

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-1-172-182

ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЗАПЛАТ ИЗ ПОЛИУРЕТАНА И КСЕНОПЕРИКАРДА НА ПРИМЕРЕ КРУПНОЙ ЖИВОТНОЙ МОДЕЛИ

Е.А. Сенокосова, Е.С. Прокудина, Р.А. Мухамадияров, Е.А. Великанова, Е.О. Кривкина, А.В. Миронов, Е.С. Сардин, Л.В. Антонова

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

Цель: провести сравнительную оценку особенностей ремоделирования заплат из полиуретана (ПУ) и бычьего перикарда (БП), имплантированных на 6 месяцев в сонную артерию овцы. **Материалы и методы.** Синтетические матрицы изготавливали из 12% раствора ПУ в хлороформе методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC, Япония). Для сравнения использовали биологические матрицы из БП коммерческого производства (Кем-Периплас Нео, ЗАО «Неокор», Россия). Матрицы имплантировали в виде сосудистых заплат в сонные артерии овцам ($n = 3$). Срок имплантации составил 6 месяцев. Прокходимости артерий с имплантированными сосудистыми протезами оценивали методом ультразвукового исследования. После эксплантации образцы матриц изучали с помощью гистологического исследования, сканирующей электронной микроскопии и конфокальной микроскопии с предварительной окраской специфическими флюоресцентно мечеными антителами. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8. **Результаты.** Через 6 месяцев имплантации матриц из ПУ и БП в стенку сонной артерии овец выявлена полная проходимость сосудов без аневризматических расширений, значимых стенозов и гематом. ПУ-матрикс отличился менее выраженной соединительно-тканной капсулой и отсутствием гиперплазии неоинтимы, толщина ремоделированной ПУ-стенки составила 731,2 (711,5; 751,3) мкм. Одновременно выявлена гиперплазия неоинтимы БП, толщина которой составила 627 (538; 817) мкм, а толщина ремоделированной стенки – 1723 (1693; 1772) мкм. Эндотелизация и структурная сохранность ПУ-матрикса были выше в сравнении с БП. **Заключение.** ПУ-матрикс – новый эффективный материал для сосудистой реконструкции, доказавший способность к гармоничному ремоделированию, биоинертности и структурную сохранность в условиях кровотока в исследовании *in vivo* на овцах. За счет высоких эластических свойств и долговечности ПУ интересен как монокомпонент, так и в составе композитного материала, пригодного для создания изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Ключевые слова: полиуретан, заплата для артериальной реконструкции, сосудистый протез, ксеноперикард, электроспиннинг, сонная артерия.

FEATURES OF POLYURETHANE AND XENOPERICARDIAL PATCH REMODELING USING A LARGE ANIMAL MODEL AS AN EXAMPLE

E.A. Senokosova, E.S. Prokudina, R.A. Mukhamadiyarov, E.A. Velikanova, E.O. Krivkina, A.V. Mironov, E.S. Sardin, L.V. Antonova

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

Objective: to compare the remodeling features of polyurethane (PU) and bovine pericardium (BP) patches that have been implanted in a sheep carotid artery for 6 months. **Materials and methods.** Synthetic matrices were fabricated from a 12% PU solution in chloroform by electrospinning on a Nanon-01A machine (MECC, Japan). Biological matrices made from commercially produced PU (Kem-Periplas Neo, CJSC Neocor, Russia) were used

Для корреспонденции: Сенокосова Евгения Андреевна. Адрес: 650002, Кемерово, б-р акад. Л.С. Барбараша, 6. Тел. (951) 611-60-76. E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

Corresponding author: Evgeniya Senokosova. Address: 6, Bul'var Barbarasha, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Phone: (951) 611-60-76. E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

for comparison. The matrices were implanted as vascular patches into sheep carotid arteries ($n = 3$). Implantation period was 6 months. Via ultrasound scan, the patency of arteries bearing the implanted vascular prostheses was evaluated. After removal, the matrix samples were studied by histological examination, scanning electron microscopy and confocal microscopy. Prior to this, they had been stained with specific fluorescently labeled antibodies. The GraphPad Prism 8 application was used to process statistical data. **Results.** The sheep carotid artery wall was completely patent, with no aneurysmal dilatations, significant stenoses, and hematomas six months after the PU and BP matrices were implanted. The PU matrix was distinguished by a less pronounced connective-tissue capsule and no neointima hyperplasia; the thickness of the remodeled PU wall was 731.2 (711.5; 751.3) μm . At the same time, there was BP neointimal hyperplasia with a thickness of 627 (538; 817) μm and a remodeled wall thickness of 1723 (1693; 1772) μm . In comparison to BP, the PU matrix exhibited greater endothelialization and structural integrity. **Conclusion.** An *in vivo* study on sheep demonstrated the potential of PU matrix, a novel and effective material for vascular reconstruction, to maintain harmonious remodeling, bioinertness and structural integrity when in contact with blood. Due to its excellent elastic qualities and durability, PU is interesting both as a monocomponent and as a component of a composite material that can be used to create products for the needs of cardiovascular surgery.

Keywords: polyurethane, arterial patch, vascular prosthesis, xenopericardium, electrospinning, carotid artery.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующие позиции среди причин смертности и инвалидизации населения во всем мире [1]. Атеросклеротическое поражение кровеносных сосудов является одним из наиболее распространенных заболеваний, также активно затрагивающее сонные артерии с развитием стенозов разной степени [2–5]. «Золотым стандартом» хирургического лечения гемодинамически значимого стеноза сонных артерий является ангиопластика, предполагающая иссечение участка сосуда с атеросклеротической бляшкой и закрытие разреза первичным швом или сосудистой заплатой. В качестве заплаты применяются аутологичные сосуды или коммерческие лоскуты (децеллюляризованный перикард крупного рогатого скота, подслизистая оболочка тонкого кишечника свиньи – SIS, политетрафторэтилен – PTFE, полиэтилентерефталат – Dacron), однако они имеют ряд недостатков, часто не позволяющих добиться эффективного лечения на всю жизнь и требующих повторной операции по замене заплаты.

