

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-2-127-138

ОСОБЕННОСТИ ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ С БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ: РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ЖИВОТНЫХ МОДЕЛЕЙ – ОТ КРЫС ДО ПРИМАТОВ (ПРОБЛЕМНАЯ СТАТЬЯ)

Л.В. Антонова, Е.А. Сенокосова, А.В. Миронов, А.Р. Шабает, Е.С. Сардин,
В.Г. Матвеева, Е.О. Кривкина, М.Ю. Ханова, Е.А. Торгунакова, Л.С. Барбараш

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

На рынке изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии до сих пор не существует эффективного сосудистого протеза диаметром менее 4 мм. Альтернативой сосудистого аналога артерий может стать тканеинженерный функционально активный сосудистый протез, обладающий пролонгированной резорбцией и способностью к регенерации, что позволило бы исключить повторные операции по замене несостоятельных сосудистых протезов. Полнота определения рисков несостоятельности биodeградируемых протезов сосудов малого диаметра, подвергаемых преclinical испытаниям, напрямую зависит от животной модели, выбранной для проведения подобных испытаний. В данной проблемной статье представлены итоги полного цикла преclinical испытаний разработанного в НИИ КПССЗ сосудистого протеза малого диаметра и сделаны выводы об эффективности и целесообразности использования различных животных моделей при тестировании протезов сосудов малого диаметра с биodeградируемой составляющей.

Ключевые слова: тканевая инженерия, протез сосуда малого диаметра, преclinical испытания.

PRECLINICAL EVALUATION OF TISSUE-ENGINEERED VASCULAR GRAFTS WITH BIODEGRADABLE COMPONENTS: ASSESSING THE EFFECTIVENESS OF ANIMAL MODELS FROM RATS TO PRIMATES

L.V. Antonova, E.A. Senokosova, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, E.S. Sardin, V.G. Matveeva,
E.O. Krivkina, M.Yu. Khanova, E.A. Torgunakova, L.S. Barbarash

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

Currently, there are no highly effective small-diameter (≤ 4 mm) grafts on the market for cardiovascular surgery. Tissue-engineered, functionally active vascular grafts with prolonged resorption and regeneration capacity have the potential to serve as alternatives to traditional arterial grafts. These bioengineered grafts could eliminate the need for repeated surgical interventions to replace failed grafts. The accuracy of assessing the risks of failure in biodegradable small-diameter vascular grafts (SDVGs) during preclinical trials is highly dependent on the choice of animal model. This article presents the results of comprehensive preclinical trials conducted on an SDVG developed at the Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. Based on these findings, the study evaluates the effectiveness and feasibility of different animal models for testing biodegradable SDVGs.

Keywords: tissue engineering, small-diameter vascular graft, preclinical trials.

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна. Адрес: 650002, Кемерово, б-р Акад. Л.С. Барбараша, 6.
Тел. (999) 648-50-41. E-mail: antonova.la@mail.ru

Corresponding author: Larisa Antonova. Address: 6, Bul'var im. Akademika L.S. Barbarasha, Kemerovo, 650002, Russian Federation.
Phone: (999) 648-50-41. E-mail: antonova.la@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время область применения искусственных заменителей отдельных участков органов и систем человеческого организма имеет тренд к серьезному росту с ежегодным увеличением объема рынка медицинских изделий. Однако использование синтетических материалов сопряжено с рядом осложнений, над устранением которых трудится вся мировая научная и медицинская общественность [1].

Несмотря на насыщенность рынка изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии, до сих пор не существует эффективного сосудистого протеза диаметром менее 4 мм [2]. При этом количество проводимых хирургических вмешательств на артериях малого калибра только в Российской Федерации обуславливает ежегодную потребность в сосудистых протезах малого диаметра порядка 80 тысяч штук [3].

Альтернативой сосудистого аналога артерий может стать тканеинженерный функционально активный сосудистый протез, обладающий пролонгированной резорбцией и способностью к регенерации, что позволило бы исключить повторные операции по замене несостоятельных сосудистых протезов. Актуальность вхождения тканевой инженерии в нишу создания медицинских изделий давно и незыблемо неоспорима хотя бы потому, что тканеинженерные подходы призваны и могут максимально приблизить биосовместимые свойства создаваемых конструкций к уровню биосовместимости нативных тканей [4, 5].

Так, существует два популярных подхода к изготовлению тканеинженерных сосудистых протезов [6]. Первый подход – это создание клеточнозаселенного протеза в пробирке в условиях имитации кровотока и с использованием в идеале собственных клеток и белков пациента [7–9]. Второй подход – выращивание протеза непосредственно в организме на основе функционально активного высокопористого каркаса, способного задавать привлекаемым сосудистым клеткам вектор развития в сторону формирования полноценной новообразованной сосудистой ткани [10–12]. При этом каркас протеза в идеале должен полностью рассасываться со временем [13, 14].

Для придания протезам функциональной активности и с целью достижения полноценного ремоделирования используются различные биологически активные компоненты, но предпочтение все же за белками с высокой проангиогенной активностью [1, 15]. При этом очень важно понимать синергизм взаимодействия биологически активных компонентов, которые вводятся в состав протеза.

Сосудистые протезы малого диаметра классифицируются как медицинские изделия с высокой степенью риска, относясь к третьему классу [16]. Поэтому к данному виду изделий предъявляются самые высокие требования как в части биосовмес-

тимости, так и в плане долгосрочной эффективности. После получения на этапе *in vitro* доказательств соответствия разработанного изделия требуемому уровню биосовместимости и безопасности исследователи переходят к преклиническим испытаниям прототипов изделия на животной модели. Именно результаты преклинических испытаний являются основополагающими, так как позволяют в условиях целостного организма оценить биосовместимость и эффективность разработанной конструкции. Полнота определения рисков несостоятельности биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра, подвергаемых преклиническим испытаниям, напрямую зависит от животной модели, выбранной для проведения подобных испытаний.

В НИИ КПССЗ был разработан сосудистый протез малого диаметра, изготовленный из биодеградируемых полимеров с длительным сроком резорбции, содержащий в своем составе проангиогенные факторы: VEGF, bFGF и SDGF-1a, послойно инкорпорированные в стенку протеза в процессе электроспиннинга. VEGF активирует и поддерживает миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку эндотелиальных клеток, увеличивает продукцию оксида азота и усиливает сосудистую проницаемость [17]. bFGF в свою очередь стимулирует миграцию, пролиферацию и выживание эндотелиальных и гладкомышечных клеток, обеспечивает созревание кровеносных сосудов [18]. SDF-1a является хемоаттрактантом для эндотелиальных клеток, стимулирует формирование длинных и разветвленных капиллярных сетей, а также усиливает миграцию мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, которые способны дифференцироваться в гладкомышечном направлении внутри сосудистой стенки [19, 20]. После полномасштабного тестирования данных протезов на этапе *in vitro* и получения доказательства их биосовместимости, функциональной эффективности и приемлемости физико-механических и структурных характеристик мы перешли к этапу преклинических испытаний на лабораторных животных. Именно результаты преклинических испытаний являются основополагающими, так как позволяют в условиях целостного организма проверить биосовместимость и эффективность разработанной конструкции.

