

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-145-155

## БИОМИМЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ПРОТЕЗОВ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Е.А. Немец<sup>1</sup>, Ю.В. Белов<sup>1, 2</sup>, К.С. Кирьяков<sup>1</sup>, Н.В. Грудинин<sup>1</sup>, В.К. Богданов<sup>1</sup>,  
К.С. Филиппов<sup>1</sup>, А.О. Никольская<sup>1</sup>, И.Ю. Тюняева<sup>1</sup>, А.А. Выпрышко<sup>1</sup>, В.М. Захаревич<sup>1</sup>,  
Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

**Цель:** разработать многослойные пористые трубчатые каркасы (ПТК) диаметром 2 мм с характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам малого диаметра. **Материалы и методы.** ПТК из поликапролактона (ПКЛ, ММ 80000) с водозапирающим слоем из ПКЛ с добавлением желатина (ПКЛЖ) диаметром 2 мм формировали методом электроспиннинга (NANON-01A). Биоактивное покрытие наносили на поверхность ПТК последовательной инкубацией в растворах бычьего сывороточного альбумина, гепарина (Гп) и лизата тромбоцитов (ЛТ). Цитотоксичность исследовали в условиях непосредственного контакта ПТК с монослоем фибробластов мыши линии NIH/3T3. Жизнеспособность ЭКч линии EA.hy926 оценивали с помощью набора Live/Dead<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit. Проподимость и параметры кровотока ПТК, имплантированных в инфраренальный отдел аорты крысы, регистрировали с применением доплерографии. **Результаты.** Разработана трехслойная конструкция ПТК с внутренним диаметром 2 мм, внутренний и внешний слой которой сформированы из 0,2 мл раствора ПКЛ, а средний водозапирающий слой – из 0,5 мл раствора ПКЛ с добавлением 30% (по массе полимера) желатина. Введение водозапирающего слоя позволило снизить хирургическую пористость (ХП) с  $56,2 \pm 8,7$  мл/(см<sup>2</sup>·мин) в случае однослойного ПТК из чистого ПКЛ до  $8,9 \pm 2,6$  мл/(см<sup>2</sup>·мин) для трехслойного ПТК. Полученные ПТК продемонстрировали физико-механические характеристики, сходные с естественными кровеносными сосудами, а также отсутствие цитотоксичности. Нанесение биоактивного покрытия из Гп и ЛТ позволило повысить *in vitro* адгезию и пролиферацию ЭК. Была осуществлена коррекция техники имплантации фрагментов трехслойных ПТК длиной 10 мм в инфраренальный отдел аорты крысы, позволившая минимизировать кровопотерю и сужение области анастомозов. В остром эксперименте доказано, что протезы проходимы, а параметры кровотока (систолическая и диастолическая скорость, индекс резистивности) близки к соответствующим показателям естественной аорты крысы. **Заключение.** Разработанные трехслойные конструкции ПТК имеют низкую ХП и физико-механические свойства, близкие к нативным кровеносным сосудам. Нанесение биологически активного покрытия позволяет улучшить *in vitro* матричные свойства ПТК относительно ЭКч. При кратковременной имплантации в аорту экспериментального животного ПТК продемонстрировали отсутствие раннего тромбоза, при этом параметры кровотока были близки к показателям естественной аорты крысы. Таким образом, трехслойный ПТК с биоактивным покрытием может быть использован в качестве каркаса для формирования *in situ* тканеинженерной конструкции кровеносного сосуда малого диаметра.

**Ключевые слова:** сосудистый протез, электроспиннинг, трубчатый пористый каркас, поликапролактон, желатин, гепарин, лизат тромбоцитов, эндотелиальные клетки, цитотоксичность, имплантация, аорта крысы.

**Для корреспонденции:** Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (968) 840-47-45. E-mail: evgnemets@yandex.ru

**Corresponding author:** Evgeniy Nemets. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (968) 840-47-45. E-mail: evgnemets@yandex.ru

# BIOMIMETIC APPROACH TO THE DESIGN OF ARTIFICIAL SMALL-DIAMETER BLOOD VESSELS

*E.A. Nemets<sup>1</sup>, Yu.V. Belov<sup>1, 2</sup>, K.S. Kiryakov<sup>1</sup>, N.V. Grudinina<sup>1</sup>, V.K. Bogdanov<sup>1</sup>, K.S. Filippov<sup>1</sup>, A.O. Nikolskaya<sup>1</sup>, I.Yu. Tyunyaeva<sup>1</sup>, A.A. Vypryshko<sup>1</sup>, V.M. Zaxarevich<sup>1</sup>, Yu.B. Basok<sup>1</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

**Objective:** To create 2-mm diameter multilayer porous tubular scaffolds (PTS) with characteristics that resemble small-diameter native blood vessels in terms of characteristics. **Materials and methods.** PTS made of polycaprolactone (PCL, MM 80000) with a PCL-made sealing coat/layer with gelatin addition (PCL-gelatin) with a diameter of 2 mm were created by electrospinning (NANON-01A). Bioactive coating was applied to the PTS surface by sequential incubation in solutions of bovine serum albumin, heparin (Hp), and platelet lysate (PL). Cytotoxicity was investigated under conditions of direct contact of PTS with a monolayer of NIH/3T3 mouse fibroblasts. Viability of human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926) was evaluated using Live/Dead<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit. Permeability and blood flow parameters of the PTS implanted in the infrarenal section of the rat aorta were recorded using Doppler imaging. **Results.** A three-layer PTS construct with an inner diameter of 2 mm was developed. Its inner and outer layers were formed from 0.2 mL of PCL solution, and the middle sealing coat/layer was from 0.5 mL of PCL with addition of 30% (by weight of polymer) gelatin. Introduction of the sealing coat/layer reduced surgical porosity (SP) from  $56.2 \pm 8.7$  mL/(cm<sup>2</sup>·min) for a single-layer PTS made of pure PCL to  $8.9 \pm 2.6$  mL/(cm<sup>2</sup>·min) for a three-layer PTS. The resulting PTS demonstrated physicochemical characteristics similar to those of native blood vessels; it also showed no cytotoxicity. Application of a bioactive coating of Hp and PL allowed for increased in vitro adhesion and proliferation of endothelial cells. The technique of implantation of 10 mm long fragments of three-layer PTS into the infrarenal section of a rat aorta was corrected, thus minimizing blood loss and narrowing the anastomosis site. In an acute experiment, it was proven that the prostheses were patent and that blood flow parameters (systolic and diastolic velocity, resistivity index) were close to the corresponding indicators of native rat aorta. **Conclusion.** The developed three-layer PTS constructs have low SP and physicochemical properties close to those of native blood vessels. Bioactive coating improves the in vitro matrix properties of PTS relative to human endothelial cells. At short-term implantation into the aorta of experimental animals, PTS showed no early thrombosis, while blood flow parameters were close to those of native rat aorta. Thus, three-layer PTS with bioactive coating can be used as a scaffold for creation of in situ tissue-engineered construct of a small-diameter blood vessel.