Аутологичные сосуды (большая подкожная вена голени, верхняя щитовидная артерия) являются лучшей основой для заплаты, так как они обладают полной биосовместимостью без иммунной реакции, а также устойчивы к тромбозу и рестенозу. Однако их использование сопряжено с дополнительным хирургическим вмешательством у пациента и может быть ограничено наличием сосудистых заболеваний, недостаточным размером пригодного участка для имплантации [6, 7]. Несмотря на широкое использование, ксеноперикардальный лоскут имеет серьезный недостаток – применение цитотоксичного глутарового альдегида, выступающего в роли стабилизирующего сшивающего агента при обработке материала. Предварительная подготовка такого лоскута

подразумевает многократную отмывку по протоколу, что не является 100% гарантией предотвращения попадания токсичного вещества в организм. Помимо этого, глутаровый альдегид провоцирует кальцификацию [8]. Поэтому в настоящее время развиваются различные способы обработки и консервации ксеноматериала [9, 10]. Клинические испытания SIS в качестве заплаты показали минимальное кровотечение при имплантации, но при этом происходило образование псевдоаневризм уже через 6 месяцев. Выявлен дисбаланс деградации заплаты и синтеза новообразованной ткани, что может непредсказуемо повлиять на целостность SIS [11]. Полимерные заплаты имеют ряд выигранных характеристик. Расширенный PTFE имеет пористую структуру, низкую тромбогенность и способен поддерживать эндотелизацию. Dacron обладает высокой прочностью и устойчивостью к избыточному растяжению [7]. Однако сообщается, что при имплантации PTFE требуется больше времени для гемостаза, а в отдаленном периоде отмечаются случаи гемодинамически значимого и ипсилатерального инсультов [12, 13]. Использование заплаты Dacron ассоциировано с риском воспалительной реакции на инородное тело, инфекции, периоперационным комбинированным инсультом, транзиторной ишемической атакой и рестенозом [14–16].

Создание нового материала для ангиопластики, способного поддерживать долгосрочную проходимость реконструированного кровеносного сосуда с минимизацией рисков рестенозов, аневризм, деструктивных изменений и воспалительной реакцией – актуальная задача. Методы тканевой инженерии позволяют получать материалы на натуральной и синтетической основе, обладающие биомиметической структурой.

Для создания такого материала мы остановили свой выбор на полиуретане (ПУ) медицинского назначения (TесоFlex). ПУ представляют собой класс полимеров с подходящими для наших задач свойствами: высокой прочностью на разрыв, эластичностью и устойчивостью к изгибу; износостойкостью; малым радиусом перегиба у трубчатых конструкций; устойчивостью к воздействию микробов и гидролизу; био- и гемосовместимостью [17]. ПУ уже стали неотъемлемой частью в изготовлении элементов медицинского инструмента, а также при создании имплантируемых изделий [18, 19]. При *in vitro* и *in vivo* исследованиях ПУ не было выявлено признаков его биодegradации [20–22]. Мы ожидаем, что устойчивость к деградации обеспечит структурную стабильность ПУ-матрикса при remodelировании в условиях функционирования в составе сосудистого бассейна и предупредит аневризмообразование.

Согласно литературным данным, овцы считаются оптимальной крупной животной моделью для преclinical испытаний тканеинженерных изделий для сердечно-сосудистой хирургии, с помощью которой можно оценить проходимость, эндотелизацию, тромборезистентность и аневризмообразование в локации имплантации [23].

В данном исследовании 3D пористый нетканый матрикс на основе 12% ПУ имплантировали в сонную артерию овцы в качестве заплаты на длительный срок – 6 месяцев – для оценки его проходимости и remodelирования. В роли материала сравнения выступил коммерческий лоскут из бычьего перикарда (БП), который используется при ангиопластике в НИИ КПССЗ и ГБУЗ «КККД».

Благодаря данному исследованию станет возможным установление пригодности использования ПУ в создании изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Цель исследования – оценить особенности remodelирования сосудистых заплат из синтетического полиуретана (ПУ) и сравнить с бычьим перикардом (БП) при имплантации в сонную артерию овцы на 6 месяцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление матриксов

Матрикс изготавливали из 12% раствора синтетического полиуретана (ПУ, Tесоflex EG-80A; Lubrizol Advanced Materials, США) в хлороформе (Вектон, Россия) методом электроспиннинга на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония) при следующих параметрах: напряжение 20 кВ, скорость вращения коллектора 200 об/мин, скорость подачи раствора 0,5 мл/ч, время очистки иглы 30 с.

Для сравнения использовали биологические матриксы из бычьего перикарда коммерческого производства (Кем-Периплас Нео, ЗАО «Неокор», Россия).

Имплантация матриксов в сонную артерию овец

Операции по имплантации синтетических и биологических матриксов в качестве сосудистых заплат выполняли на самках овец эдильбаевской породы. Масса каждого животного в среднем составила 42–45 кг. Операции проводили последовательно в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Работа одобрена локальным этическим НИИ КПССЗ (протокол № 6 от 4 мая 2023 года).

Матрикс из ПУ и БП имплантировали в сонную артерию овцам на 6 месяцев (n = 3, по 1 образцу на каждую разновидность заплат). Размер имплантированных заплат 4×40 мм.

Операции выполняли у животных под общим наркозом. Анестезиологическое пособие, интраоперационное медикаментозное ведение и послеоперационное медикаментозное сопровождение осуществляли в соответствии с протоколами, описанными ранее [24]. В процессе оперативного вмешательства проводили мониторинг следующих показателей: АД, ЧСС, SpO₂. ИВЛ: ЧД – 12–15/мин, РЕЕР 7–9 mbar, ДО 6–8 мл/кг, FiO₂ – 40–60%.

Основной этап имплантации включал доступ к сонной артерии, системное введение гепарина 5000 ЕД в/в, пережатие сонной артерии, продольную артериотомию длиной до 40,0 мм. Матрикс размером 40,0×4,0 мм вшивали узловыми швами в аортотомический дефект с использованием нити Prolene 6/0 (Ethicon, США). Кровоток запускали в соответствии со стандартным протоколом профилактики воздушной эмболии. Хирургическую рану ушивали нитью Vicril 2,0 (Ethicon, США). Шов обрабатывали клеем БФ, подкожно вводили эноксапарин натрия 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл; экстубировали животное.

Оценка проходимости сосудов с имплантированными матриксами

Прижизненную проходимость сонных артерий с имплантированными матриксами у овец оценивали методом ультразвукового исследования с помощью портативной переносной системы цветной доплерографии премиум-класса M7 (Mindray, Китай) через 1 и 5 суток после операции, далее – 1 раз в 2 месяца

вплоть до предполагаемого срока вывода животного из эксперимента (6 месяцев).