И далее на разных животных моделях были получены крайне противоречивые результаты, которые привели к необходимости пересмотра не только технологии изготовления протезов, но и выбора животной модели для проведения итоговых преклинических испытаний.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДЕЛИ КРЫСЫ В ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ ПРОТЕЗОВ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Самой популярной и доступной животной моделью во всем мире для проведения преclinical испытаний является модель крысы, а имплантация протезов сосудов диаметром 2 мм и менее проводится в брюшную часть аорты крыс. Это превалирующий вид имплантаций при тестировании протезов сосудов малого диаметра [21–23].

Разработанные сосудистые протезы на основе поликапролактона и полигидроксibuтирата/валерата с инкорпорированными в состав протезов проангиогенными факторами были имплантированы в брюшную часть аорты крыс на 12 месяцев. Диаметр протезов составил 1,5–2 мм. Проходимость данных протезов спустя 12 месяцев имплантации близилась к 100% даже при отсутствии послеоперационной антитромбоцитарной терапии (рис. 1) [24–26].

Заселение клетками пористой стенки биодеградируемого протеза после его имплантации в сосудистое русло происходило благодаря естественным процессам ремоделирования имплантата с формированием трехслойной новообразованной сосудистой ткани, схожей со строением стенки нативного сосуда [25, 26]. В стенке ряда протезов контрольной группы, не содержащих проангиогенные факторы, выявлено умеренное хроническое гранулематозное воспаление. Известная склонность крыс к быстрой

эндотелизации и невозможность вшить протез длиной более 1 см в основную массу обеспечивает благоприятный исход долгосрочных имплантаций вне зависимости от использованного материала для создания протезов [27]. Поэтому результаты преclinical испытаний на модели крысы вряд ли можно считать основополагающими как в плане выявления всех рисков несостоятельности разработанного медицинского изделия, так и в плане прогнозирования эффективности данного медицинского изделия у людей.

Тем не менее крысиная модель оказалась весьма показательной в плане оценки рисков кальцификации сосудистых протезов (рис. 2) [24].

Через выраженность сформировавшейся кальцификации косвенно можно судить о сохранности функциональной составляющей сосудистых протезов. На примере сравнительного анализа полученной кальцификации разработанных нами протезов мы получили косвенное доказательство того, что именно присутствие комплекса проангиогенных факторов в составе протезов позволило синхронизировать тканеобразование, предотвратить клеточный апоптоз и как следствие значительно уменьшить выраженность кальцификации стенок протезов, что в свою очередь вносит серьезную лепту в долгосрочную эффективность протезов в случае сохранения их проходимости (рис. 2). Также выявлено, что присутствие проангиогенных факторов в составе биодеградируемых сосудистых протезов и их высвобождение опосредованно снижали частоту развития гранулематозного воспа-

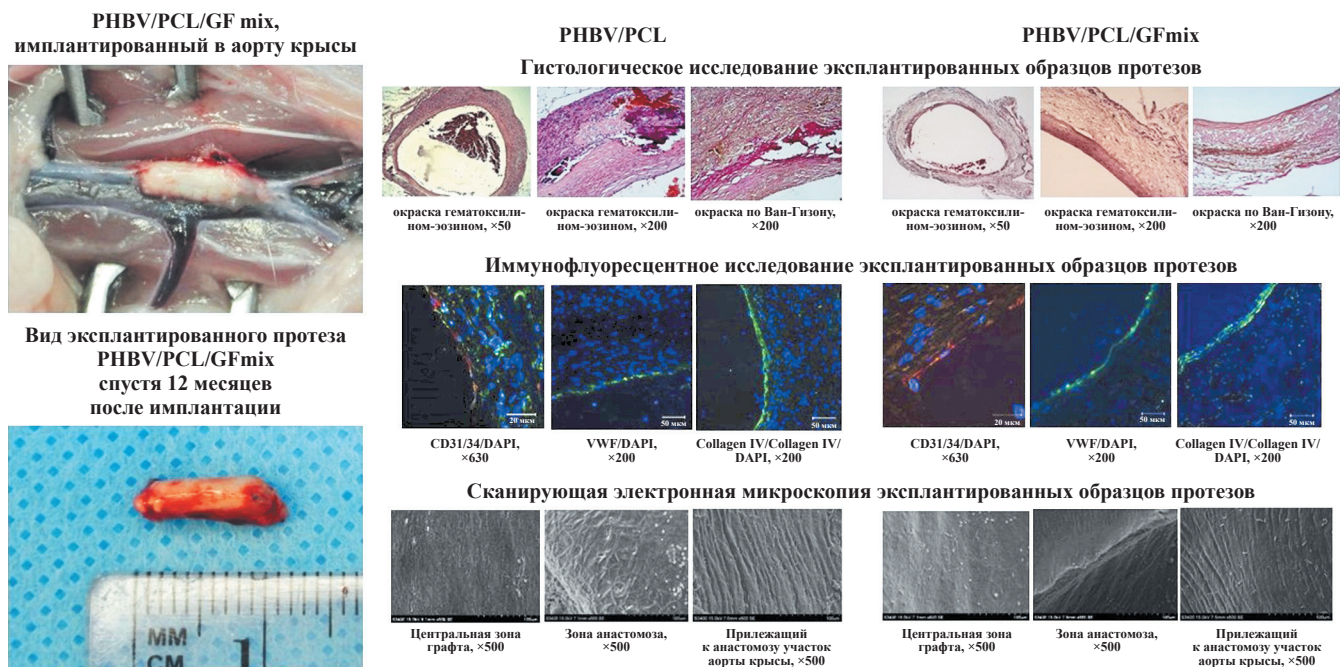


Рис. 1. Результаты морфологического исследования сосудистых протезов PHBV/PCL с комплексом проангиогенных факторов (GFmix) и без таковых, имплантированных в аорту крыс на 12 месяцев [26]

Fig. 1. Results of morphological study of PHBV/PCL vascular grafts with and without a proangiogenic factor complex (GFmix) implanted in rat aorta for 12 months [26]

ления и кальцификации протезов [24]. На модели крысы параллельно были получены новые знания о том, что при отсутствии кровотока в тромбированных биodeградируемых сосудистых протезах не возникает кальцификации стенки, что косвенно доказывает факт причастности крови, как агрессивной биологической среды, и пульсирующего потока к запуску механизмов кальцификации стенки сосудистых протезов в случае их проходимости [24]. Данные обнадеживающие результаты сподвигли на проведение преclinical испытаний сосудистых протезов на модели крупных лабораторных животных.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДЕЛИ ОВЦЫ В ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ ПРОТЕЗОВ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

В качестве модели крупного лабораторного животного для тестирования биodeградируемых протезов сосудов малого диаметра выбраны овцы. Известно, что овцы считаются оптимальной животной моделью для оценки роста, проходимости, эндотелизации, тромборезистентности и постимплантационной визуализации сосудистых протезов. То, что овцы быстро достигают своих максимальных размеров и далее не растут, делает их удобной моделью для долговременной имплантации протезов. Длинная шея и легкий доступ к сонной артерии позволяют имплантировать длинные протезы. Овцы пригодны для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их крови к тромбообразованию, а сосудов – к кальцификации [28–30]. Данные особенности позволяют провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов на предмет их дегенерации *in vivo*.

