATGCT-3'
<i>PAI</i>	5'-GCAGTGGCAGCAGGAACAAA-3'	5'-TGGTGCTGGTAGGAGGCAGA-3'
<i>SMAD4</i>	5'-TCTGGAGGAGATCGTTTTGCT-3'	5'-TTCCAAGTGCACACCTTTGCC-3'
<i>B2M</i>	5'-CCTTCTGTCCACGCTGAGT-3'	5'-TGGTGCTGCTTAGAGGTCTCG-3'
<i>ACTB</i>	5'-AGCAAGAGAGGCATCCTGACC-3'	5'-GGCAGGGGTGTTGAAGGTCT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TGGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	5'-AGGGGTCATTGATGGCAACG-3'

лидонового кольца, что подтверждает прививку PVP к поверхности сосудистого протеза [19].

Косвенным доказательством устойчивости привитого к поверхности PVP при его контакте с водной фазой свидетельствовала динамика выхода лекарственных препаратов, соединенных методом комплексообразования с привитым PVP. В частности, доказано, что илопрост способен выделяться в раствор фосфатно-солевого буфера в течение 3 месяцев. Катионный амфифил в виде фосфатной соли молекулярного иона $C_{41}H_{84}Br_3N_4^+$ также сохранялся на поверхности протезов, инкубированных в течение 3 месяцев в фосфатно-солевом буфере [19]. При этом катионный амфифил определялся в неизменном виде

на поверхности протезов, хранившихся в течение 6 месяцев при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$ [19].

Результаты имплантации PCL/PVP/По/A-протезов

Процедура формирования PCL-внешнего армирующего каркаса, соответствующая оригинальному протоколу метода послойного наплавления, не привела к ухудшению визуальных и хирургических свойств сосудистого протеза: прилегающее полимерное волокно не деформировало стенку изделия и в то же время не отслаивалось от него (рис. 1, а), что позволило в процессе имплантации протеза в сонную артерию овцы методом «конец в конец» захватить

Таблица 2

Механические свойства полимерных трубчатых каркасов PCL/PVP/По/A до и после создания внешнего армирующего слоя (продольное и поперечное направление)

Mechanical properties of PCL/PVP/По/A tubular polymeric scaffolds before and after creation of an external reinforcing layer (longitudinal and transverse direction)

	n	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
PCL/PVP/По/A	6	0,98 (0,79–1,13)	285,0 (166,2–392,9)**	8,54 (6,04–15,87)**
PCL/PVP/По/A с внешним армирующим слоем	6	1,35 (1,29–1,39)*	201,2 (128,1–232,3)*	6,5 (5,54–11,09)**
Сонная артерия овцы		1,2 (1,06–1,9)	158,5 (126,0–169,5)	0,49 (0,39–0,66)
Поперечное направление, Ме (25–75%)				
PCL/PVP/По/A	6	1,24 (1,13–1,31)	28,43 (20,64–38,45)	9,62 (8,84–10,49)
PCL/PVP/По/A с внешним армирующим слоем	6	2,43 (2,2–2,87)*	30,83 (28,66–34,60)	20,62 (17,58–23,04)*

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно сосудистых протезов PCL/PVP/По/A без внешнего армирующего слоя; ** – $p < 0,05$ относительно сонной артерии овцы (продольное направление).

Note. * – $p < 0.05$ relative to PCL/PVP/По/A vascular grafts with no external reinforcing layer; ** – $p < 0.05$ relative to sheep carotid artery (longitudinal direction).

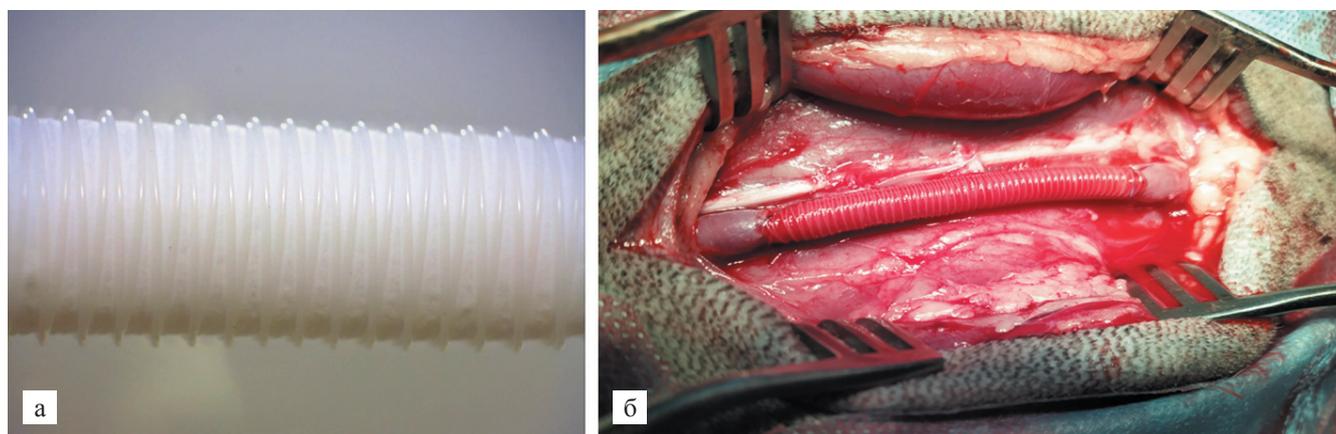


Рис. 1. PCL/PVP/По/A-протез: а – стереомикроскопия протеза с антианевризматическим каркасом, $\times 10$; б – протез, имплантированный в сонную артерию овцы

Fig. 1. PCL/PVP/По/A vascular graft: a – prosthesis stereomicroscopy with an anti-aneurysmal scaffold, magnification 10x; б – prosthesis implanted in a sheep carotid artery

крайние армирующие нити в непрерывный микрохирургический шов для обеспечения надежности комплекса «протез + артерия» и предупреждения отслаивания армирующего каркаса от основы изделия (рис. 1, б).