Сканирующая электронная микроскопия

Эксплантированные образцы матриц из ПУ и БП с прилежащим участком сонной артерии фиксировали в 10% водном растворе формалина (рН 7,4, БиоВитрум, Россия). Далее постфиксацию, обезвоживание спиртами и окраску эксплантатов уранил-ацетатом проводили согласно методике, описанной ранее [25]. Окрашенные образцы заплат заливали в эпоксидную смолу Epon (Electron Microscopy Science, США). Эпоксидные блоки шлифовали и полировали на установке TegraPol-11 (Struers, США). После этого образцы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и напыляли углерод толщиной 10–15 нм с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Структуру поверхности изучаемых образцов визуализировали в обратно-рассеянных электронах на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Гистологическое исследование образцов

Подготовка эксплантированных образцов ПУ и БП матриц для гистологического исследования проводилась в соответствии с методикой, описанной ранее [26]. После процедуры депарафинизации часть полученных срезов окрашивали гематоксилином Гарриса (БиоВитрум, Россия, Новосибирск) и эозином (БиоВитрум, Россия, Новосибирск) с последующей отмывкой в проточной воде, фиксацией в 96% спирте и просветлением в о-ксилоле. Коллагенизацию исследуемых образцов оценивали по методу Ван-Гизона: последовательная окраска препаратов гематоксилином Вейгерта (БиоВитрум, Россия, Новосибирск) и пикрофуксином (БиоВитрум, Россия, Новосибирск). Присутствие кальция идентифицировали после окраски срезов ализариновым красным С (Химсервис, Россия) и ядерным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). Далее срезы заливали монтирующей средой «Витрогель» (БиоВитрум, Россия, Новосибирск) и исследовали с помощью микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 100$, $\times 200$.

Конфокальная микроскопия

Для иммунофлюоресцентного исследования изготавливали срезы из замороженных эксплантированных образцов с использованием криотома (Microm HM 525, Thermo Scientific), которые затем фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин и проводили их пермеабиллизацию раствором Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Изготовленные срезы окрашивали специфическими первичными кроличьими антителами к CD31 (Abcam, Великобритания) и мышинными антителами

к α -актину гладкомышечных клеток (Abcam, Великобритания); кроличьими антителами к фактору фон Виллебранда (vWF, Abcam, Великобритания); кроличьими антителами к коллагену IV типа (Abcam, Великобритания) и мышинными антителами к коллагену I типа (Abcam, Великобритания); кроличьими антителами к коллагену III типа (Novus Biologicals, США). Инкубацию срезов с первичными антителами проводили 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. После каждого этапа окрашивания срезы тщательно промывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0,1% Tween (Sigma-Aldrich, США). От автофлюоресценции избавлялись обработкой срезов Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, США) по методике производителя. Ядра клеток окрашивали красителем DAPI (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ данных

Статистический анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me), 25–75% перцентилей (Q1; Q3). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты имплантации ПУ-матрикса в сонную артерию овцы

По результатам УЗИ, спустя 6 месяцев имплантации ПУ-матрикса сонная артерия была полностью проходима; значимых аневризматических расширений, стенозов и гематом не обнаружено (рис. 1, а, б). Скорость кровотока в сосуде с заплатой составила 75 см/с.

При визуальном осмотре в момент доступа к сонной артерии овцы состояние имплантированного ПУ-матрикса соответствовало результатам УЗИ. Участок имплантации был умеренно окутан соединительнотканной капсулой без признаков воспаления. Имплантированная заплатка не имела значимых структурных изменений и аневризматических расширений. Макроскопически ПУ-матрикс имел полное сходство со стенкой сонной артерии благодаря полноценной

консолидации с ней и ремоделированию (рис. 1, а–в). Эксплантат был мягким и упругим.

При поперечном разрезе сонной артерии с имплантированной заплатой установлено, что ПУ-матрикс способен поддерживать круглый просвет в комплексе со стенкой сосуда (рис. 1, г). Стенка матрикса не имела гиперплазии неоинтимы и соответствовала по толщине стенке сонной артерии.

Гистологическое исследование показало, что ПУ-матрикс сохраняет структурную целостность без признаков воспаления и кальцификации как в толще заплаты, так и в окружающих тканях, что свидетельствует о низкой скорости резорбции материала и его высокой биосовместимости (рис. 2, а–г). Толщина ПУ-матрикса составила 343,3 (331,3; 361,2) мкм. С внутренней поверхности сосуда в проекции имплантированной заплаты сформировалась неоинтима, толщина которой составила 191,4 (164,3; 289,2) мкм. Снаружи заплата покрыта вновь образованной адвентицией, толщина которой составила 192,2 (164,0; 289,2) мкм. Параметры нативной сонной артерии овцы: интима 20,14 (16,32; 22,70) мкм; медиа 530,1 (517,2; 547,7) мкм; адвентиция 202,6 (190,6; 212,7) мкм.

Таким образом, ремоделирование имплантированного ПУ-матрикса в условиях кровотока развивалось с формированием неоинтимы и неоадвентиции. Совокупная толщина стенки сосуда с заплатой (731,2 (711,5; 751,3) мкм) спустя 6 месяцев имплантации

значимо не отличалась от толщины собственной стенки сонной артерии овцы (766,8 (740,4; 791,2) мкм).

При исследовании эксплантированного ПУ-матрикса методом СЭМ подтверждены результаты гистологического исследования: не выявлено гиперплазии неоинтимы, признаков воспаления и кальцификации (рис. 2, д–з). Внутренняя поверхность сосуда в проекции имплантированной заплаты выстлана непрерывным слоем эндотелиоподобных клеток (рис. 2, е). На границе неоинтимы и заплаты присутствовали макрофаги, некоторые из которых способны к миграции в толщу матрикса (рис. 2, ж).

Внешняя сторона матрикса покрыта неоадвентицией, наполненной гистологическими элементами, характерными для адвентициальной оболочки сонной артерии, включая вновь образованные *vasa vasorum* (рис. 2, а, з). При этом поверхность имплантированной заплаты, обращенная к неоадвентиции, обладала признаками частичной биорезорбции: матрикс окружен скоплением гигантских многоядерных клеток инородного тела, в цитоплазме которых имеются единичные отщепленные волокна ПУ (рис. 2, з). В целом клетки моноцитарно-макрофагального ряда и гигантские многоядерные клетки инородного тела встречались только в поверхностных слоях заплаты, в то время как в толще ПУ-матрикса обнаружено лишь небольшое количество клеточных элементов (рис. 2, ж, з).