В итоге на двух животных моделях (крысы и овцы) были получены настолько разные и неожиданные результаты, что в дальнейшем пришлось значительно менять технологию изготовления протеза и серьезно изучать гемостазиологический профиль овец, сравнивая его с профилем пациентов с сердеч-

но-сосудистой патологией, чтобы скорректировать пред-, интра- и послеоперационную антикоагулянтную и антиагрегантную терапию.

В пилотных исследованиях на овцах в раннем послеоперационном периоде в большом проценте случаев был получен тромбоз биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix диаметром 4 мм, имплантированных в сонную артерию. Запуск тромбообразования был спровоцирован пористостью внутренней поверхности протеза, что подтверждено ультразвуковым и ангиографическим исследованием проходимости сосудистых протезов сразу после запуска кровотока: был четко детектирован момент формирования тромба протезов за счет быстрого имbibирования форменными элементами крови стенок протезов на всем протяжении, утолщения стенок и быстрого сужения просвета протеза по всей длине (рис. 3).

Данный факт привел к необходимости повышения тромборезистентности протезов, что было реализовано через создание на поверхности протезов PHBV/PCL/GFmix гидрогелевого атромбогенного лекарственного покрытия, позволяющего в течение 20 дней после имплантации защищать поверхность протезов от тромбообразования [31].

Дополнительно был изучен вопрос, за счет каких аспектов гемостаза овец реализуется столь масштабная склонность к тромбообразованию [32]. Выявлено, что тромбоциты овец имели повышенный ответ на индукцию АДФ, но практически не отвечали на индукцию адреналином. Коагуляционный гемостаз овец характеризовался повышенной активностью протромбинового комплекса, укорочением тромбинового времени при сопоставимых значениях АЧТВ и фибриногена. При этом у овец обнаружено выраженное снижение активности противосвертывающей и фибринолитической систем по сравнению с пациентами с ИБС. При оценке динамики образования сгустка у животных фаза инициации происходила быстрее, а плотность сгустка превышала таковую

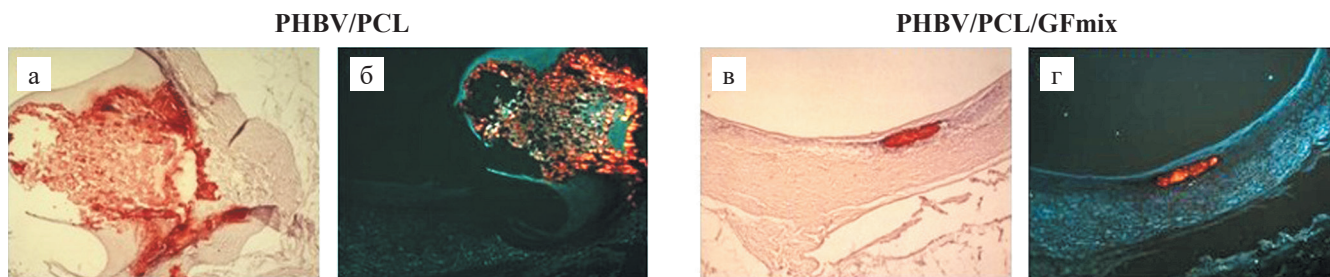


Рис. 2. Световая (а, в) и флуоресцентная (б, г) микроскопия срезов эксплантированных сосудистых протезов PHBV/PCL и PHBV/PCL/GFmix: окраска ализариновым красным С (ярко-красный цвет кристаллов Са) и Dapi (синий цвет ядер клеток), $\times 100$

Fig. 2. Light (a, v) and fluorescence (б, г) microscopy of slices of PHBV/PCL and PHBV/PCL/GFmix vascular grafts retrieved: staining with alizarin red S (bright red color of Ca crystals) and Dapi (blue color of cell nuclei), $100\times$

у пациентов [32]. Данные находки позволили нам скорректировать пред-, интра- и послеоперационную антиагрегантную и антикоагулянтную терапию, которая включила в себя: перед операцией – однократный прием нагрузочной дозы клопидогрела накануне операции; в процессе имплантации протезов – внутривенное введение нефракционированного гепарина перед пережатием сонной артерии и наложением анастомозов, а также после запуска кровотока; в течение 30 дней после имплантации протезов (при условии проходимости протезов) – подкожное введение низкомолекулярного гепарина в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя, клопидогрел в стандартной дозировке *per os* в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Тем не менее формирование дополнительного атромбогенного лекарственного покрытия протезов и скорректированная терапия позволили увеличить проходимость сосудистых протезов с 0 до 50% спустя 18 месяцев имплантации протезов в сонные артерии овец [33]. Полученный процент проходимости сложно назвать убедительным для клиницистов. Тромбоз протезов в половине случаев не позволяет констатировать их потенциальную пригодность для клинического использования, несмотря на то что и само оперативное

вмешательство на сосудах у овец может провоцировать запуск тромбообразования, что было доказано ранее на примере аутоартериальной имплантации сонной артерии овцы [34]. Поэтому с учетом высокой склонности овец к тромбообразованию стало интересно выяснить, каковы будут результаты проходимости после имплантации в сонные артерии овец синтетических протезов, широко используемых в сосудистой хирургии в настоящее время.

Для этого 6 животным в сонные артерии были имплантированы синтетические протезы Gore-Tex® диаметром 4 мм, которые достаточно успешно используются в клинике. Все протезы Gore-Tex® подверглись тромбообразованию через сутки после имплантации. Однако для оценки реакции окружающих тканей и формирования кальцификатов было решено эксплантировать тромбированные протезы через 6 месяцев. Выявлено, что спустя 6 месяцев имплантации стенка тромбированных сосудистых протезов Gore-Tex® подверглась массивной кальцификации, несмотря на отсутствие кровотока, что предположительно можно объяснить недостаточной биосовместимостью материала, провоцирующего патологическую реакцию окружающих тканей, в том числе через апоптоз и гибель клеток моноцитарно-макрофагального и



Рис. 3. Пилотные преклинические испытания сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix на модели овцы

Fig. 3. Pilot preclinical trials of PHBV/PCL/GFmix vascular grafts in a sheep model

фибробластического ряда, способных проникать к стенке протеза со стороны адвентиции в процессе его ремоделирования [33, 35]. Несмотря на известную агрессивность овечьей модели в плане кальцификации, в разработанных нами протезах PHBV/PCL/GFmix с лекарственным покрытием кальцификация практически не развивалась. Небольшой кальцификат выявлен в стенке лишь одного эксплантированного проходимого графта спустя 1,5 года после имплантации. Состав кальциевого депозита соответствовал составу зрелых кальцификатов в биологических тканях [33, 35].