*Keywords: vascular prosthesis, electrospinning, tubular porous scaffold, polycaprolactone, gelatin, heparin, platelet lysate, endothelial cells, cytotoxicity, implantation, rat aorta.*

## ВВЕДЕНИЕ

В регенерационной медицине широко используются биомиметические материалы, представляющие собой биосовместимые композиционные материалы, имитирующие структуру и основные характеристики различных тканей и/или органов организма человека [1]. В последнее время аддитивные технологии, преимущественно электроспиннинг и биопринтирование, достаточно часто применяют для разработки протезов – биомиметиков кровеносных сосудов, в том числе диаметром менее 5 мм [2].

При разработке протезов кровеносных сосудов (ПКС) необходимо соблюдение определенного баланса между достаточно высокой биологической пористостью, обеспечиваемой наличием пор с размером достаточно большим, чтобы обеспечить прорастание тканей за счет миграции клеток в объем ПКС, и низкой хирургической пористостью (ХП),

являющейся критерием кровопотери через стенки сосудистого протеза после включения его в кровоток. Водопроницаемость ПКС более 50 мл/(см<sup>2</sup>·мин) при давлении 120 мм рт. ст. является критерием, определяющим необходимость дополнительных усилий по снижению ХП [3, 4].

Исследование текстильных ПКС из полиэтилентерефталата показало, что независимо от размера пор (от 20 до 100 мкм) существует корреляция ( $R^2 > 0,9$ ) между водопроницаемостью и кровопотерей, при этом за счет большей вязкости и присутствия форменных элементов потери крови примерно в 10 раз меньше, чем проницаемость по воде [5].

Для снижения ХП активно применяют гидрогелевые покрытия из коллагена или желатина [6, 7], хондроитин сульфата [8], фиброина шелка [9], альгината натрия [10], производные декстранов [11], хитозана [12] и ряда других.

Одной из существенных проблем водозапирающих покрытий для сосудистых протезов на основе гидрогелей является недостаточно длительное время функционирования в условиях контакта со средами организма, вследствие чего возникает необходимость в применении дополнительной сшивки [13–15]. Используемые при реализации данного подхода сшивающие агенты класса альдегидов, эпоксисоединений, изоцианатов и т. д. являются токсичными веществами, которые трудно полностью удалить из объема покрытия, а их попадание в кровоток нежелательно в связи с непредсказуемым поведением в организме.

Кроме того, сравнительное исследование ПКС, изготовленных с применением различных технологий, показало, что нанесение покрытия, позволяющего снизить ХП, сопровождается нежелательными изменениями физико-механических характеристик сосудистых протезов, в частности повышением модуля Юнга [16].

Альтернативу гидрогелевым покрытиям могут составить многослойные ПКС, состоящие из высокопористых внешнего и внутреннего слоев и герметизирующего слоя, расположенного между ними. Для формирования водозапирающего внутреннего слоя производили обмакивание в водные растворы желатина [17] или смеси из альбумина и альгината [18], а также формировали средний слой из плотно упакованных волокон методом электроспиннинга [19, 20].

Ранее с применением метода электроспиннинга нами был разработан биосовместимый высокопористый каркас из поликапролактона (ПКЛ) в виде трубок диаметром 3 мм, обладающий физико-механическими характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам [21], однако минимальная хирургическая пористость его, которой удалось добиться, была близка к предельно допустимой.

Целью данной работы было разработать многослойные пористые трубчатые каркасы (ПТК) диаметром 2 мм с характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам малого диаметра.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Изготовление образцов пористых трубчатых каркасов

Пористые трубчатые каркасы были получены на установке для электроспиннинга NANON-01A («МЕСС СО», Япония) при напряжении 25 кВ. Расстояние между иглой 18 G и цилиндрическим электродом диаметром 2 мм составляло 10 см, стержень вращался со скоростью 1000 об/мин, растворы наносили со скоростью 4 мл/ч. Внешний и внутренний слой ПТК формировали из 0,2 мл 10% раствора ПКЛ (MM 80000, Sigma-Aldrich, США) в метилхлориде (АО «ЭКОС-1», Россия), а средний водозапирающий слой – из 0,5 мл 5% раствора ПКЛЖ. Полученные

каркасы сушили при 37 °С в течение 2 ч и вакуумировали при 20 мм рт. ст. и 37 °С в течение 24 ч.

### Нанесение модифицирующего покрытия

Образец ПТК последовательно обрабатывали водными растворами бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл, 1,5–2 ч при 37 °С), гепарина (Гп, 1 мг/мл, 1,5–2 ч при 37 °С), глутарового альдегида (1%, 18 ч при комнатной температуре), затем повторно гепарином (1 мг/мл, 1,5–2 ч, 37 °С). Между стадиями и по окончании нанесения покрытия ПТК трижды промывали в 100 мл дистиллированной воды. Гепаринизированный каркас (ПТК–Гп) высушивали при 37 °С, вакуумировали (10–20 мм рт. ст. при комнатной температуре) и стерилизовали гамма-излучением в дозе 1,5 МРад.

Раствор лизата тромбоцитов (ЛТ) человека получали разведением лиофилизованного препарата (Ренам, Россия) раствором Хенкса, не содержащим ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS, Gibco® by Life Technologies™, СК) в соотношении 1 : 9 с последующей стерилизацией фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Стерильные образцы ПТК–Гп непосредственно перед экспериментом обрабатывали раствором ЛТ в асептических условиях в течение 1 ч при 37 °С (ПТК–ЛТ).

### Морфология поверхности протезов кровеносных сосудов

Для анализа морфологии поверхности ПТК использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JSM-6360LA (JEOL, Япония). Ускоряющее напряжение 5 кВ. Токопроводящее покрытие на поверхности исследуемых образцов формировали напылением золота на установке JFC-1600 (JEOL, Япония) 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА.