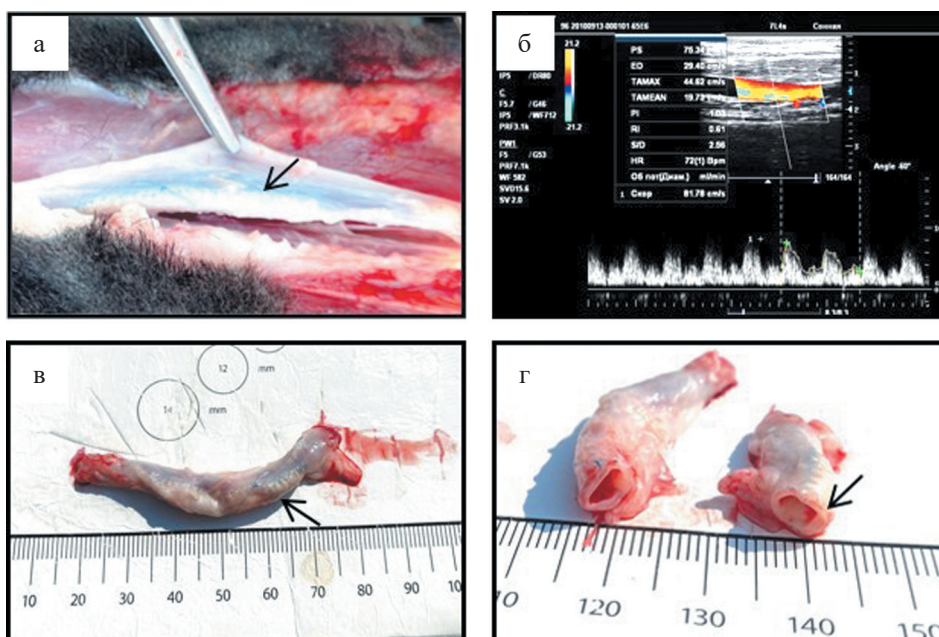


Рис. 1. ПУ-матрикс: а – вид на ПУ-матрикс через 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы; б – УЗИ сонной артерии через 6 месяцев после имплантации ПУ-матрикса; в – эксплантированный ПУ-матрикс с прилежащими участками сонной артерии овцы; г – поперечный срез сонной артерии с имплантированным ПУ-матриксом

Fig. 1. PU matrix: а – view of the PU matrix 6 months after implantation in a sheep carotid artery; б – ultrasound scan image of the carotid artery 6 months after PU matrix implantation; в – explanted PU matrix with neighbouring sections of the sheep carotid artery; г – cross section of the carotid artery with the implanted PU matrix

Анализ результатов иммунофлуоресцентного исследования с последующей конфокальной микроскопией показал присутствие α -актин-продуцирующих гладкомышечноподобных клеток в неоинтима (рис. 3, а). Внутренняя поверхность сосуда в проекции имплантированного ПУ-матрикса выстлана

монослоем зрелых эндотелиальных клеток, синтезирующих фактор фон Виллебранда (рис. 3, б).

Коллаген III и IV типов присутствовал во всех слоях исследуемых срезов (толща ПУ-матрикса, неоинтима, неоадвентиция), однако наибольшее свечение окрашенных белков наблюдалось в облас-

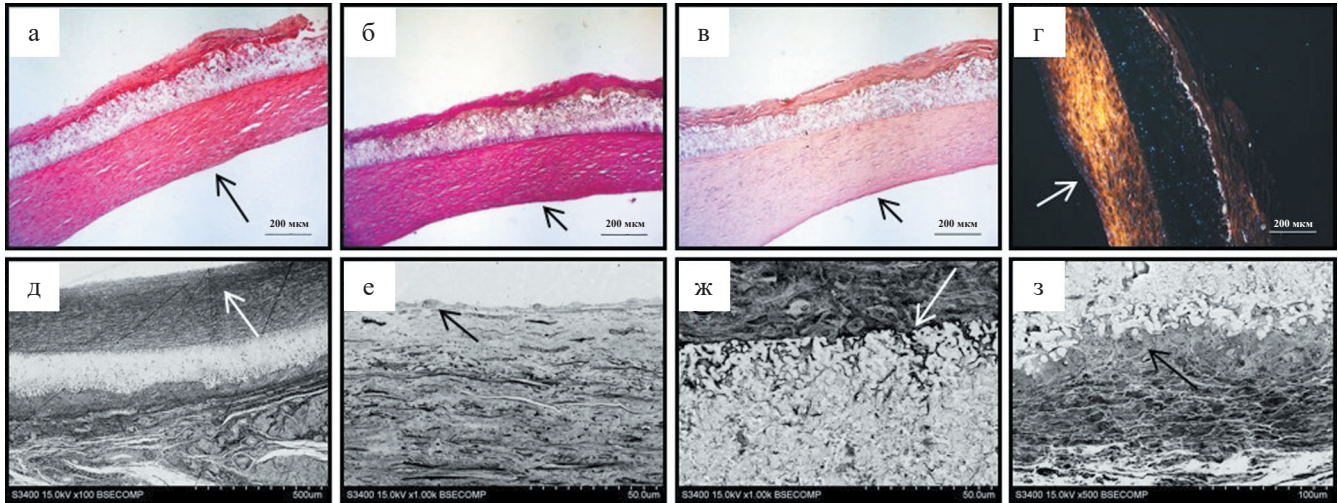


Рис. 2. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии ПУ-матрикса спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы (стрелками белого и черного цвета обозначена неоинтима сосуда): а – общий вид эксплантированного ПУ-матрикса, окр. гематоксилин + эозин, $\times 50$; б – общий вид ПУ-матрикса, окр. по Ван-Гизону, $\times 50$; в – общий вид ПУ-матрикса, окр. ализариновым красным С, $\times 50$; г – общий вид ПУ-матрикса, флуоресцентный снимок, окр. ядер Dapi, $\times 50$; д – общий вид матрикса, $\times 100$; е – неоинтима, $\times 1000$; ж – зона стыка неоинтими сосуда и ПУ-матрикса, $\times 1000$; з – единичные гигантские клетки инородного тела с волокнами ПУ в цитоплазме в зоне прилегания неоадвентиции к матриксу, $\times 500$

Fig. 2. Results of histological examination and scanning electron microscopy of the PU matrix 6 months after implantation into a sheep carotid artery (white and black arrows indicate neointima of the vessel): а – general view of the explanted PU matrix, H&E stain, $\times 50$; б – general view of the PU matrix, Van Gieson's stain, $\times 50$; в – general view of the PU matrix, alizarin red S stain, $\times 50$; г – general view of the PU matrix, DAPI-stained fluorescence image, $\times 50$; д – general view of the matrix, $\times 100$; е – neointima, $\times 1000$; ж – area of junction between vessel neointima and PU matrix, $\times 1000$; з – single foreign-body giant cells with PU fibers in the cytoplasm in the area of contact between the neoadventitia and the matrix, $\times 500$