Вторая неожиданная находка заключалась в крайне быстрой резорбции полимерного каркаса сосудистого протеза с формированием аневризм в стенках всех проходимых протезов. Начало формирования аневризм зафиксировано спустя 1,5 месяца имплантации. Апогей аневризмообразования пришелся на период 6 месяцев, когда диаметр сосудистых протезов увеличился с 4,0 мм до 2,2 см и сохранялся таковым вплоть до окончания срока имплантации, общая продолжительность которой составила 18 месяцев [33, 35]. При морфологическом исследовании эксплантированных образцов протезов подтверждена полная эндотелизация их внутренней поверхности, формирование новообразованной сосудистой ткани

на месте резорбированных трубчатых каркасов (неинтима, адвентиция) и минимальная кальцификация стенок. Однако выявлено отсутствие эластических волокон и истинных гладкомышечных клеток в составе ремоделированных стенок протезов (рис. 4) [33, 35].

Следует отметить, что основные публикации по тестированию на модели овцы биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра стали появляться с 2020 года. Авторы публикаций также стали представлять результаты, свидетельствовавшие о раннем аневризмообразовании в стенках сосудистых протезов, изготовленных из таких биodeградируемых полимеров, как поликапролактон, полилактид, термопластичный полиуретан [36, 37]. Однако ряд авторов представили весьма впечатляющие результаты по имплантации в коронарные артерии овец биodeградируемых сосудистых протезов диаметром 4 мм, содержащих нитиноловый микрокаркас, что позволило избежать проблемы аневризмообразования [38].

Таким образом, модель овцы выявила дополнительный риск несостоятельности протезов в виде раннего формирования аневризм за счет гораздо более быстрой резорбции биodeградируемых каркасов протезов, значимо отличавшейся от скорости их резорбции на модели крысы. А отсутствие эластина и

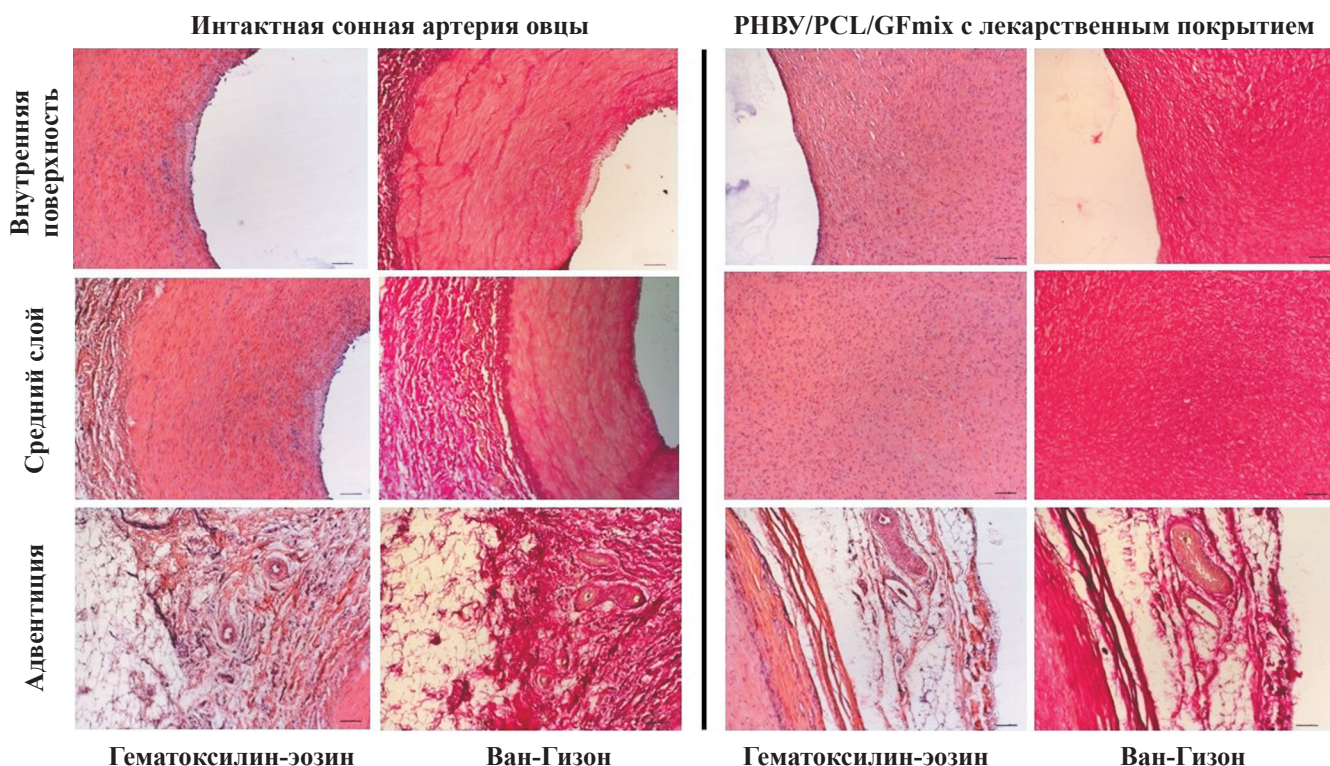


Рис. 4. Сравнительная гистологическая картина сонной артерии овцы и сосудистого протеза PHBV/PCL/GFmix с лекарственным покрытием спустя 18 месяцев после имплантации в сонную артерию овцы. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Comparative histological picture of sheep carotid artery and drug-eluting PHBV/PCL/GFmix vascular graft at 18 months of implantation into a sheep carotid artery. Scale bar 100 µm

истинных гладкомышечных клеток в совокупности со скорой биорезорбцией полимерного каркаса привело к необходимости менять технологию изготовления сосудистого протеза с целью формирования антианевризматической защиты.

При поиске способов предотвращения аневризматического расширения стенок биodeградируемого сосудистого протеза нами было опробовано три подхода.

1. Усиление внешнего контура протеза полимерной спиралью, выполненной методом экструзии.
2. Создание на внешней поверхности протеза методом электроспиннинга усиливающего слоя из полимера – синтетического эластомера с низкой скоростью биорезорбции.
3. Введение синтетического эластомера с низкой скоростью биорезорбции в состав трубчатого биodeградируемого каркаса в процессе изготовления сосудистого протеза методом электроспиннинга.