### Физико-механические характеристики протезов кровеносных сосудов

Для исследования физико-механических свойств ПТК применяли разрывную машину Shimadzu EZ Test EZ-SX (Shimadzu Corporation, Япония) при скорости растяжения 5 мм/мин. Полученные результаты обрабатывали в программе TrapeziumX, версия 1.2.6, позволяющей вычислять максимальное удлинение (%), усилие до разрыва (Н) и модуль Юнга (Мпа).

### Исследование цитотоксичности

Оценку цитотоксического действия лабораторных образцов ПТК проводили согласно требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2023 «Исследования на цитотоксичность» [22].

Фибробласты мыши линии NIH/3T3 (American Type Culture Collection) культивировали в  $\text{CO}_2$ -ин-



кубаторе при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) с полной ростовой средой DMEM с высоким содержанием глюкозы («ПанЭко», Россия) и 10% телячьей сыворотки (Biosera, Германия), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, США) и 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия). Клетки суспендировали применением диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК). Количество клеток в суспензии определяли с применением камеры Горяева («МиниМед®», Россия). Затем фибробласты высевали в 24-луночные плоскодонные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 7–12 × 10<sup>4</sup> клеток на лунку и инкубировали 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO<sub>2</sub>, до образования (80 ± 10) % монослоя. Исследуемые образцы ПТК размещали непосредственно на поверхности монослоя фибробластов. По завершении инкубации из лунок удаляли исследуемые образцы, промывали в фосфатно-солевом буферном (ФСБ) растворе и на 1–2 минуты добавляли 0,1% раствор трипанового синего («ПанЭко», Россия), окрашивающего лизированные клетки и клетки с поврежденными клеточными мембранами. После удаления красителя и промывки ФСБ с применением флюоресцентного микроскопа производили оценку культуры на наличие морфологических изменений и уменьшение плотности клеток.

Для анализа результатов применяли следующую шкалу степени реакции клеток на непосредственный контакт с ПТК:

- 0 – лизиса нет (реакция отсутствует);
- 1 – лизировано не более 20% клеток (реакция незначительная);
- 2 – лизировано не более 50% клеток (реакция нерезкая);
- 3 – лизировано не более 70% клеток (реакция умеренная);
- 4 – лизировано более 70% клеток (реакция резкая).

Нецитотоксичный материал должен иметь степень реакции «0».

### Исследование взаимодействия ПТК с эндотелиальными клетками

Для исследования *in vitro* были выбраны иммортализованные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭКч) линии EA.hy926 (The human umbilical vein cell line EA.hy926, ATCC®CRL-2922™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection), имеющие сходство с первичными культурами [23, 24].

Стерильные образцы немодифицированных и модифицированных ПТК помещали на дно культурального плоскодонного 24-луночного планшета

(CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия), в асептических условиях наносили ЭКч в концентрации 5 × 10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup> и культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при стандартных условиях в течение выбранного интервала времени.

Оценку жизнеспособности ЭКч производили с применением Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes® by Life Technologies™, США): в лунки планшета добавляли фосфатный буфер Дюльбекко, содержащий 2 мкМ calcein AM и 4 мкМ EthD-1, через 15 мин результаты окрашивания визуализировали с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония), оснащенного цифровой фотокамерой Digital Sight DS-Vil (Nikon, Япония).

Метаболическую активность ЭКч на поверхности ПТК оценивали с помощью реагента PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США): в лунки с исследуемыми образцами и контролем (среда без клеток) добавляли 10% витального реагента PrestoBlue™ и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO<sub>2</sub>. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшетов, как было описано ранее, на длинах волн 570 и 600 нм. Процент восстановленного PrestoBlue™ рассчитывали по формуле:

$$\frac{117,216 \cdot A_{570 \text{ Обр.}} - 80,586 \cdot A_{600 \text{ Обр.}}}{155,677 \cdot A'_{600} - 14,652 \cdot A'_{570}} \times 100\%,$$

где 117,216 и 80,586 – молярный коэффициент экстинкции окисленной формы реагента при λ = 570 и λ = 600 нм соответственно; 155,677 и 14,652 – молярный коэффициент экстинкции восстановленной формы реагента при λ = 600 и λ = 570 нм соответственно; A<sub>570 Обр.</sub> и A<sub>600 Обр.</sub> – поглощение исследуемого образца при λ = 570 и λ = 600 нм соответственно; A'<sub>570</sub> и A'<sub>600</sub> – поглощение контрольного образца при λ = 570 и λ = 600 нм соответственно.

Для определения количества ЭКч на поверхности ПТК была построена калибровочная кривая, линейная в полулогарифмических координатах до концентрации ЭКч 0,8 × 10<sup>5</sup>.

### Имплантация фрагмента ПТК в инфраренальный отдел аорты крысы

Трехслойные ПТК диаметром 2 мм и длиной 10 мм имплантировали в брюшную часть аорты крысы по методике «конец в конец». Введенное в наркоз животное фиксировали на операционном столе в положении лежа на спине. С помощью бритвенного станка удаляли шерсть с передней брюшной стенки, операционное поле обрабатывали антисептическим средством. Доступ к брюшной аорте выполняли посредством срединной лапаротомии. Затем выделяли



инфраренальный отдел аорты, выполняли пережатие проксимального отдела сосуда ниже отхождения почечных артерий. Пережатие дистального отдела выполняли над трифуркацией брюшной аорты. После пережатия осуществляли резекцию инфраренального участка аорты, с помощью атравматичной нити полипропилена 8-0 формировали проксимальный, а затем дистальный анастомозы с ПТК. После запуска кровотока осуществляли контроль гемостаза. На заключительной стадии выполняли послойное ушивание операционной раны с последующей обработкой швов антисептическим средством и раствором анестетика. После оперативного вмешательства животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания.