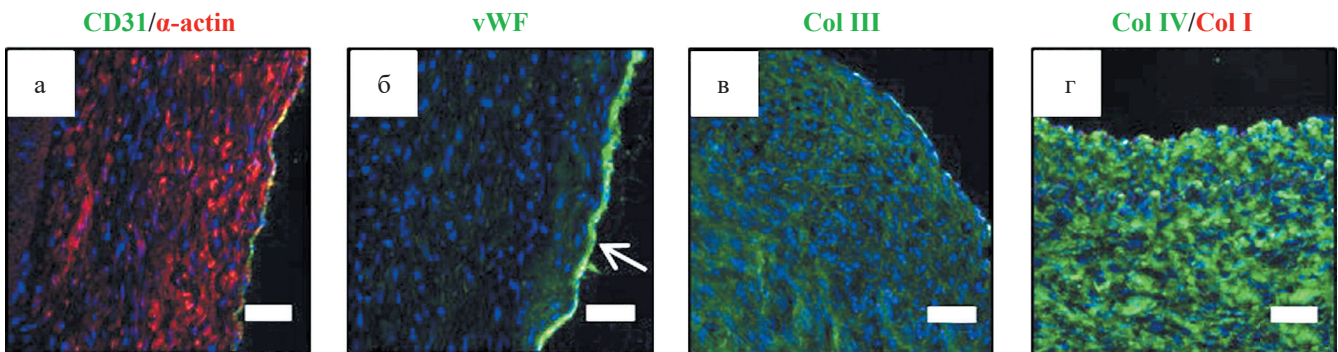


Рис. 3. Результаты иммунофлуоресцентного исследования ПУ-матрикса через 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы, $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм: а – эндотелий на внутренней поверхности (CD31, зеленое свечение), клетки, содержащие α -актин (красное свечение); б – фактор фон Виллебранда (vWF, зеленое свечение); в – коллаген III типа (Col III, зеленое свечение); г – коллаген IV типа (Col IV, зеленое свечение), коллаген I типа (Col I, красное свечение), ядра клеток окрашены DAPI (синее свечение)

Fig. 3. Results of immunofluorescence study of PU matrix 6 months after implantation in a sheep carotid artery, $\times 200$, scale bar 50 μm : а – endothelium on the inner surface (CD31, green glow), alpha actin-containing cells (red glow); б – von Willebrand factor (vWF, green glow); в – collagen type III (Col III, green glow); г – collagen type IV (Col IV, green glow), collagen type I (Col I, red glow), DAPI-stained cell nuclei (blue glow)

ти эндотелия (рис. 3, в, г). Наполненность матрикса клетками была невысокой.

В итоге ремоделирование ПУ-матрикса, имплантированного в сонную артерию овцы на 6 месяцев, привело к формированию трехслойной структуры – тканевого аналога интактной стенки сосуда. Отсутствии признаков преждевременной деградации материала заплаты, кальцификации, воспаления, а также аневризматических и стенотических изменений свидетельствует о высокой биосовместимости ПУ.

Результаты имплантации БП-матрикса в сонную артерию овцы

По данным УЗИ, спустя 6 месяцев после имплантации БП-матрикса в сонную артерию овцы сосуд был полностью проходим, аневризматических расширений, стеноза и значимых гематом не выявлено; скорость кровотока на участке с имплантированной заплатой составила в среднем 67 см/с (рис. 4, а, б).

Визуально в момент доступа к сонной артерии овцы на участке имплантации заплаты не было выявлено значимых структурных изменений, аневризматических расширений и гематом. Васкуляризованная соединительно-тканная капсула равномерно окутывала область имплантированного БП-матрикса (рис. 4, а, в). Эксплантат был упругим, имел плотную структуру.

На поперечном срезе сонной артерии установлено, что имплантированный БП-матрикс способен

поддерживать круглый просвет в комплексе со стенкой сосуда (рис. 4, г). Однако участок с имплантированной заплатой имел большую толщину по сравнению с собственной стенкой артерии, что может являться признаком гиперплазии неоинтимы.

Гистологический анализ эксплантированного БП-матрикса показал сохранность структуры биологической заплаты спустя 6 месяцев ее имплантации (рис. 5, а–г). Вместе с тем выявлены незначительные участки расслоения в толще заплаты, не нарушающие ее общей архитектуры. Признаков кальцификации и воспаления не обнаружено.

Ремоделирование БП-матрикса к концу 6-месячного срока имплантации привело к формированию неоинтимы, толщина которой составила 627 (538; 817) мкм, и неоадвентиции со средней толщиной 540 (504; 540) мкм. Общая толщина стенки сосуда с имплантированным БП-матриksom составила 1723 (1693; 1772) мкм, что почти в 2 раза превысило толщину интактной стенки сонной артерии (869 (833; 875) мкм) и свидетельствует о гиперплазии неоинтимы в проекции заплаты.

Детальное изучение эксплантированного БП-матрикса показало отсутствие признаков воспаления и кальцификации (рис. 5, д–з). Внутренняя поверхность сосуда выстлана рыхлым слоем эндотелиоподобных клеток. Обнаружены единичные участки

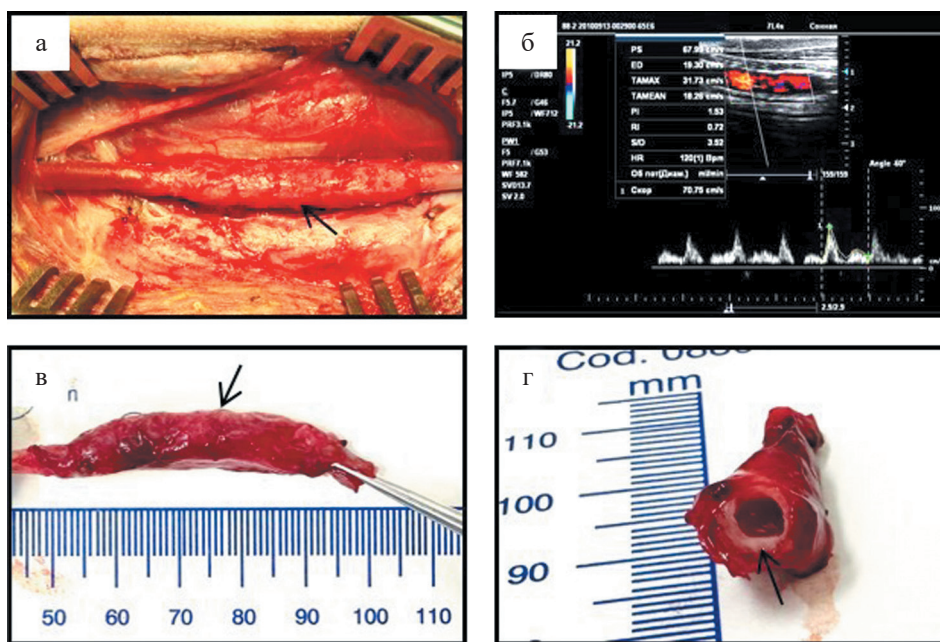


Рис. 4. БП-матрикс: а – вид на БП-матрикс через 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы; б – УЗИ сонной артерии спустя 6 месяцев после имплантации БП-матрикса; в – эксплантированный участок сонной артерии с имплантированным БП-матриksom; г – поперечный срез сонной артерии с имплантированным БП-матриksom

Fig. 4. BP matrix: а – view of the BP matrix 6 months after implantation in a sheep carotid artery; б – ultrasound scan of the carotid artery 6 months after implantation of the BP matrix; в – explanted section of the carotid artery with the implanted BP matrix; г – cross section of the carotid artery with the implanted BP matrix

расслоения в области имплантации БП-матрикса. Неоинтима имела тенденцию к утолщению как в центре заплаты, так и в области анастомозов.