Первый подход привел к значительному утяжелению конструкции и ухудшению хирургических свойств протеза в виде затруднения во время наложения анастомозов. При втором подходе не удалось достичь интимного соединения основного биodeградируемого каркаса протеза с внешним слоем из синтетического полимера, что приводило к расслоению протеза как до, так и в процессе имплантации. Данный момент провоцировал тромбирование протезов. Поэтому третьим решением явилось введение синтетического эластомера в состав основного полимерного каркаса в процессе изготовления сосудистого протеза методом электроспиннинга. Такой подход позволил получить цельный полимерный каркас с сохранением концепции функциональной активности за счет высвобождения инкорпорированных проангиогенных факторов и способности к полноценному ремоделированию за счет пористости полимерного каркаса и сохранения способности к его частичной биodeградации.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДЕЛИ ПРИМАТА В ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ ПРОТЕЗОВ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Для завершающих преclinical испытаний была выбрана модель приматов – модель, максимально приближенная к человеку, и следовательно, способная явиться истиной в последней инстанции в плане выявления окончательных рисков несостоятельности сосудистого протеза с биodeградируемой составляющей. Выбор пал на павианов, как на самых крупных приматов, которых готовы предоставить для эксперимента российские питомники. Ожидалось, что схожесть обмена веществ, питания, строения организма, функциональной активности свертывающей системы крови примата с человеком позволит избежать неоправданных рисков, связанных

с индивидуальной особенностью животной модели, с которой мы столкнулись на модели овцы. Была изучена доступная литература по анатомии и строению сосудистой системы павианов [39, 40]. В итоге для имплантации протезов использована бедренная артерия, которая наиболее удобна для имплантации протезов сосудов диаметром менее 4 мм без угрозы сопровождения рисков глобальной ишемии конечности в случае тромбоза просвета протеза. Следует оговориться, что у взрослых самцов павианов возрастом от 9 до 17 лет и весом от 18 до 38 кг найти бедренные артерии диаметром более 3,2 мм невозможно. Поэтому павианы были отобраны загодя, методом УЗИ определен диаметр бедренных артерий каждого. Сосудистые протезы готовились индивидуально под каждого павиана, чтобы в процессе имплантации не столкнуться с несоответствием диаметров протеза и артерии, что могло спровоцировать тромбоз протеза.

Протезы сосудов диаметром 3,0–3,5 мм и длиной 3,0–4,5 см были имплантированы в бедренные артерии взрослых самцов павианов ($n = 6$) сроком на 6 месяцев (рис. 5).

Схема сопровождающей пред-, интра- и послеоперационной антитромбоцитарной терапии была аналогична схеме, примененной на овцах.

Расслаивания стенки протезов не наблюдалось как под воздействием хирургических манипуляций во время имплантации, так и по истечении 6 месяцев после имплантации. По результатам УЗИ итоговая проходимость протезов сосудов спустя 6 месяцев после имплантации составила 83,3%. Ранний тромбоз одного протеза случился у одного павиана с сопутствующей патологией (избыточная масса тела, в 2 раза превысившая возрастную норму; дыхательная недостаточность, аритмия).

При гистологическом и иммунофлуоресцентном исследовании эксплантированных образцов протезов выявлена полноценная эндотелизация внутренней поверхности протезов на всем протяжении, неоинтима без признаков гиперплазии, неоадвентиция со всеми типичными структурными элементами, а также миграция клеток в толщу стенок протезов (рис. 6). Проявления воспаления и кальцификации отсутствовали.

Огромным плюсом явилось то, что для выполнения иммунофлуоресцентных исследований эксплантированных образцов протезов окраска человеческими флуоресцентными антителами оказалась взаимозаменяемой, что, безусловно, очень удобно, так как первичные специфические антитела для приматов практически отсутствуют на рынке. Идентичность специфических антител человека с антителами приматов позволила значительно расширить морфологический анализ эксплантированных образцов, поскольку панели антител для человека гораздо шире, чем для любой другой известной животной модели.

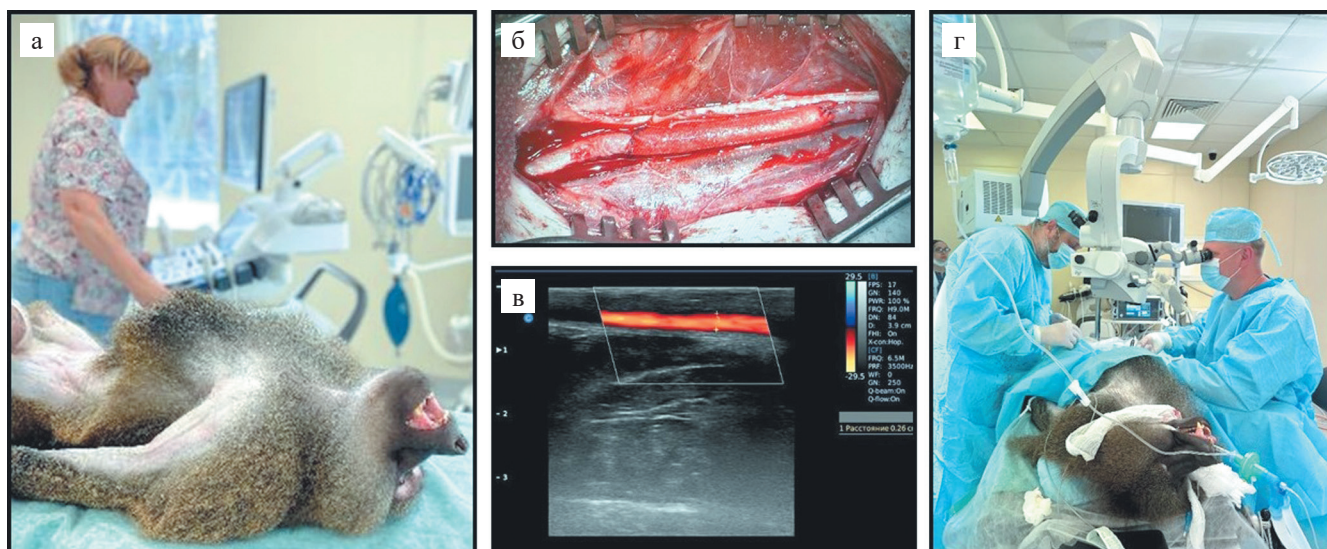


Рис. 5. Преклинические испытания сосудистых протезов малого диаметра на модели примата: а – оценка диаметра бедренных артерий методом УЗИ; б – вид сосудистого протеза, имплантированного в бедренную артерию павиана; в – подтверждение проходимости имплантированного сосудистого протеза методом УЗИ; г – момент имплантации сосудистого протеза

Fig. 5. Preclinical trials of small-diameter vascular grafts on a primate model: а – ultrasound assessment of femoral artery diameter; б – view of the implanted vascular graft in the femoral artery of a baboon; в – ultrasound confirmation of implanted graft patency; г – vascular graft implantation procedure