Для подтверждения проходимости имплантированных ПТК выполняли исследование на ультразвуковом аппарате Vivid E9 (General Electric, США) с программным обеспечением WindowBlinds™ (M OCSX® Stardock) с использованием секторного (1,5–5 мГц) и линейного (2,5–12 мГц) датчиков и проводникового геля Медигель («Гельтек», Россия). Для седации испытуемых животных перед проведением доплерометрии применяли Золетил (Virbac Sante Animale, Франция), после чего осуществляли бритье брюшной области ветеринарным триммером. Регистрировали измерение диаметра просвета аорты либо ПТК (d, см), пиковую систолическую скорость (Vps, м/с) и максимальную конечную диастолическую

скорость (Ved, м/с), после чего рассчитывали индекс резистивности согласно формуле (2):

$$RI = (Vps - Ved)/Vps. \quad (2)$$

### Статистическая обработка

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$  при количестве образцов (n) от 3 до 5.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наименьшая водопроницаемость разработанного нами ранее ПТК из ПКЛ диаметром 3 мм была достаточно высока и составила  $30,4 \pm 1,5$  мл/(см<sup>2</sup>·мин) [20], что все же было ниже максимально допустимого значения 50 мл/(см<sup>2</sup>·мин). При переходе к ПТК диаметром 2 мм водопроницаемость ПТК из ПКЛ не удалось уменьшить до удовлетворительных значений, что и определило необходимость дополнительных усилий по снижению ХП. Для решения этой проблемы нами было предположено формировать многослойные ПТК, включающие в свой состав внутренний водозапирающий слой из ПКЛ с добавлением желатина.

На рис. 1 суммированы результаты исследования влияния концентрации желатина в водозапирающем

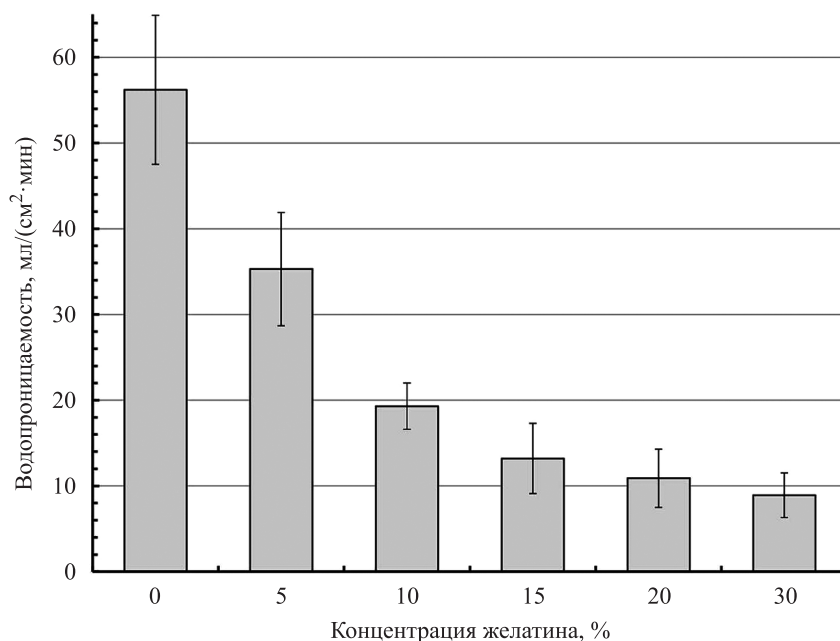


Рис. 1. Влияние концентрации желатина в водозапирающем слое на водопроницаемость трехслойного ПТК диаметром 2 мм. Внутренний и внешний слои – 0,2 мл раствора ПКЛ, средний водозапирающий слой – 0,5 мл раствора ПКЛЖ

Fig. 1. Effect of gelatin levels in the sealing coat/layer on the water permeability of a 2 mm diameter three-layer PTS. Inner and outer layers are made from 0.2 mL of PCL, the middle sealing coat/layer is made from 0.5 mL of PCL-gelatin solution

слое на водопроницаемость трехслойного ПТК диаметром 2 мм.

С ростом концентрации желатина наблюдается падение водопроницаемости, достигающее значений менее 10 мл/(см<sup>2</sup>·мин) при 30% концентрации белка. Попытки повышения концентрации желатина выше 30% привели к скачкообразному повышению риска расслаивания многослойной конструкции при контакте с водой. В результате концентрация желатина, равная 30% (по массе относительно ПКЛ), была выбрана в качестве оптимальной для формирования водозапирающего слоя.

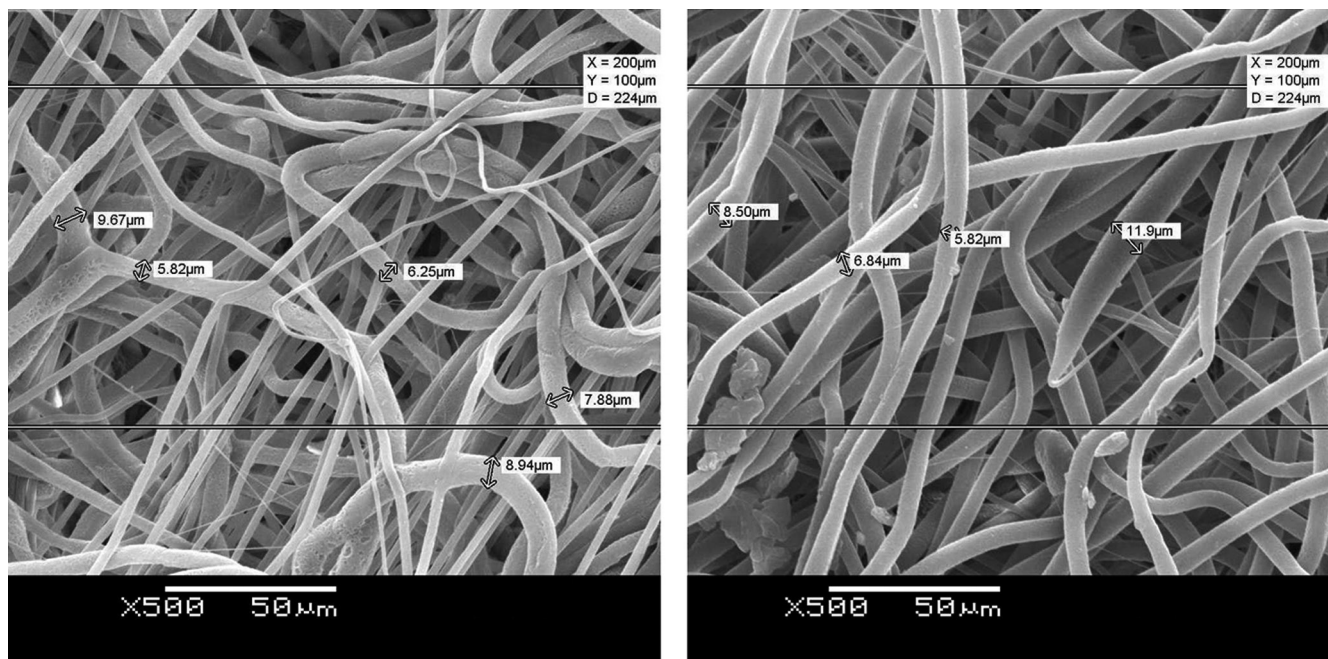
Обе поверхности трехслойных ПТК демонстрируют высокопористую структуру, сформированную волокнами, диаметром несколько микрометров, с порами, достаточно большими, чтобы обеспечить миграцию клеток в объем матрикса (рис. 2).