Сам имплантированный ксеноперикардиальный лоскут сохранял волокнистую структуру, характерную для бычьего перикарда. Клеточность заплаты невысокая, однако на границе с неоадвентицией

встречались единичные гигантские клетки инородного тела.

Анализ результатов иммунофлюоресцентного окрашивания эксплантированного БП-матрикса показал наличие плоских α -актин-продуцирующих клеток в составе неоинтимы (рис. 6, а). Эндотелиальный слой, выстилающий внутреннюю поверх-

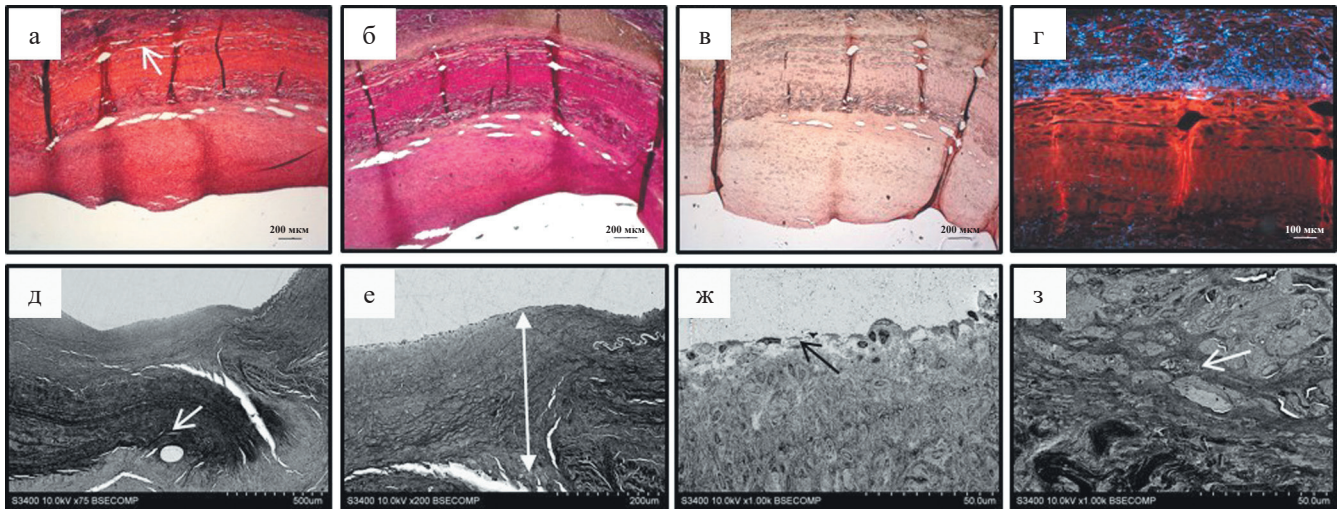


Рис. 5. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии БП-матрикса спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы: а – общий вид БП-матрикса, окр. гематоксилин + эозин, $\times 50$; б – общий вид БП-матрикса, окр. по Ван-Гизону, $\times 50$; в – общий вид БП-матрикса, окр. ализариновым красным С, $\times 50$; г – общий вид БП-матрикса, флюоресцентный снимок, окр. ядер Dapi, $\times 100$; д – общий вид матрикса, $\times 75$; е – область анастомоза, $\times 200$; ж – неоинтима сосуда, $\times 1000$; з – единичные гигантские клетки инородного тела в зоне прилегания неоадвентиции к матриксу, $\times 1000$

Fig. 5. Results of histologic examination and scanning electron microscopy of the BP matrix 6 months after implantation into a sheep carotid artery: а – general view of the BP matrix, H&E stain, $\times 50$; б – general view of the BP matrix, Van Gieson's stain, $\times 50$; в – general view of the BP matrix, alizarin red C color, $\times 50$; г – general view of the BP matrix, DAPI-stained fluorescence image, $\times 100$; д – general view of the matrix, $\times 75$; е – area of anastomosis, $\times 200$; ж – vessel neointima, $\times 1000$; з – single foreign-body giant cells in the area of contact between the neoadventitia and the matrix, $\times 1000$

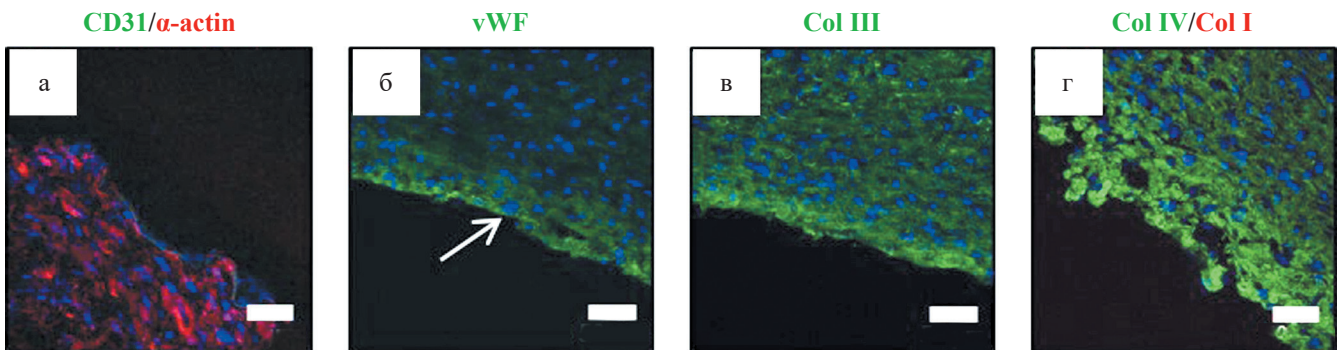


Рис. 6. Результаты иммунофлюоресцентного исследования БП-матрикса спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы, $\times 200$, масштабная линейка 50 мкм: а – эндотелий на внутренней поверхности (CD31, зеленое свечение), клетки, содержащие α -актин (красное свечение); б – фактор фон Виллебранда (vWF, зеленое свечение); в – коллаген III типа (Col III, зеленое свечение); г – коллаген IV типа (Col IV, зеленое свечение), коллаген I типа (Col I, красное свечение), ядра клеток окрашены DAPI (синее свечение)

Fig. 6. Results of immunofluorescence study of the BP matrix 6 months after implantation in a sheep carotid artery, $\times 200$, scale bar 50 μm : а – endothelium on the inner surface (CD31, green glow), alpha actin-containing cells (red glow); б – von Willebrand factor (vWF, green glow); в – collagen type III (Col III, green glow); г – collagen type IV (Col IV, green glow), collagen type I (Col I, red glow), DAPI-stained cell nuclei (blue glow)

ность сосуда, рыхлый, прерывистый: клетки слабо экспрессировали фактор фон Виллебранда (рис. 6, б). Волокна коллагена III типа присутствовали во всех слоях образца: неоинтима, матрикса и неоадвентиции (рис. 6, в). Коллаген IV типа представлен во всех слоях в виде отдельных ярко окрашенных секретирующих клеток (рис. 6, г).