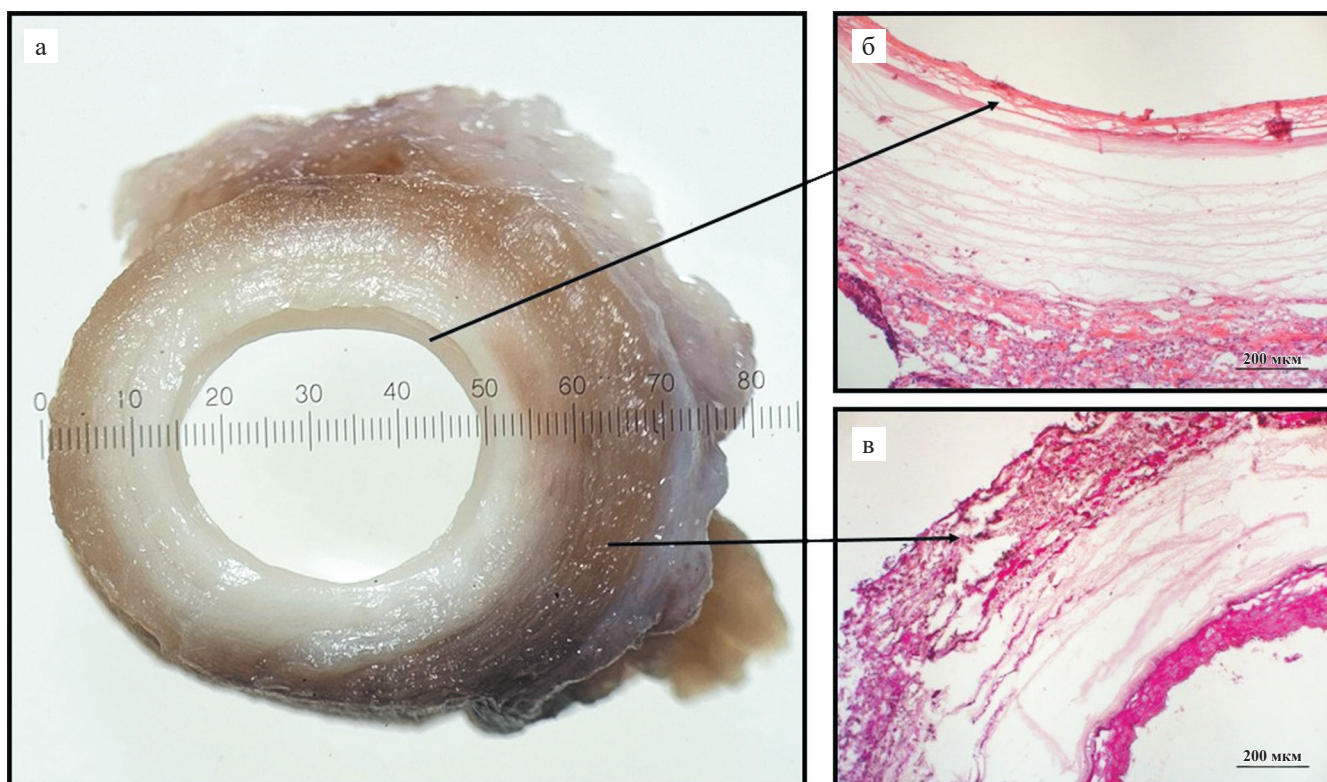


Рис. 6. Результаты морфологического исследования сосудистых протезов малого диаметра спустя 6 месяцев после имплантации в бедренные артерии павианов: а – спектроскопия поперечного среза эксплантированного протеза, $\times 10$; б – окраска гематоксилином-эозином, $\times 100$; в – окраска по Ван-Гизону, $\times 100$

Fig. 6. Results of morphological analysis of small-diameter vascular grafts at 6 months post-implantation in the femoral arteries of baboons: а – spectroscopy of a cross-section of the retrieved graft ($\times 10$); б – hematoxylin-eosin staining ($\times 100$); в – Van Gieson's staining ($\times 100$)

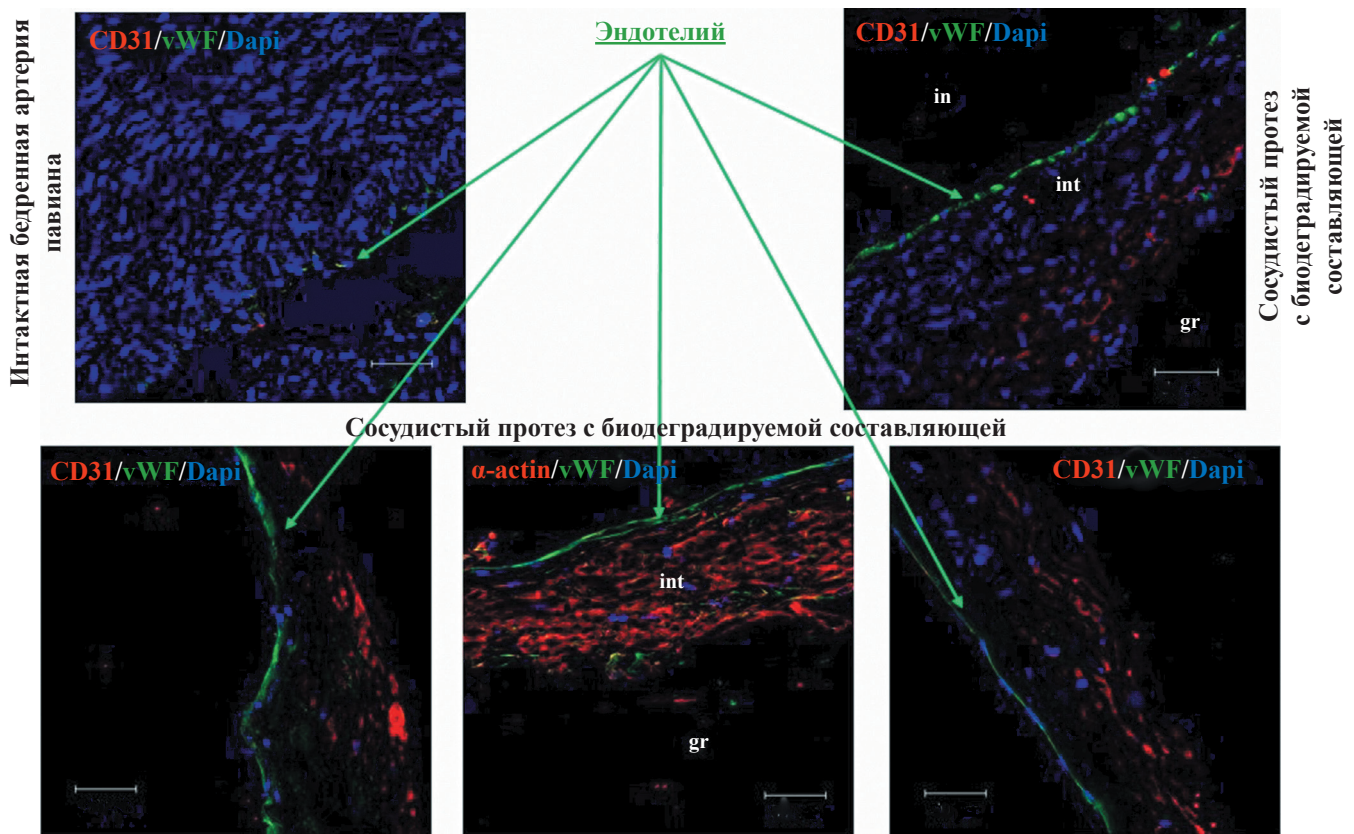


Рис. 7. Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированного сосудистого протеза малого диаметра и контрлатеральной intactной бедренной артерии павиана. Размер масштабной линейки 50 мкм