В таблице приведены результаты измерения физико-механических характеристик трехслойных ПТК малого диаметра с нанесенным биоактивным покрытием.

Трехслойные ПТК обладают физико-механическими характеристиками, схожими с механическими свойствами кровеносных сосудов аналогичного диаметра.

В испытании на цитотоксичность трехслойный ПТК с нанесенным биоактивным покрытием показал уровень «0» – цитотоксичность отсутствует.

На рис. 3 приведены фотографии культуры ЭК человека линии EA.hy926 через 24 и 168 ч после посева на поверхности культурального пластика (КП) и внутренней поверхности ПТК без модифицирующего покрытия, модифицированных только гепарином (ПТК–Гп), а также биоактивным покрытием из Гп и



Внутренняя поверхность

Внешняя поверхность

Рис. 2. Микроструктура поверхности трехслойного ПТК. Внутренний и внешний слой – 0,2 мл раствора ПКЛ, средний водозапирающий слой – 0,5 мл раствора ПКЛЖ

Fig 2. Surface microstructure of a three-layer PTS. Inner and outer layers are made from 0.2 mL of PCL, the middle sealing coat/layer is from 0.5 mL of PCL-gelatin solution

Таблица

**Физико-механические характеристики трехслойных каркасов**  
**Physicomechanical characteristics of three-layer scaffolds**

	Модуль Юнга, МПа	Усилие до разрыва, Н	Удлинение до разрыва, %
ПТК, диаметр 2 мм	6,6 ± 0,3	12,6 ± 3,2	412 ± 30
Аорта крысы, диаметр 2 мм	8,5 ± 2,2	2,0 ± 0,3	93 ± 16



ЛТ (ПТК–ЛТ). Поверхность КП использовали для контроля морфологии и адекватного роста исследуемых культур клеток.

Через 24 ч после посева на внутренней поверхности образцов ПТК–ЛТ наблюдается наибольшее

количество адгезированных и распластанных ЭК по сравнению с образцами из немодифицированного ПКЛ и ПТК–Гп, где количество адгезированных эндотелиальных клеток значительно ниже. Стоит отметить, что на внутренней поверхности немодифици-

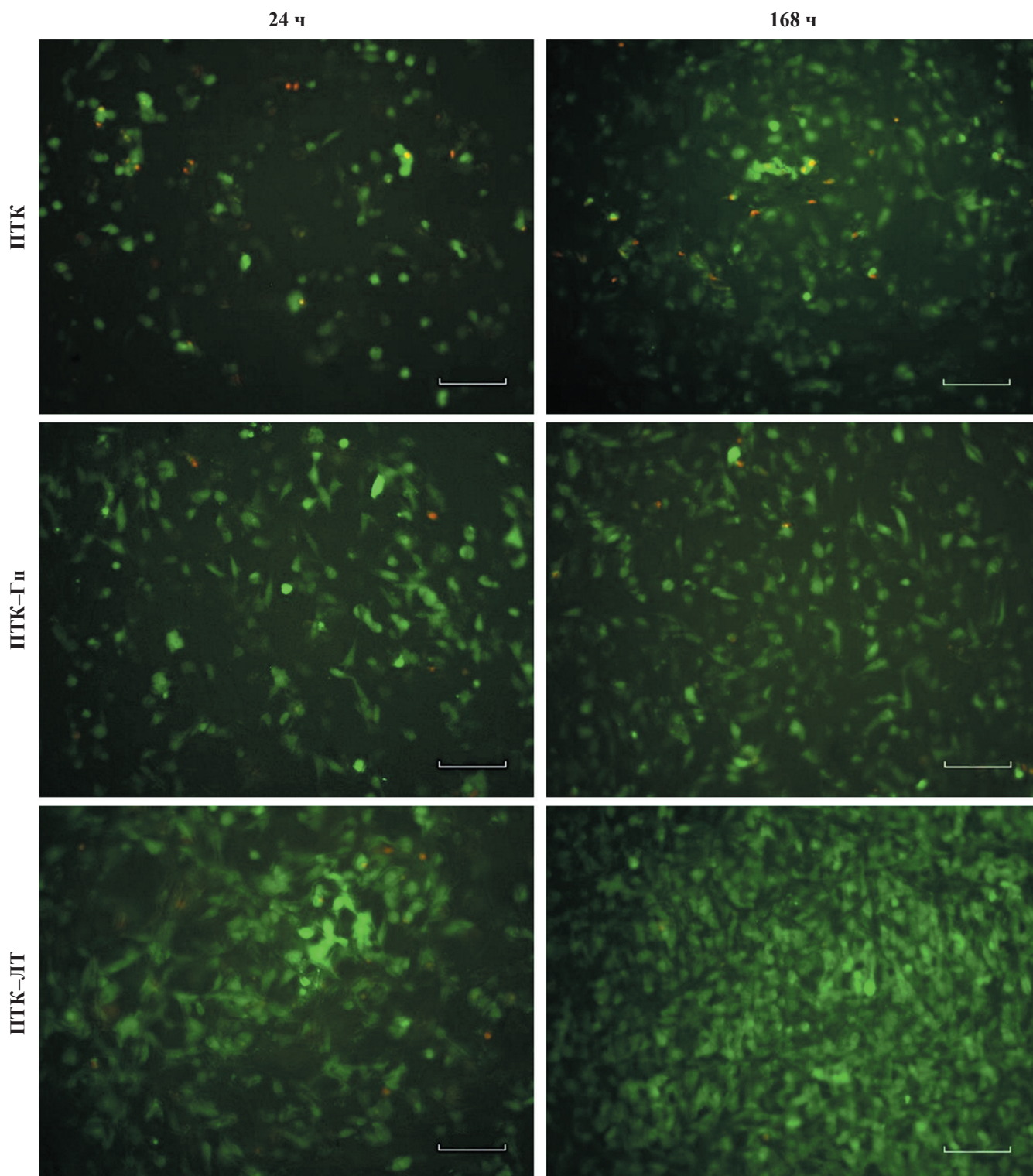


Рис. 3. Рост ЭК на внутренней поверхности ПТК. Плотность посева  $5 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup>. Окрашивание Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit.  $\times 20$ . Бар 100 мкм