Результаты ультразвукового исследования

По результатам УЗИ на 1-е и 5-е сутки после имплантации PCL/PVP/По/А-протезов отмечена 100% проходимость. Скорость кровотока в данный период варьировала от 120,35 до 153,43 см/с. Через 1 месяц после имплантации проходимость составила 83,3%, однако к 3-му снизилась до 50,0% с сохранением данного процента проходимых протезов спустя 6 месяцев после имплантации, до крайнего срока наблюдения в 6 месяцев. УЗИ-мониторинг не выявил развития аневризмообразования и стенозов в стенках протезов, а также отслойки внешнего армирующего каркаса (рис. 2).

Результаты исследования эксплантационных сосудистых протезов

Спустя 6 месяцев эксперимента в момент эксплантации при осуществлении доступа в зону с имплантированным протезом отмечено, что на каждом из них сформировалась умеренно васкуляризованная соединительно-тканная капсула с отчетливой визуализацией сохранного внешнего PCL-каркаса. Аневризм, стенозов либо иных значимых деформаций протезов не обнаружено. Очаги воспаления отсутствовали (рис. 3).

По результатам эксплантации и дальнейшего поперечного рассечения PCL/PVP/По/А-протезов констатировано отсутствие тромбов в просвете 50% экспантированных протезов. Непроходимые протезы содержали в себе сероватый тромб по всей площади и протяжению изделия (рис. 3, б). Проходимые протезы были упруги, пристеночных тромбов не обнаружено, анастомозы представляли собой плавное соединение протеза с артерией с сохранением диаметра кровеносного сосуда (рис. 3, в). Визуально