Таким образом, ремоделирование имплантированного в сонную артерию овцы БП-матрикса развивалось по пути образования тканевого аналога стенки сосуда, включающего неоинтиму и неоадвентицию. Отличительной особенностью биологической заплаты явилось наличие участков расслоения, что является признаком деградации материала сосудистой заплаты. Обнаруженная спустя 6 месяцев имплантации выраженная гиперплазия неоинтимы свидетельствует о качественных отличиях имплантированного БП-матрикса и собственной стенки сонной артерии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Коммерческие трансплантаты для сосудистой реконструкции обладают рядом таких нерешенных проблем, как тромбоз, кальцификация, гиперплазия неоинтимы и аневризмобразование [27, 28]. Ксеноперикард помимо указанных выше недостатков подвергается структурной дегенерации, особенно у невозрастных пациентов [29, 30]. В материалах PTFE и Dacron отмечено отложение кальция не только в толще самого трансплантата, но и в прилегающих сосудистых тканях: адвентиции, меди и интима [31]. Неинтимальная гиперплазия является важной клинической проблемой в сосудистой хирургии, поскольку она ограничивает долгосрочную эффективность хирургической коррекции [32]. Ранее мы провели ряд исследований *in vitro* и подтвердили удовлетворительные физико-механические свойства ПУ-материала с перспективой нивелирования развития неоинтимальной гиперплазии: жесткость полиуретана была ниже в сравнении с ксеноперикардом [33]. Собственное исследование нового материала на основе 12% полиуретана, изготовленного методом электроспиннинга, на модели имплантации сосудистой заплаты в сонную артерию овцы на длительный срок установило несколько положительных характеристик ПУ, которые отсутствовали у коммерческого БП. Во-первых, разительное отличие двух материалов было установлено визуально уже на этапе эксплантации. Соединительно-тканый футляр БП был более плотный в сравнении с ПУ. При поперечном разрезе отмечено гармоничное сочетание ПУ со стенкой артерии, в отличие от БП, который был идентифицирован выраженным утолщением своей стенки. Во-вторых, гистологическое исследование выявило отсутствие гиперплазии неоинтимы ПУ-матрикса и большее соответствие с нативной артерией; толщина ремоделированной ПУ-стенки

составила 731,2 (711,5; 751,3) мкм. В то же время БП отличился гиперплазией неоинтимы, толщина которой составила 627 (538; 817) мкм, а стенка ремоделированного спустя 6 месяцев имплантации БП – 1723 (1693; 1772) мкм. В-третьих, эндотелиальная выстилка на ПУ была более целостной и функционально активной в сравнении с менее качественной эндотелизацией БП. В-четвертых, структурная сохранность материала была выше у ПУ: гигантские клетки инородного тела были обнаружены на границе с неоадвентицией; локация данных клеток у БП та же, однако отмечено наличие расслоения материала. Несмотря на 100% проходимость реконструированных сонных артерий с использованием обоих материалов и обеспечение физиологического кровотока на протяжении 6-месячной имплантации овцам с отсутствием аневризм, матрикс на основе полиуретана оказался более эффективным материалом, способным к гармоничному ремоделированию в условиях кровотока. ПУ можно использовать как монокомпонент либо в композитном составе с целью улучшения эластических свойств и увеличения долговечности изделий, предназначенных для сосудистой реконструкции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имплантация ПУ-матрикса в качестве сосудистой заплаты продемонстрировала гармоничное ремоделирование своей стенки и сохранение полимерного каркаса в условиях кровотока на модели овцы. За счет высоких эластических свойств и долговечности ПУ интересен как монокомпонент, так и в составе композитного материала, пригодного для создания изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

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. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Calaway CW, Carson AP et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020; 141 (9): e139–e596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.
2. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W et al. World Stroke Organization (WSO): Glo-