Fig. 3. Endothelial cell growth on the inner surface of PTS. Seeding density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit staining.  $\times 20$ . Scale bar: 100  $\mu$ m



рованного ПТК наблюдается большое количество не распластанных и мертвых клеток, что, по-видимому, связано с гидрофобной природой ПКЛ [13, 25, 26]. Через 168 ч культивирования на поверхности КП и на образце ПТК–ЛТ формируется монослой ЭК, в то время как на поверхности гепаринизированного образца и немодифицированного контроля наблюдается отсутствие пролиферации и значительное количество нежизнеспособных клеток, а образования монослоя ЭК не происходит. Заметим, что, несмотря на гидрофилизацию поверхности ПТК из ПКЛ, в условиях данного эксперимента модифицирование гепарином не способствует эндотелизации каркаса *in vitro*.

На рис. 4 представлены результаты количественного исследования пролиферации ЭК на внутренней поверхности исходного и модифицированных ПТК.

Через 24 ч количество ЭК на внутренней поверхности исходных, модифицированных каркасов отличается незначительно ( $10,1 \pm 1,3 \times 10^3$ ;  $13,2 \pm 1,4 \times 10^3$  и  $16,7 \pm 1,1 \times 10^3$  кл. для ПКЛ, ПКЛ–Гп и ПКЛ–ЛТ соответственно). Через 96 ч культивирования количество клеток на каждом варианте каркаса равномерно увеличивается примерно в 2 раза. К концу срока ПКЛ–ЛТ увеличивается в 3,6 раза (до  $60,4 \pm 1,8 \times 10^3$  кл.), в то время как количество ЭК на внешней поверхности исходных и ПКЛ–Гп увеличивается в 2,9 раза (до  $29,1 \pm 1,9 \times 10^3$  и  $32,0 \pm 1,4 \times 10^3$  кл. соответственно). Разница в количестве клеток на внутренней поверхности немодифицированного ПКЛ и ПКЛ–Гп незначительна, несмотря на гидро-

филизацию поверхности вследствие иммобилизации гепарина.

Таким образом, присутствие ЛТ в модифицирующем покрытии в условиях проведенного эксперимента *in vitro* является ключевым фактором, способствующим адгезии, распластыванию и стимулирующим пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 на внутренней поверхности каркасов, повышая их матричные свойства.

Исследование *in vivo* функциональных свойств сосудистых протезов малого диаметра производили протезированием инфраренального отдела брюшной аорты крысы трехслойными ПТК с внутренним диаметром 2 мм, длиной 10 мм.

Была осуществлена коррекция методики имплантации. Первоначально после пережатия осуществляли поперечное пересечение артерии и 6–8 узловыми швами формировали прямые анастомозы с ПТК. С целью минимизации кровопотери и сужения области анастомозов было опробовано формирование косых срезов проксимального и дистального концов аорты с формированием анастомозов непрерывным обвивным швом. В результате удалось добиться оптимизации гемостаза и сохранения оптимального диаметра анастомоза.

Для подтверждения проходимости ПТК на ранних сроках после имплантации выполняли доплерографическое исследование (рис. 5).

На рис. 6 представлены результаты доплерографического исследования имплантированных ПТК.

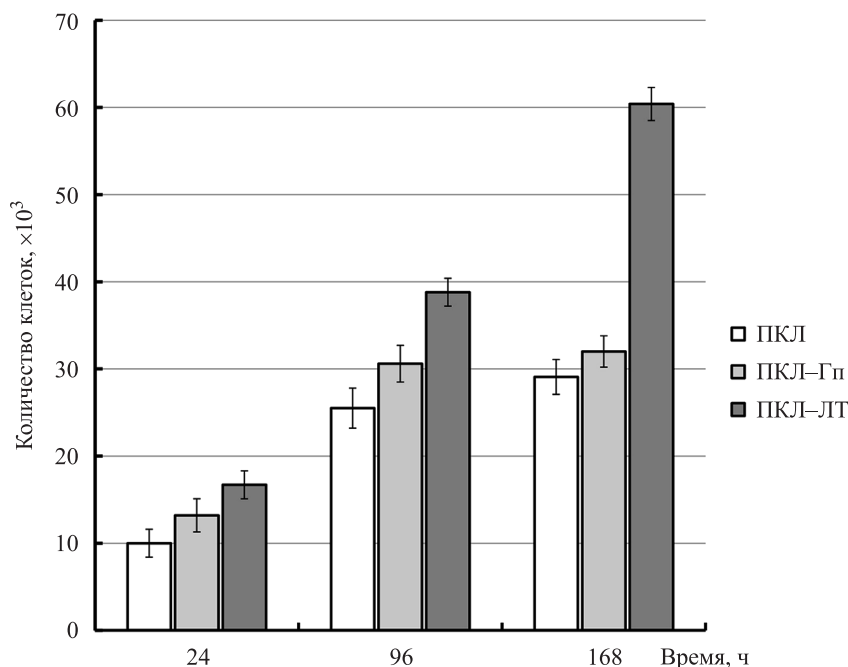
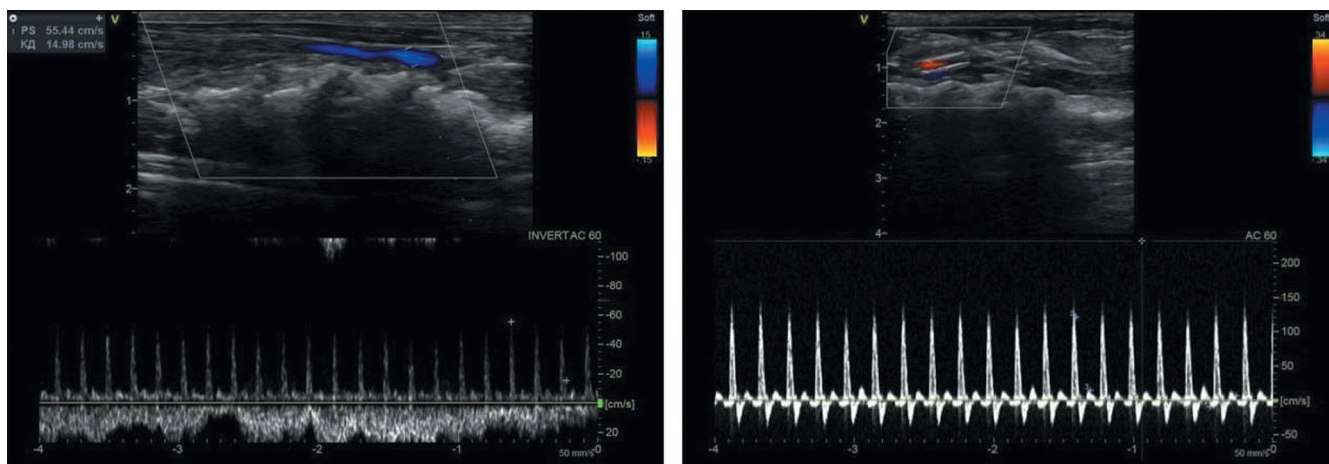