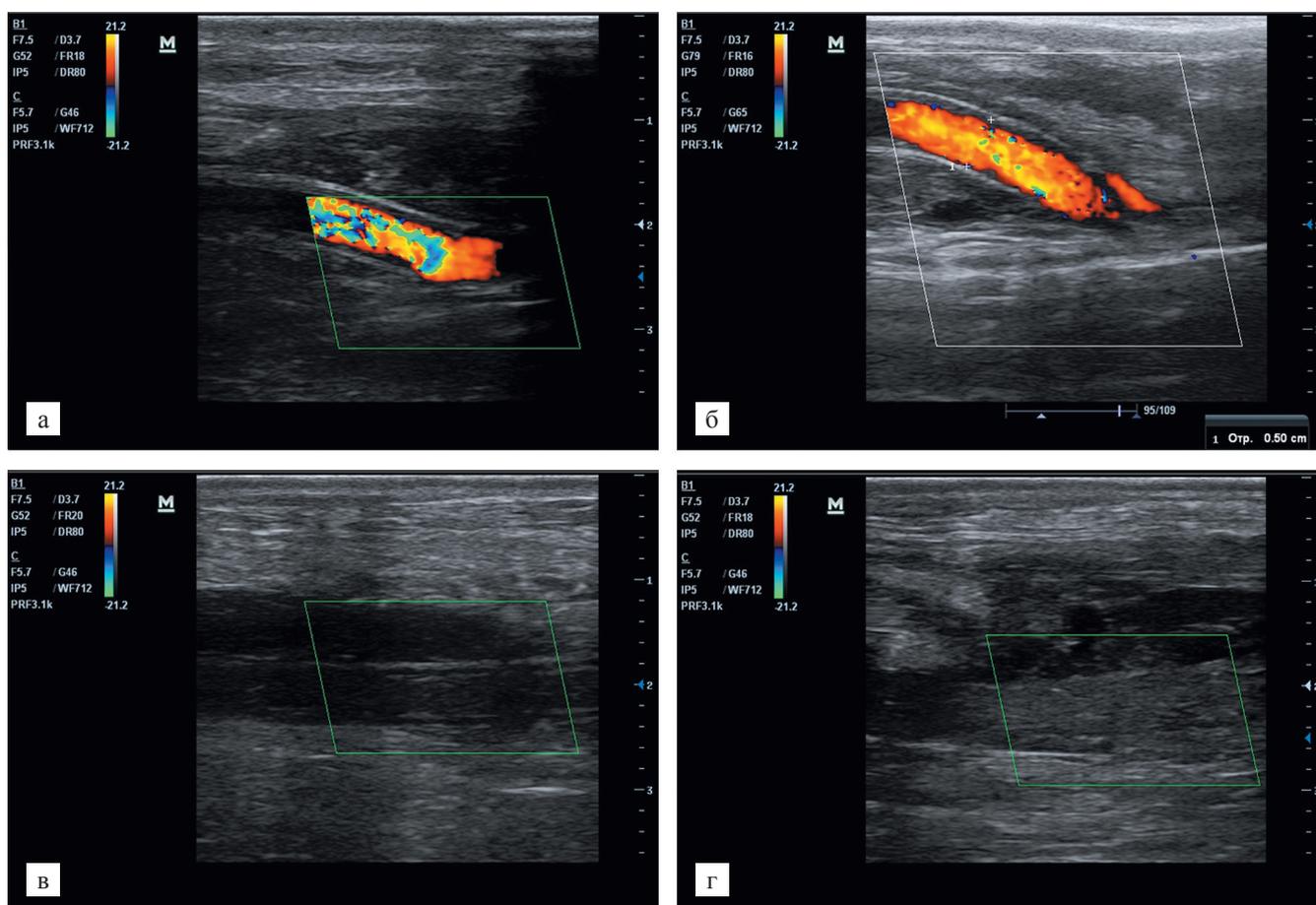


Рис. 2. Результаты УЗИ-мониторинга проходимости PCL/PVP/По/А-протезов на разных сроках имплантации в сонную артерию овцы. Проходимые протезы: а – 5 суток; б – 6 месяцев. Тромбированные протезы: в – 5 суток; г – 6 месяцев

Fig. 2. Results of ultrasound monitoring of the patency of PCL/PVP/По/А vascular grafts at different periods of implantation in a sheep carotid artery. Patent grafts: а – 5 days; б – 6 months. Thrombosed grafts: в – 5 days; г – 6 months

проходимые протезы после 6 месяцев функционирования в составе сосудистого русла соответствовали нативной артерии овцы: середина протеза и комплекс «протез + артерия» поддерживали круглый сосудистый просвет; толщина ремоделированной стенки изделия была сопоставима с толщиной стенки артерии (рис. 3, в, г).

Результаты гистологического исследования

На основании результатов гистологического исследования проходимых PCL/PVP/Ио/А-протезов спустя 6 месяцев после имплантации в сонную артерию овцы выявлено, что трубчатая полимерная основа изделия практически полностью биодеградировала с формированием на своей базе новообразованной трехслойной сосудистой ткани (рис. 4). Вновь созданная сосудистая стенка состояла из неоинтимы толщиной от 81 до 146 мкм, неомедии толщиной от 198 до 232 мкм и неоадвентиции толщиной от 144 до 217 мкм. В совокупности измерений стенка ремоделированного сосуда составила 423–595 мкм,

что сопоставимо со значениями толщины нативной сонной артерии овцы (320–430 мкм). Со стороны сосудистого просвета неоинтимы покрыта монослоем вытянутых эндотелиоподобных клеток. Структурную основу неомедии представляли клетки, по морфологии схожие с гладкомышечными (см. рис. 4). Скопления клеток обрамляли коллагеновые волокна. Также в данном слое обнаружены разрозненные мелкие скопления бесструктурных полимерных масс, окруженные единичными гигантскими многоядерными клетками инородного тела, макрофагами и фибробластоподобными клетками. *Vasa vasorum* преимущественно выявляли вдоль границы с неоадвентицией. Последняя представляла собой внешний слой новообразованной ткани, которая напоминала структуру адвентиции артерии овцы и была сформирована коллагеновыми тяжами с частичным наполнением фибробластоподобными и гигантскими многоядерными клетками (рис. 4). Признаки воспаления и кальцификации стенки проходимых протезов отсутствовали.