- bal Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke*. 2022; 17 (1): 18–29. doi: 10.1177/17474930211065917.
3. 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.
 4. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Calaway CW, Carson AP et al. 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.
 5. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Amirati E, Baddour LM et al. 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.
 6. Яриков АВ, Балябин АВ, Яшин КС, Мухин АС. Хирургические методы лечения стеноза сонных артерий (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2015; 7 (4): 189–200. Yarikov AV, Balyabin AV, Yashin KS, Mukhin AS. Surgical Treatment Modalities of Carotid Artery Stenosis (Review). *Modern Technologies in Medicine*. 2015; 7 (4): 189–200. doi: 10.17691/stm2015.7.4.25.
 7. Muto A, Nishibe T, Dardik H, Dardik A. Patches for carotid artery endarterectomy: current materials and prospects. *J Vasc Surg*. 2009; 50 (1): 206–213. doi: 10.1016/j.jvs.2009.01.062.
 8. Чернявский АМ, Ларионов ПМ, Столяров МС, Стародубцев ВБ. Структурная трансформация ксеноперикарда после имплантации в сонную артерию (проспективное исследование). *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2007; 4: 37–40. Chernyavskiy AM, Larionov PM, Stolyarov MS, Starodubtsev VB. Structural transformation of xenopericardium after implantation into the carotid artery (prospective study). *Pathology of blood circulation and cardiac surgery*. 2007; 4: 37–40.
 9. Кудрявцева ЮА. Биологические протезы клапана сердца. От идеи до клинического применения. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2015; (4): 6–16. Kudryavtseva Yu.A. Bioprosthetic heart valves. From idea to clinical use. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2015; (4): 6–16. (In Russ.). doi: 10.17802/2306-1278-2015-4-6-16.
 10. Резвова МА, Овчаренко ЕА, Глушкова ТВ, Кудрявцева ЮА, Барбараш ЛС. Оценка резистентности к кальцификации ксеноперикарда, обработанного полигидроксисоединениями. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23 (1): 75–83. Rezvova MA, Ovcharenko EA, Glushkova TV, Kudryavtseva YuA, Barbarash LS. Evaluation of calcification resistance of xenopericardium treated with polyhydroxy compounds. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2021; 23 (1): 75–83. doi: 10.15825/1995-1191-2021-1-75-83.
 11. Weber SS, Annenberg AJ, Wright CB, Braverman TS, Mesh CL. Early pseudoaneurysm degeneration in biologic extracellular matrix patch for carotid repair. *J Vasc Surg*. 2014; 59 (4): 1116–1118. doi: 10.1016/j.jvs.2013.05.012.
 12. Фокин АА, Куватов АВ. Отдаленные результаты реконструкций сонных артерий с использованием заплат. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2013; 6 (2): 239–243. Fokin AA, Kuvatov AV. Remote results of carotid artery reconstructions using a patch. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*. 2013; 6 (2): 239–243.
 13. Ren S, Li X, Wen J, Zhang W, Liu P. Systematic review of randomized controlled trials of different types of patch materials during carotid endarterectomy. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e55050. doi: 10.1371/journal.pone.0055050.
 14. Alawy M, Tawfik W, ElKassaby M, Shalaby A, Zaki M, Hynes N, Sultan S. Late Dacron Patch Inflammatory Reaction after Carotid Endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2017; 54 (4): 423–429. doi: 10.1016/j.ejvs.2017.06.015.
 15. Xu JH, Altaf N, Tosenovsky P, Mwiipatayi BP. Management challenges of late presentation Dacron patch infection after carotid endarterectomy. *BMJ Case Rep*. 2017; 2017: bcr2017221541. doi: 10.1136/bcr-2017-221541.
 16. Rerkasem K, Rothwell PM. Systematic review of randomized controlled trials of patch angioplasty versus primary closure and different types of patch materials during carotid endarterectomy. *Asian J Surg*. 2011; 34 (1): 32–40. doi: 10.1016/S1015-9584(11)60016-X.
 17. Kucinska-Lipka J, Gubanska I, Janik H, Sienkiewicz M. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015; 46: 166–176. doi: 10.1016/j.msec.2014.10.027.
 18. LaPorte RJ. Hydrophilic polymer coatings for medical devices. *Routledge*. 2017; 11–16. doi: 10.1201/9780203751381.
 19. Kheradvar A, Groves EM, Dasi LP, Alavi SH, Tranquillo R, Grande-Allen KJ et al. Emerging trends in heart valve engineering: Part I. Solutions for future. *Ann Biomed Eng*. 2015; 43 (4): 833–843. doi: 10.1007/s10439-014-1209-z.
 20. Bergmeister H, Grasl C, Walter I, Plasenzotti R, Stoiber M, Schreiber C et al. Electrospun small-diameter polyurethane vascular grafts: ingrowth and differentiation of vascular-specific host cells. *Artif Organs*. 2012; 36 (1): 54–61. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01297.x.
 21. Grasl C, Bergmeister H, Stoiber M, Schima H, Weigel G. Electrospun polyurethane vascular grafts: *in vitro* mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 93 (2): 716–723. doi: 10.1002/jbm.a.32584.
 22. Bergmeister H, Schreiber C, Grasl C, Walter I, Plasenzotti R, Stoiber M et al. Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities. *Acta Biomater*. 2013; 9 (4): 6032–6040. doi: 10.1016/j.actbio.2012.12.009.
 23. Schleimer K, Jalaie H, Afify M, Woitok A, Barbati ME, Hoeft K et al. Sheep models for evaluation of novel patch and prosthesis material in vascular surgery: tips and tricks to avoid possible pitfalls. *Acta Vet Scand*. 2018; 60 (1): 42. doi: 10.1186/s13028-018-0397-1.

24. Antonova LV, Mironov AV, Yuzhalin AE, Krivkina EO, Shabaev AR, Rezvova MA et al. A Brief Report on an Implantation of Small-Caliber Biodegradable Vascular Grafts in a Carotid Artery of the Sheep. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 May 21; 13 (5): 101. doi: 10.3390/ph13050101.
25. 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 (Basel)*. 2022 Nov 26; 14 (23): 5149. doi: 10.3390/polym14235149.
26. Antonova L, Kutikhin A, Sevostianova V, Velikanova E, Matveeva V, Glushkova T et al. bFGF and SDF-1 α Improve In Vivo Performance of VEGF-Incorporating Small-Diameter Vascular Grafts. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Mar 28; 14 (4): 302. doi: 10.3390/ph14040302.
27. Terakawa K, Yamauchi H, Lee Y, Ono M. A Novel Knitted Polytetrafluoroethylene Patch for Cardiovascular Surgery. *Int Heart J*. 2022; 63 (1): 122–130. doi: 10.1536/ihj.21-564.
28. Liesker DJ, Gareb B, Looman RS, Donners SJA, de Borst GJ, Zeebregts CJ, Saleem BR. Patch angioplasty during carotid endarterectomy using different materials has similar clinical outcomes. *J Vasc Surg*. 2023; 77 (2): 559–566.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2022.09.027.
29. Aguiari P, Fiorese M, Iop L, Gerosa G, Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016; 22 (1): 72–84. doi: 10.1093/icvts/ivv282.
30. Fadeeva IS, Sorkomov MN, Zvyagina AI, Britikov DV, Sachkov AS, Evstratova YaV et al. Study of Biointegration and Elastic-Strength Properties of a New Xenopericardium-Based Biomaterial for Reconstructive Cardiovascular Surgery. *Bull Exp Biol Med*. 2019; 167 (4): 496–499. doi: 10.1007/s10517-019-04558-1.
31. Lejay A, Bratu B, Kuntz S, Neumann N, Heim F, Chakfè N. Calcification of Synthetic Vascular Grafts: A Systematic Review. *EJVES Vasc Forum*. 2023; 29 (60): 1–7. doi: 10.1016/j.ejvsf.2023.05.013.
32. Collins MJ, Li X, Lv W, Yang C, Protack CD, Muto A et al. Therapeutic strategies to combat neointimal hyperplasia in vascular grafts. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012; 10 (5): 635–647. doi: 10.1586/erc.12.33.
33. Сенокосова ЕА, Прокудина ЕС, Матвеева ВГ, Великанова ЕА, Глушкова ТВ, Кошелев ВА и др. Тканеинженерный матрикс на основе полиуретана: исследование *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2023; 12 (4S): 120–130. Senokosova EA, Prokudina ES, Matveeva VG, Velikanova EA, Glushkova TV, Koshelev VA et al. Tissue engineering matrix based on polyurethane: *in vitro* research. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2023; 12 (4S): 120–130. [In Russ.]. doi: 10.17802/2306-1278-2023-12-4S-120-130.

Статья поступила в редакцию 19.03.2024 г.
The article was submitted to the journal on 19.03.2024