Рис. 4. Пролiferация ЭК на внутренней поверхности ПТК. Плотность посева  $5 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup>

Fig. 4. Endothelial cell proliferation in the inner surface of PTS. Seeding density  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>



Неоперированная крыса (контроль)

ПТК, 4 недели после имплантации

Рис. 5. Допплерографическое исследование имплантированного ПТК с покрытием через 4 недели после имплантации (типичное измерение)

Fig. 5. Doppler ultrasound of implanted coated PTS 4 weeks after implantation (typical measurement)

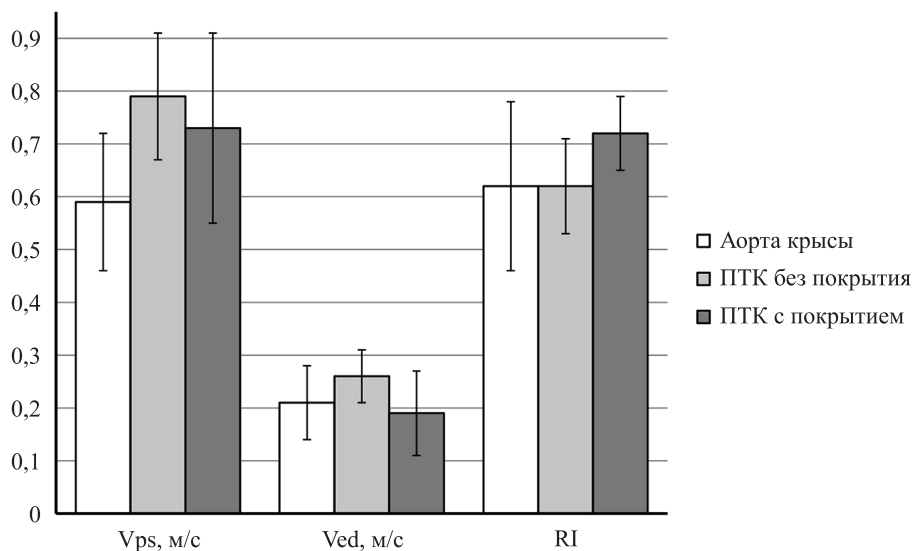


Рис. 6. Максимальная систолическая скорость (Vps), диастолическая скорость (Ved) и индекс резистивности (RI) через 4 недели после имплантации ПТК (n = 6)

Fig. 6. Peak systolic velocity (Vps), diastolic velocity (Ved) and resistive index (RI) 4 weeks after PTS implantation (n = 6)

Имплантированные модифицированные и немодифицированные ПТК продемонстрировали близкие параметры кровотока, не отличающиеся от показателей, полученных для аорты крысы.

В дальнейшем планируется продолжить исследование *in vivo* на срок до 1 года с подробным изучением процесса образования неоинтимы с привлечением гистологических методов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные трехслойные конструкции ПТК из ПКЛ с водозапирающим слоем из ПКЛЖ имеют

низкую ХП и демонстрируют физико-механические свойства, близкие к нативным кровеносным сосудам.

Нанесение биологически активного покрытия на основе Гп и ЛГ позволяет улучшить *in vitro* взаимодействие ПТК с ЭК.

При имплантации в аорту экспериментального животного ПТК продемонстрировали отсутствие раннего тромбоза, при этом параметры кровотока были близки к показателям аорты крысы.

Таким образом, трехслойный ПТК с биоактивным покрытием может быть предложен для использования в качестве каркаса для формирования *in situ* тка-

неинженерных конструкций кровеносных сосудов малого диаметра.