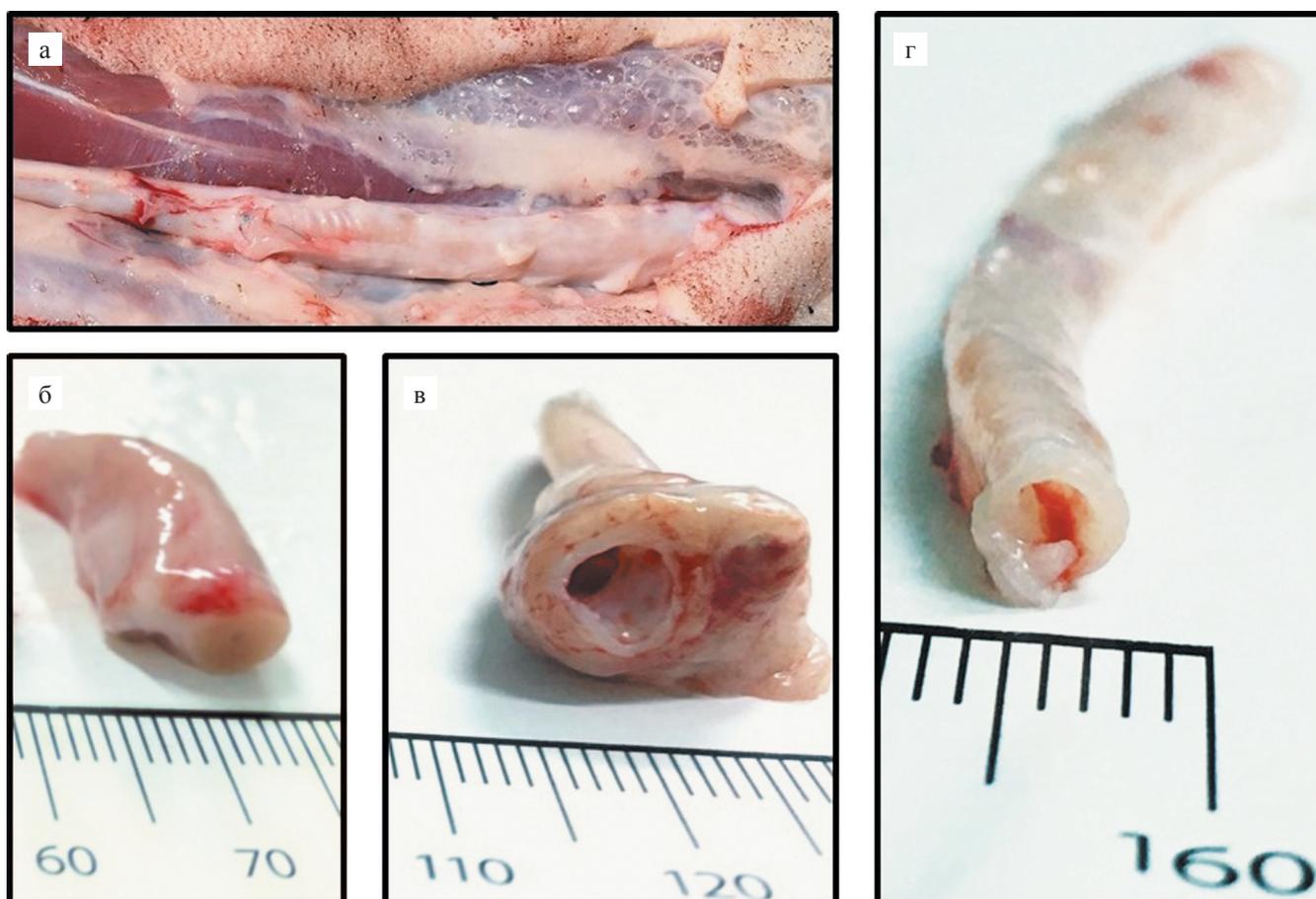


Рис. 3. Макрофотография эксплантированных PCL/PVP/Ио/А-протезов: а – PCL/PVP/Ио/А-протез в момент эксплантации; б – тромбированный протез; в – проходимый протез; г – интактная сонная артерия овцы

Fig. 3. Macro photograph of explanted PCL/PVP/Io/A vascular grafts: а – PCL/PVP/Io/A graft at the moment of explantation; б – thrombosed graft; в – patent graft; г – intact sheep carotid artery

Полимерная основа тромбированных PCL/PVP/По/A-протезов также практически полностью деградировала спустя 6 месяцев после имплантации без отложения кальциевых элементов и воспалительной инфильтрации. Данные протезы отличались наличием утолщенной васкуляризованной соединительнотканной капсулы.

Важно отметить высокую сохранность внешнего обмоточного каркаса как в непроходимых, так и в проходимых протезах: визуализированы неразвитые PCL-нити округлой формы в поперечной проекции, окруженные коллагеновой капсулой без признаков кальцификации.

Результаты иммунофлуоресцентного исследования

Иммунофлуоресцентное исследование explantированных проходимых PCL/PVP/По/A-протезов подтвердило результаты гистологического исследования – формирование непрерывного эндотелиального слоя на внутренней поверхности протеза (рис. 5). Функциональность эндотелиальных клеток была продемонстрирована наличием фактора фон Виллебранда. На стенке протеза формировалась неоинтима типичного строения, которая состояла из клеток, положительных при окраске на α -актин гладкомышечных клеток, и содержала коллагены III и IV типов. Также большое количество коллагена

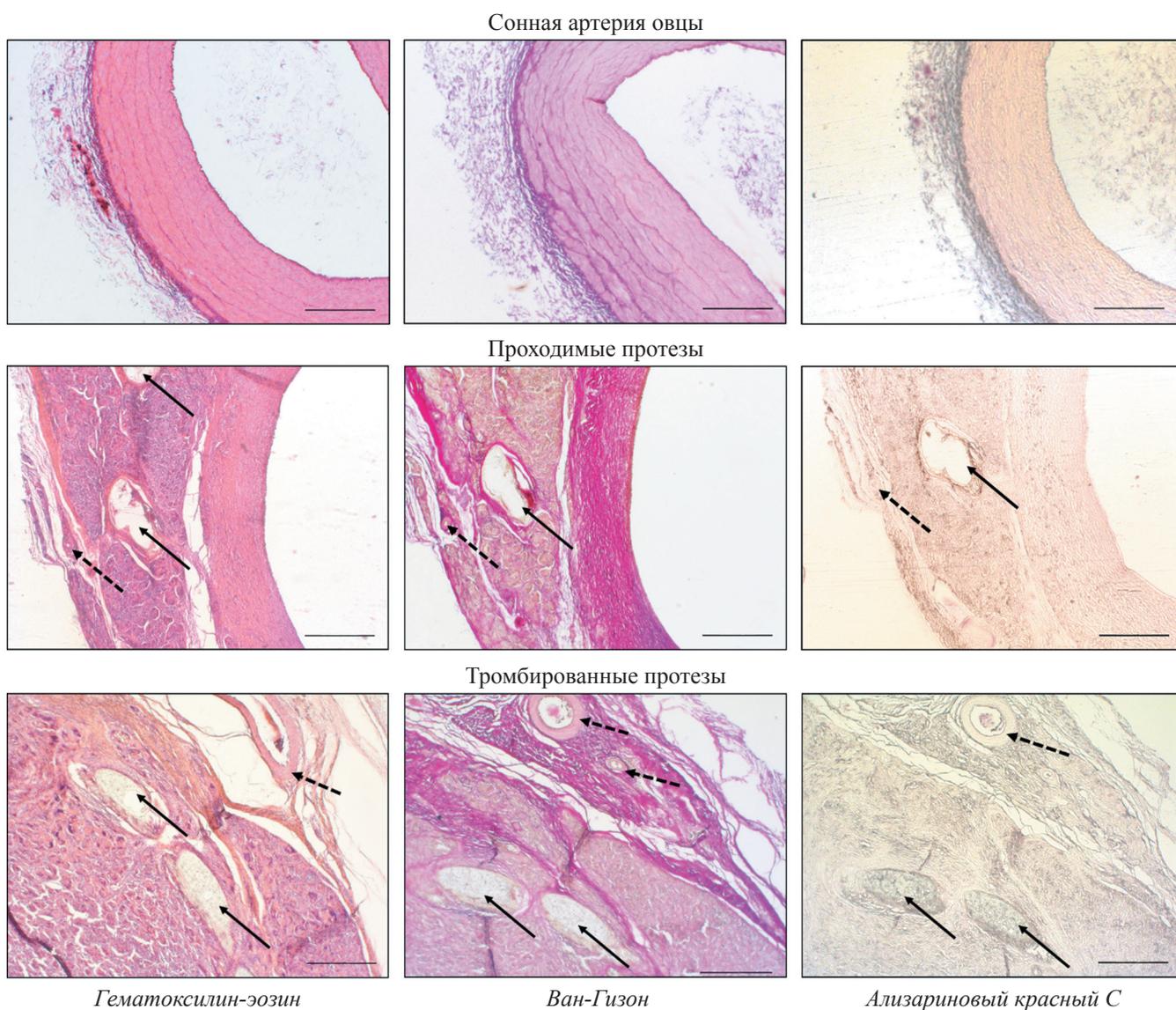


Рис. 4. Результаты гистологического исследования explantированных образцов PCL/PVP/Ilo/A-протезов спустя 6 месяцев после имплантации: сплошная стрелка – PCL-тяги усиленного каркаса; пунктирная стрелка – *vasa vasorum*. Масштабная линейка – 500 мкм

Fig. 4. Results of histological examination of explanted samples of PCL/PVP/Ilo/A vascular grafts at 6 months of implantation: solid arrow, PCL-strands of reinforced scaffold; dotted arrow, *vasa vasorum*. Scale bar 500 μ m

III и IV типов выявлено в субэндотелиальном слое. Стенка протеза активно заселялась клетками. В толще стенки присутствовали небольшие комплексы из клеток CD31⁺, α -актин⁺ и vWF⁺, что может указывать на формирование в стенке протеза капилляров. Также в стенке протеза наблюдали большое количество коллагенов III и IV типов (рис. 5).

Результаты изучения профиля геной экспрессии

Сравнительный анализ уровня мРНК в эндотелиальном лизате и гомогенате проходимых ремоделированных PCL/PVP/По/A-протезов спустя 6 месяцев после имплантации показал, что новообразованная сосудистая ткань на месте биодеградируемого сосудистого протеза имела отличия от генетических характеристик нативных тканей сонной артерии овец. Гены, обнаруженные в эндотелиальном лизате, были разделены на три группы по уровню изменения экспрессии: повышенный уровень – *IL6* (в 4,93 раза), *TNFA* (в 5,52 раза), *CTSB* (в 2,40 раза), *SMAD4* (в 2,63 раза); пониженный уровень – *ICAM1*, *FGF2*, *TGFB*, *MIF1*, *IL18*, *CNN*, *CXCL1*, *CXCL10*, *IL4*, *SELP*, *KLF4*; неизменный уровень – *IL1B*, *IL10*, *IL8*, *IL12A*,

VEGF, *CXCR4*, *NR2F2*, *SNAI2*, *YAP1*, *KDR*, *MMP2*, *CD14*, *CD40L*, *EDN*, *PAI*, *SELE*.

Для новообразованной ткани отмечена гиперэкспрессия следующих генов в гомогенате: *IL10* (в 2,83 раза), *CXCL8* (в 4,56 раза), *TNF* (в 17,95 раза), *CXCR4* (в 13,42 раза), *TGFB* (в 6,06 раза), *CTSB* (в 2,05 раза). Снижение уровня мРНК в сравнении с тканью нативной сонной артерии овец отмечено для генов: *IL6*, *VEGF*, *NR2F2*, *SNAI2*, *ICAM1*, *YAP1*, *FGF2*, *MIF1*, *IL18*, *CD14*, *CD40L*, *EDN*, *IL4*, *SELE*, *SELP*, *SMAD4*, *KLF4*, *EDNRA* (табл. 3).

Ремоделирование проходимых PCL/PVP/По/A-протезов за 6 месяцев после имплантации охарактеризовано экспрессией генов со значительным изменением уровня мРНК, которые являются ключевыми маркерами с позиции таких процессов биологии эндотелия, как воспаление (*IL6*, *IL4*, *CXCL8*, *IL10*, *TNFA*, *CD40L*, *CXCL1*, *CXCL10*, *MIF1*), эндотелиально-мезенхимальный переход (*SNAI2*), эндотелиальная дифференцировка (*VEGF*) и эндотелиальная механотрансдукция (*YAP1*, *KLF4*), адгезия лейкоцитов (*SELE*, *SELP*). Стоит отметить, что некоторые важные маркеры тканевого ремоделирования также были связаны с выраженным изменением уровня