Авторы выражают благодарность В.А. Сургученко за участие в экспериментах с клеточными культурами, а также В.А. Рыжиковой за помощь в проведении доплерографических исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Das D, Noh I. Overviews of Biomimetic Medical Materials. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1064: 3–24. doi: 10.1007/978-981-13-0445-3\_1.
2. Weekes A, Bartnikowski N, Pinto N, Jenkins J, Meinent C, Klein TJ. Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts. *Acta Biomater*. 2022 Jan 15; 138: 92–111. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.012.
3. Wesolowski SA, Fries CC, Karlson KE, De Bakey M, Sawyer PN. Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. *Surgery*. 1961; 50: 91–96.
4. Лебедев ЛВ, Плотник ЛЛ, Смирнов АД. Протезы кровеносных сосудов. Л.: Медицина, 1981; 192. Lebedev LV, Plotnik LL, Smirnov AD. Protezy krovenosnykh sosudov. L.: Meditsina, 1981; 192.
5. Guan G, Yu C, Fang X, Guidoin R, King MW, Wang H, Wang L. Exploration into practical significance of integral water permeability of textile vascular grafts. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2021; 22808000211014007. doi: 10.1177/22808000211014007.
6. Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Voccasofchi F, Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 166. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166.
7. Fortin W, Bouchet M, Therasse E, Maire M, Héon H, Ajji A et al. Negative *In Vivo* Results Despite Promising *In Vitro* Data With a Coated Compliant Electrospun Polyurethane Vascular Graft. *J Surg Res*. 2022; 279: 491–504. doi: 10.1016/j.jss.2022.05.032.
8. Huang F, Sun L, Zheng J. *In vitro* and *in vivo* characterization of a silk fibroin-coated polyester vascular prosthesis. *Artif Organs*. 2008; 12: 932–941. doi: 10.1111/j.1525-1594.2008.00655.x.
9. Lee JH, Kim WG, Kim SS, Lee JH, Lee HB. Development and characterization of an alginate-impregnated polyester vascular graft. *J Biomed Mater Res*. 1997; 36: 200–208. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199708)36:2<200::aid-jbm8>3.0.co;2-o.
10. Lisman A, Butruk B, Wasiak I, Ciach T. Dextran/Albumin hydrogel sealant for Dacron(R) vascular prosthesis. *J Biomater Appl*. 2014; 28: 1386–1396. doi: 10.1177/0885328213509676.
11. Madhavan K, Elliott WH, Bonani W, Monnet E, Tan W. Mechanical and biocompatible characterizations of a readily available multilayer vascular graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101: 506–519. doi: 10.1002/jbm.b.32851.
12. Немец ЕА, Панкина АП, Сургученко ВА, Севастьянов ВИ. Биостабильность и цитотоксичность медицинских изделий на основе сшитых биополимеров. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 79–85. Nemets EA, Pankina AP, Surguchenko VA, Sevastianov VI. Bistability and cytotoxicity of medical devices based on cross-linked biopolymers. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 79–85. (In Russ.). doi: 10.15825/1995-1191-2018-1-79-85.
13. Глушкова ТВ, Овчаренко ЕА, Роголина НВ, Клышников КЮ, Кудрявцева ЮА, Барбараш ЛС. Дисфункции эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца. *Кардиология*. 2019; 59 (10): 49–59. Glushkova TV, Ovcharenko EA, Rogulina NV, Klyshnikov KYu, Kudryavtseva YuA, Barbarash LS. Dysfunction Patterns of Epoxy-Treated Tissue Heart Valves. *Kardiologiya*. 2019; 59 (10): 49–59. (In Russ.). doi: 10.18087/cardio.2019.10.n327.
14. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54: 13–36. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00240-x.
15. Новикова СП, Салохеидинова РР, Лосева СВ, Николашина ЛН, Левкина АЮ. Анализ физико-механических и структурных характеристик протезов кровеносных сосудов. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2012; 54 (4): 27–33. Novikova SP, Salokheidinova RR, Loseva SV, Nikolashina LN, Levkina AYU. Analysis of physico-mechanical and structural characteristics of vascular prostheses. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2012; 54 (4): 27–33.
16. Попова ИВ, Степанова АО, Сергеевичев ДС, Акулов АЕ, Захарова ИС, Покушалов АА и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга, в эксперименте *in vitro* и *in vivo*. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015; 19 (4): 63–71. Popova IV, Stepanova AO, Sergeevichev DS, Akulov AE, Zakharova IS, Pokushalov AA et al. Comparative study of three vascular grafts produced by electrospinning *in vitro* and *in vivo*. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2015; 19 (4): 63–71.
17. Chen X, Yao Y, Liu S, Hu Q. An integrated strategy for designing and fabricating triple-layer vascular graft with oriented microgrooves to promote endothelialization. *J Biomater Appl*. 2021; 36: 297–310. doi: 10.1177/08853282211001006.
18. Huang R, Gao X, Wang J, Chen H, Tong C, Tan Y, Tan Z. Triple-Layer Vascular Grafts Fabricated by Combined E-Jet 3D Printing and Electrospinning. *Ann Biomed Eng*. 2018; 46 (9): 1254–1266. doi: 10.1007/s10439-018-2065-z.
19. Liu K, Wang N, Wang W, Shi L, Li H, Guo F et al. A bio-inspired high strength three-layer nanofiber vascular graft with structure guided cell growth. *J Mater Chem B*. 2017; 5 (20): 3758–3764. doi: 10.1039/c7tb00465f.



20. Nemets EA, Surguchenko VA, Belov VYu, Xajrullina AI, Sevastyanov VI. Porous Tubular Scaffolds for Tissue Engineering Structures of Small Diameter Blood Vessels. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2023; 14: 400–407. doi: 10.1134/S2075113323020338.
21. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*: ГОСТ ISO 10993-5-2023. М.: Росийский институт стандартизации, 2023. *Izdeliya meditsinskikh izdeliy. Chast' 5. Issledovanie na tsitotoksichnost'*: metody *in vitro*: GOST ISO 10993-5-2023. М.: Rossiyskiy institut standartizatsii, 2023.
22. Blache U, Guerrero J, Güven S, Klar AS, Scherberich A. Microvascular networks and models: *in vitro* formation. *W. Holnthoner, A. Banfi, J. Kirkpatrick, H. Redl eds. Vascularization for tissue engineering and regenerative medicine. Reference series in biomedical engineering*. Springer, Cham. 2021: 345–383. doi: 10.1007/978-3-319-54586-8.
23. Григорьев АМ, Басок ЮБ, Кириллова АД, Сургученко ВА, Шмерко НП, Кулакова ВК и др. Криогенно-структурированный гидрогель на основе желатина как резорбируемая макропористая матрица для биомедицинских технологий. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (2): 83–93. Grigoriev AM, Basok YuB, Kirillova AD, Surguchenko VA, Shmerko NP, Kulakova VK et al. Cryogenically structured gelatin-based hydrogel as a resorbable macroporous matrix for biomedical technologies. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (2): 83–93. doi: 10.15825/1995-1191-2022-2-83-93.
24. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 2012; 12: 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.
25. Wang Z, Liu S, Guidoin R, Kodama M. Polyurethane vascular grafts with thorough porosity: does an internal or an external membrane wrapping improve their *in vivo* blood compatibility and biofunctionality? *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2004; 32 (3): 463–484. doi: 10.1081/bio-200027524.
26. Tara S, Kurobe H, Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Yi T et al. Well-organized neointima of large-pore poly(L-lactic acid) vascular graft coated with poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) prevents calcific deposition compared to small-pore electrospun poly(L-lactic acid) graft in a mouse aortic implantation model. *Atherosclerosis*. 2014; 237 (2): 684–691. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.030.

Статья поступила в редакцию 29.03.2024 г.  
The article was submitted to the journal on 29.03.2024