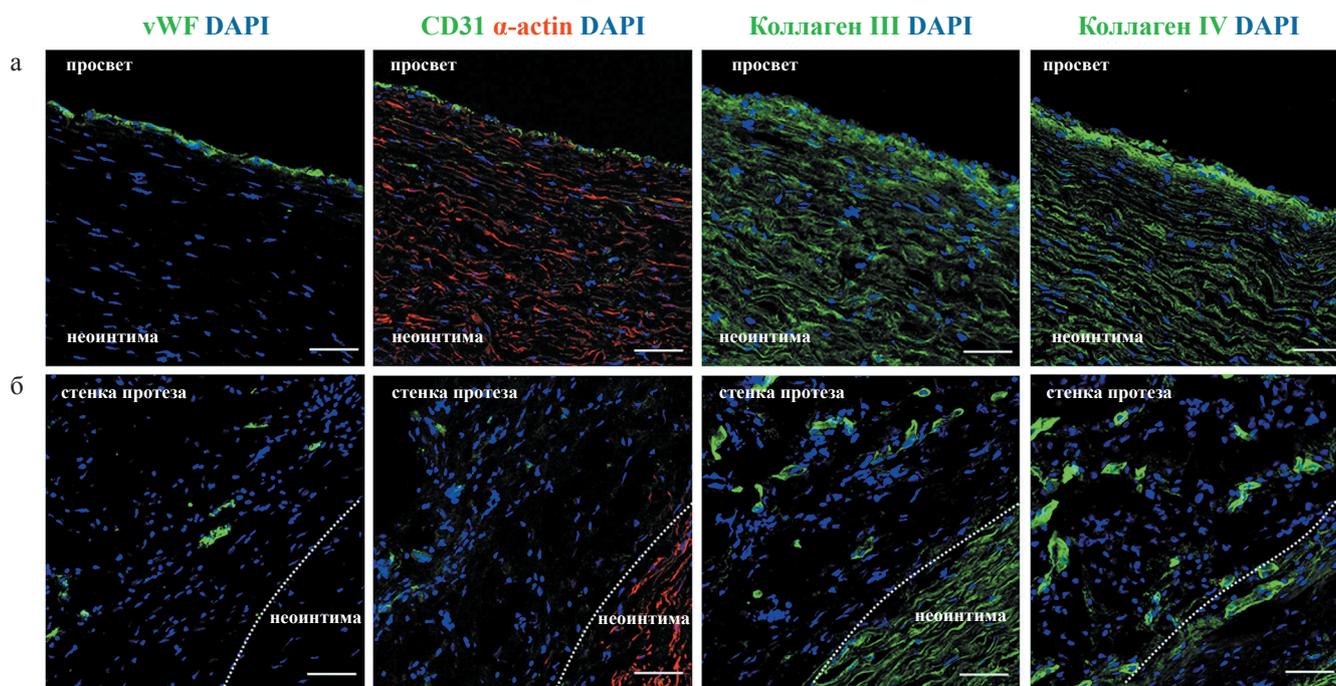


Рис. 5. Результаты конфокальной микроскопии сосудистых протезов PCL/PVP/По/A с антианевризматической обмоткой спустя 6 месяцев после имплантации: окраска специфичными флуоресцентными антителами на фактор фон Виллебранда (vWF, зеленый), CD31 (эндотелиальные клетки, зеленый), α -актин гладкомышечных клеток (α -actin, красный), коллаген III типа (зеленый), коллаген IV типа (зеленый). Ядра клеток контрастировали DAPI (синий); а – неоинтима и просвет протеза; б – стенка протеза. Масштабная линейка – 50 мкм

Fig. 5. Confocal microscopy of PCL/PVP/По/A vascular grafts with anti-aneurysmal winding at 6 months of implantation: staining with specific fluorescent antibodies for von Willebrand factor (vWF, green), CD31 (endothelial cells, green), α -actin of smooth muscle cells (α -actin, red), collagen type III (green), collagen type IV (green). Cell nuclei were contrasted with DAPI (blue); а – prosthesis neointima and lumen; б – prosthesis wall. Scale bar 50 μ m

Таблица 3

Кратность изменения экспрессии генов в эндотелиальном лизате и гомогенате проходимых сосудистых протезов относительно интактных сонных артерий овец**Multiplicity of gene expression changes in endothelial lysate and homogenate of patent vascular grafts relative to intact sheep carotid arteries**

Ген	Кодируемый белок	Гомогенат	Эндотелиальный лизат
<i>IL1B</i>	Interleukin-1 beta	0,58	0,65
<i>IL4</i>	Interleukin-4	0,11	0,37
<i>IL6</i>	Interleukin-6	0,27	4,93
<i>IL10</i>	Interleukin-10	2,83	0,71
<i>CXCL8</i>	Interleukin-8	4,56	1,99
<i>IL12A</i>	Interleukin-12A	0,97	1,57
<i>IL18</i>	Interleukin-18	0,2	0,5
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	17,95	5,52
<i>CXCL1</i>	Growth-regulated alpha protein	0,88	0,06
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine	0,08	0,16
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor A	0,27	1,17
<i>CXCR4</i>	C-X-C chemokine receptor type 4	13,42	1,41
<i>NR2F2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2	0,14	0,75
<i>SNAI2</i>	Snai2	0,22	1,71
<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1	0,36	0,35
<i>YAP1</i>	Yes-associated protein 1	0,005	0,68
<i>KDR</i>	Vascular endothelial growth factor receptor 2	0,84	1,06
<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2	0,014	0,18
<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2	1,71	1,82
<i>TGFB</i>	Transforming growth factor beta-1	6,06	0,45
<i>MIF1</i>	Macrophage migration inhibitory factor	0,43	0,27
<i>CTSB</i>	Cathepsin B	2,05	2,40
<i>CD14</i>	Monocyte differentiation antigen CD14	0,41	1,35
<i>CD40L</i>	CD40 ligand	0,21	1,24
<i>CNN</i>	Calponin-1	0,03	0,42
<i>EDNI</i>	Endothelin-1	0,24	1,12
<i>PAI1</i>	Plasminogen activator inhibitor type 1	0,56	0,64
<i>SELE</i>	Selectin E	0,33	0,55
<i>SELP</i>	P-selectin	0,45	0,29
<i>SMAD4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4	0,30	2,63
<i>KLF4</i>	Kruppel-like factor 4	0,40	0,09

мРНК: молекула межклеточной адгезии (*ICAM*), маркер гладкомышечных клеток (*CNN*), молекула TGFb сигнального пути (*SMAD4*, *TGFb*), фактор роста фибробластов (*FGF2*) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая клиническая потребность направляет исследовательские усилия на создание альтернативных сосудистых шунтов малого калибра. При разработке таких искусственных функционально активных сосудистых протезов необходимо основываться на характеристиках целевых нативных кровеносных сосудов с точки зрения локуса имплантации. Конструкция такого изделия должна поддерживать требуемый кровоток, выдерживая давление током крови, не испытывая при этом механических повреждений. Кроме того, структура внутренней поверхности про-

теза должна предупреждать тромбообразование. Многие функции кровеносных сосудов обусловлены структурными компонентами различных сосудистых слоев на биомолекулярном уровне, поэтому необходимо обеспечить правильное ремоделирование искусственного каркаса сосудистого протеза для полного воспроизведения сосудистой ткани на его основе. Особое внимание стоит уделить решению проблемы микробного обсеменения пористой конструкции сосудистого протеза. Поэтому включение в состав эффективного антибактериального агента местного действия необходимо для предупреждения инфекции.

Формирование антианевризматической защиты на внешней поверхности сосудистых протезов из поликапролактона способствовало повышению прочности протезов в продольном и поперечном

направлениях, но повлекло двукратное увеличение жесткости протезов в поперечном направлении, что является стандартным, но нежелательным моментом для полимерных изделий.

Результаты собственного исследования PCL/PVP/По/А-протезов с антимикробным покрытием и внешней армирующей спиралью, имплантированных в сонную артерию овец, продемонстрировали 50% проходимость через 6 месяцев после имплантации. Данные протезы при эксплантации визуально соответствовали нативной артерии овцы; тромбы, аневризмы, воспаление и другие деформации отсутствовали. Стоит отметить высокую сохранность внешней PCL-спирали, что позволяет предположить успешное выполнение ее каркасной функции по предупреждению аневризмобразования при еще более длительных сроках имплантации. Аналогичные результаты по проходимости, развитию несостоятельности стенки протеза были получены M. Ahmed et al., которые имплантировали нанокompозитный сосудистый протез в сонную артерию овец на 9 месяцев [20].

Гистологические методы позволили детально установить успешность ремоделирования стенки проходимых сосудистых протезов и характеристики окружающих тканей. Внутренняя поверхность эксплантированных образцов представляла собой неоинтиму с непрерывным слоем зрелых функционально активных эндотелиальных клеток. Средний слой состоял из гладкомышечноподобных клеток, коллагеновых волокон и *vasa vasorum*. Внешний слой был представлен неоадвентицией. Признаков воспаления и кальцификации в новообразованной ткани не выявлено. Данные протезы обладали морфологической синхронизацией процессов биodeградации и ремоделирования своей стенки.

Несмотря на структурное сходство между новообразованной сосудистой и нативной тканью, выявленное в результате гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания, сравнительный анализ профиля генной экспрессии выявил некоторые отличия по их генетическому профилю. Особое внимание в полученных результатах заслуживает ген *CNN*, кодирующий белок кальпонин и являющийся маркером гладкомышечных клеток, для которого получено значительное снижение экспрессии гена в неоткани ремоделированных протезов, что согласуется с данными протеомного профилирования, полученными нами ранее [19]. Кроме того, как в эндотелиальном лизате, так и в гомогенате наблюдалось увеличение экспрессии гена *CTSB*, кодирующего лизосомальный белок катепсин В, что может указывать на хроническое воспаление [21].

Увеличение уровня воспалительных транскриптов (*TNF α*), а также трансформирующего фактора

роста (*TGF β*) в гомогенатах ремоделированных протезов может быть связано с процессом биорезорбции полимерного каркаса клетками ретикуло-гистоцитарной системы, что является известным механизмом резорбции биodeградируемых полимеров. Наряду с этим стоит отметить значительное снижение экспрессии гена *SNAI2*, который кодирует специфический транскрипционный фактор, обеспечивающий смену эндотелиального фенотипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканеинженерные сосудистые протезы малого диаметра с атромбогенным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированные в сонную артерию овцы на 6 месяцев, продемонстрировали гармоничное ремоделирование стенки протеза. Выявленные генетические отличия новообразованной сосудистой ткани от нативной вполне ожидаемы ввиду ее полного формирования с нуля на базе искусственного матрикса. Гистологическое сходство говорит о том, что полученный темп ремоделирования стенки протеза удовлетворителен для успешного функционирования в составе кровеносного русла разработанного изделия. Дальнейшие исследования требуют усовершенствования внутренней поверхности сосудистого протеза с целью повышения тромборезистентности.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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.
2. Diener H, Hellwinkler O, Carpenter S, Avellaneda AL, Debus ES. Homografts and extra-anatomical reconstructions for infected vascular grafts. *J Cardiovasc Surg.* 2014; 55: 217–223. PMID: 24796916.
3. Gordon TN, Kornmuller A, Soni Y, Flynn LE, Gillies ER. Polyesters Based on Aspartic Acid and Poly(Ethylene Glycol): Functional Polymers for Hydrogel Preparation.

- Eur Polym J.* 2021; 152: 110456. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110456.
4. Guan G, Yu C, Xing M, Wu Y, Hu X, Wang H et al. Hydrogel Small-Diameter Vascular Graft Reinforced with a Braided Fiber Strut with Improved Mechanical Properties. *Polymers (Basel)*. 2019; 11 (5): 810. doi: 10.3390/polym11050810.
 5. Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci M et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomater.* 2014; 10 (1): 11–25. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.022.
 6. Matsuzaki Y, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang Yu-Ch, 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.
 7. Montini-Ballarina F, Calvo D, Caracciolo PC, Rojo F, Frontini PM, Abraham GA et al. Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts. 2016. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 60: 220–233. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.01.025.
 8. Blum KM, Zbinden JC, Ramachandra AB, Lindsey SE, Szafron JM, Reinhardt JW et al. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth. *Commun Med (Lond)*. 2022; 2: 3. doi: 10.1038/s43856-021-00063-7.
 9. Mrówczyński W, Mugnai D, de Valence S, Tille JC, Khabiri E, Cikirikcioglu M et al. Porcine carotid artery replacement with biodegradable electrospun poly-ε-caprolactone vascular prosthesis. *J Vasc Surg.* 2014; 59 (1): 210–219. doi: 10.1016/j.jvs.2013.03.004. PMID: 23707057.
 10. Zhao L, Li X, Yang L, Sun L, Mu S, Zong H et al. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts *in vivo*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021; 118: 111441. doi: 10.1016/j.msec.2020.111441. PMID: 33255034.
 11. Matsuzaki Y, Miyamoto Sh, 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.
 12. Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shoji T, Shinoka T. Heparin-Eluting Tissue-Engineered Bioabsorbable Vascular Grafts. *Appl Sci.* 2021; 11: 4563. doi: 10.3390/app11104563.
 13. Fang Z, Xiao Y, Geng X, Jia L, Xing Y, Ye L et al. Fabrication of heparinized small diameter TPU/PCL bi-layered artificial blood vessels and *in vivo* assessment in a rabbit carotid artery replacement model. *Biomater Adv.* 2022; 133: 112628. doi: 10.1016/j.msec.2021.112628. PMID: 35527159.
 14. Berard X, Puges M, Pinaquy JB, Cazanave C, Stecken L, Bordenave L et al. *In vitro* evidence of improved antimicrobial efficacy of silver and triclosan containing vascular grafts compared with rifampicin soaked grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019; 57 (3): 424–432. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.08.053. PMID: 30301647.
 15. Clarke J, Shalhoub J, Das SK. Ceramic gentamicin beads in vascular graft infection – a cautionary note. *Vasc Endovascular Surg.* 2013; 47 (1): 76–77. doi: 10.1177/1538574412465970. PMID: 23154662.
 16. Bisdas T, Beckmann E, Marsch G, Burgwitz K, Wilhelmi M, Kuehn C et al. Prevention of vascular graft infections with antibiotic graft impregnation prior to implantation: *in vitro* comparison between daptomycin, rifampin and nebacetin. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012; 43 (4): 448–456. doi: 10.1016/j.ejvs.2011.12.029. PMID: 22264589.
 17. Кривкина ЕО, Миронов АВ, Шабает AP, Великанова ЕА, Ханова МЮ, Синицкая АВ и др. Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биодеградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2023; 38 (1): 152–159. Krivkina EO, Mironov AV, Shabaev AR, Velikanova EA, Khanova MYu, Sinitskaya AV et al. Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2023; 38 (1): 151–159. [In Russ.] doi: 10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159.
 18. Burkert S, Schmidt T, Gohs U, Dorschner H, Arndt K-F. Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry.* 2007; 76: 1324–1328. doi: 10.1016/j.radphyschem.2007.02.024.
 19. Antonova L, Kutikhin A, Sevostianova V, Lobov A, Repkin E, Krivkina E et al. Controlled and Synchronised Vascular Regeneration upon the Implantation of Iloprost and Cationic Amphiphilic Drugs-Conjugated Tissue-Engineered Vascular Grafts into the Ovine Carotid Artery: A Proteomics-Empowered Study. *Polymers.* 2022; 14: 5149. doi: 10.3390/polym14235149. PMID: 36501545.
 20. 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.
 21. Fan Y, Pei J, Li X, Qin Y, Xu Y, Ke M et al. Construction of tissue-engineered vascular grafts with high patency by mimicking immune stealth and blocking TGF-β mediated endothelial-to-mesenchymal transition. *Composites Part B: Engineering.* 2023; (251): 110487. doi: 10.1016/j.compositesb.

Статья поступила в редакцию 09.12.2023 г.
The article was submitted to the journal on 09.12.2023