Fig. 7. Immunofluorescence results of a retrieved small-diameter vascular graft and a contralateral intact femoral artery of a baboon. Scale bar 50 μm

Все павианы, участвовавшие в эксперименте, — это взрослые и возрастные самцы. Средняя продолжительность жизни павианов в дикой природе составляет около 30 лет. В условиях неволи этот показатель значимо ниже. Поэтому экспериментальная группа павианов уже обладала преморбидным фоном, свойственным для возрастных особей.

Так, тромбоз одного протеза случился у самца 15 лет с ожирением, аритмией и дыхательной недостаточностью.

Еще у одного самого возрастного павиана возрастом 17 лет выявлена гипертрофия стенки бедренной артерии на всем протяжении и прерывистый эндотелиальный слой. При сравнении качества эндотелизации имплантированного данному павиану сосудистого протеза с качеством эндотелизации собственной intactной контрлатеральной бедренной артерии обнаружено, что эндотелизация внутренней поверхности протеза превосходила естественную эндотелизацию intactной бедренной артерии, что косвенно подтвердило эффективность и активность инкорпорированных в состав протеза проангиогенных факторов (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Так чему же нас научил полученный опыт?

1. Полнота определения рисков несостоятельности биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра, подвергаемых преclinical испытаниям, напрямую зависит от животной модели, выбранной для проведения подобных испытаний.
2. Модель крысы не позволяет получить истинную картину долгосрочной проходимости сосудистых протезов в силу склонности крыс к быстрой эндотелизации, невозможности имплантировать длинные протезы в аорту крыс, а также несоотнесимости данной модели с человеком. При этом модель крысы хороша в плане оценки склонности протезов сосудов к кальцификации.
3. Модель овцы неоправданно агрессивна в плане склонности к тромбообразованию, что заставляет менять технологию изготовления медицинского изделия в направлении усиления атромбогенных свойств. В итоге гемосовместимые свойства изделия адаптируются не под гемостазиологический профиль человека, а под таковой профиль лабораторного животного. Однако большим плюсом является то, что только на данной мо-

- дели выявлен факт ускоренной биodeградации полимеров, повлекший формирование аневризм в стенках протезов на всем протяжении. При этом по целому ряду литературных данных использованные полимеры не должны резорбироваться ранее чем через 3 года. Овечья модель весьма агрессивна в плане кальцификации. Поэтому получение низкого процента кальцификации стенки разработанных протезов свидетельствует об их высокой биосовместимости.
4. Модель приматов, на наш взгляд, явилась самой сбалансированной как в плане правдивой оценки долгосрочной проходимости и ремоделирования, так и в плане чувствительности к интра- и постоперационной антитромбоцитарной терапии. В случае использования возрастных животных, преморбидный фон которых схож с таковым у пожилых пациентов с сердечно-сосудистой патологией, оценка долгосрочной эффективности сосудистых протезов проходит в условиях, максимально приближенных к условиям будущих клинических испытаний на человеке. Идентичность специфических антител человека с антителами приматов позволяет значимо расширить морфологический анализ эксплантированных образцов протезов.

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

- Nelson RA, Rhee EK, Alaeddine M, Nikkhah M. Advances in Biomaterials for Promoting Vascularization. *Curr Stem Cell Rep.* 2022; 8: 184–196. doi: 10.1007/s40778-022-00217-w.
- Naegeli KM, Kural MH, Li Yu, Wang J, Hugentobler EA, Niklason LE. Bioengineering Human Tissues and the Future of Vascular Replacement. *Circ Res.* 2022 Jun 24; 131 (1): 109–126. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319984.
- Бокерия ЛА, Милюевская ЕБ, Прянишников ВВ, Юрлов ИА, Кудзоева ЗФ. Сердечно-сосудистая хирургия – 2021. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М: НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, 2022; 310. Bokeriya LA, Milievskaya EB, Pryanishnikov VV, Yurlov IA, Kudzoeva ZF. Serdechno-sosudistaya khirurgiya – 2021. Bolezni i vrozhdennye anomalii sistemy krovoobrashcheniya. M: NMITS SSKh im. A.N. Bakuleva, 2022; 310.
- Malektaj H, Nour S, Imani R, Siadati MH. Angiogenesis induction as a key step in cardiac tissue Regeneration: From angiogenic agents to biomaterials. *Int J Pharm.* 2023 Aug 25; 643: 123233. doi: 10.1016/j.ij-pharm.2023.123233.
- Watanabe T, Sassi S, Ulziibayar A, Hama R, Kitsuka T, Shinoka T. The Application of Porous Scaffolds for Cardiovascular Tissues. *Bioengineering (Basel).* 2023 Feb 10; 10 (2): 236. doi: 10.3390/bioengineering10020236.
- Tan W, Boodagh P, Selvakumar PP, Keyser S. Strategies to counteract adverse remodeling of vascular graft: A 3D view of current graft innovations. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Jan 10; 10: 1097334. doi: 10.3389/fbioe.2022.1097334.
- Robotti F, Franco D, Bänninger L, Wyler J, Starck CT, Falk V et al. The influence of surface micro-structure on endothelialization under supraphysiological wall shear stress. *Biomaterials.* 2014 Oct; 35 (30): 8479–8486. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.046.
- Cai Q, Liao W, Xue F, Wang X, Zhou W, Li Y, Zeng W. Selection of different endothelialization modes and different seed cells for tissue-engineered vascular graft. *Bioact Mater.* 2021 Feb 6; 6 (8): 2557–2568. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.12.021.
- Kojima T, Nakamura T, Saito J, Hidaka Yu, Akimoto T, Inoue H et al. Hydrostatic pressure under hypoxia facilitates fabrication of tissue-engineered vascular grafts derived from human vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Acta Biomater.* 2023 Nov; 171: 209–222. doi: 10.1016/j.actbio.2023.09.041.
- Stowell CET, Wang Ya. Quickening: Translational design of resorbable synthetic vascular grafts. *Biomaterials.* 2018 Aug; 173: 71–86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.05.006.
- Tang Y, Yin L, Gao S, Long X, Du Z, Zhou Y et al. A small-diameter vascular graft immobilized peptides for capturing endothelial colony-forming cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Apr 10; 11: 1154986. doi: 10.3389/fbioe.2023.1154986.
- Zulkifli MZA, Nordin D, Shaari N, Kamarudin SK. Overview of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel).* 2023 May 23; 15 (11): 2418. doi: 10.3390/polym15112418.
- Kim JY, Kim JI, Park CH, Kim CS. Design of a modified electrospinning for the in-situ fabrication of 3D cotton-like collagen fiber bundle mimetic scaffold. *Materials Letters.* 2019 Feb 1; 236: 521–525. doi: 10.1016/j.matlet.2018.10.087.
- Di Francesco D, Pigliafreddo A, Casarella S, Di Nunno L, Mantovani D, Boccafroschi F. Biological Materials for Tissue-Engineered Vascular Grafts: Overview of Recent Advancements. *Biomolecules.* 2023 Sep 14; 13 (9): 1389. doi: 10.3390/biom13091389.
- Xie X, Wu Q, Liu Y, Chen C, Chen Z, Xie C et al. Vascular endothelial growth factor attenuates neointimal hyperplasia of decellularized small-diameter vascular grafts by modulating the local inflammatory response.

- Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Dec 20; 10: 1066266. doi: 10.3389/fbioe.2022.1066266.
16. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н, г. Москва «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий». Регистрационный № 24852. Зарегистрирован в Минюсте РФ 9 июля 2012 г. Дата подписания: 06.06.2012. Опубликовано: 23.10.2012. Вступает в силу: 04.11.2012. *Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii ot 6 iyunya 2012 g. № 4n, g. Moskva «Ob utverzhdenii nomenklaturnoy klassifikatsii meditsinskikh izdeliy»*. Registratsionnyy № 24852. Zaregistririvan v Minyuste RF 9 iyulya 2012 g. Data podpisaniya: 06.06.2012. Opublikovan: 23.10.2012. Vstupayet v silu: 04.11.2012.
 17. *Thanigaimani S, Kichenadasse G, Mangoni AA*. The emerging role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vascular homeostasis: Lessons from recent trials with anti-VEGF drugs. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011 May; 9 (3): 358–380. doi: 10.2174/157016111795495503.
 18. *Yang X, Liaw L, Prudovsky I, Brooks PC, Vary C, Oxburgh L, Friesel R*. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep.* 2015 Jun; 17 (6): 509. doi: 10.1007/s11883-015-0509-6.
 19. *Salcedo R, Oppenheim JJ*. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation.* 2003 Jun; 10 (3–4): 359–370. doi: 10.1038/sj.mn.7800200.
 20. *Schober A*. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Nov; 28 (11): 1950–1959. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161224.
 21. *Zhu M, Wu Y, Li W, Dong X, Chang H, Wang K et al*. Biodegradable and elastomeric vascular grafts enable vascular remodeling. *Biomaterials.* 2018 Nov; 183: 306–318. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.063.
 22. *Wu P, Wang L, Li W, Zhang Y, Wu Y, Zhi D et al*. Construction of vascular graft with circumferentially oriented microchannels for improving artery regeneration. *Biomaterials.* 2020 Mar 4; 242: 119922. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119922.
 23. *Navarro RS, Jiang L, Ouyang Y, Luo J, Liu Z, Yang Y et al*. Biomimetic tubular scaffold with heparin conjugation for rapid degradation in *in situ* regeneration of a small diameter neoartery. *Biomaterials.* 2021 Jul; 274: 120874. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120874.
 24. *Antonova LV, Sevostyanova VV, Mironov AV, Krivkina EO, Velikanova EA, Matveeva VG et al*. *In situ* vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2018; 7 (2): 25–36. (In Russ.). doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36.
 25. *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; 4 (4): 302. doi: 10.3390/ph14040302.
 26. Антонова ЛВ, Барбараш ОЛ, Барбараш ЛС. Тканеинженерные конструкции для нужд сердечно-сосудистой хирургии: возможности персонализации и перспективы использования. *Вестник РАМН.* 2023; 78 (2): 141–150. *Antonova LV, Barbarash OL, Barbarash LS*. Tissue-Engineered Constructions for the Needs of Cardiovascular Surgery: Possibilities of Personalization and Prospects for Use (Problem Article). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2023; 78 (2): 141–150. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15690/vramn7578.
 27. *Hao D, Fan Y, Xiao W, Liu R, Pivetti C, Walimbe T et al*. Rapid endothelialization of small diameter vascular grafts by a bioactive integrin-binding ligand specifically targeting endothelial progenitor cells and endothelial cells. *Acta Biomater.* 2020 May; 108: 178–193. doi: 10.1016/j.actbio.2020.03.005.
 28. *Liu RH, Ong CS, Fukunishi T, Ong K, Hibino N*. Review of vascular graft studies in large animal models. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018 Apr; 24 (2): 133–143. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0350.
 29. *Swartz DD, Andreadis ST*. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013 Oct; 24 (5): 916–925. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.005.
 30. *Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD*. Tissue engineered vascular grafts – preclinical aspects. *Int J Cardiol.* 2013 Aug 20; 167 (4): 1091–1100. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.069.
 31. Патент № 2702239 РФ. Технология изготовления функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием / Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А., Кривкина Е.О., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С.; заявитель и правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Науч.-исслед. ин-т комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» – № 2019119912; заявл. 25.06.2019; зарегистр. 07.10.2019. – 1 с. Patent № 2702239 RF. *Tekhnologiya izgotovleniya funktsional'no aktivnykh biodegradiruemykh sosudistyykh protezov malogo diametra s lekarstvennym pokrytiem* / Antonova L.V., Sevost'yanova V.V., Rezvova M.A., Krivkina E.O., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L., Barbarash L.S.; za-yavitel' i pravoobladatel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethoe nauchnoe uchrezhdenie «Nauch.-issled. in-t kompleksnykh problem serdechno-sosudistyykh zabolevaniy» – № 2019119912; zayavl. 25.06.2019; zaregistr. 07.10.2019. – 1 s.
 32. *Груздева ОВ, Бычкова ЕЕ, Пенская ТЮ, Кузьмина АА, Антонова ЛВ, Барбараш ЛС*. Сравнительная характеристика гемостазиологического профиля овец и пациентов с сердечно-сосудистой патологией – основа для прогнозирования тромботических рисков в ходе преклинических испытаний сосудистых протезов. *Современные технологии в медицине.* 2021; 13 (1): 52–58. *Gruzdeva OV, Bychkova EE, Penskaya TYu, Kuzmina AA, Antonova LV, Barbarash LS*. Comparative Analysis of the Hemostasiological Profile in Sheep and Patients with Cardiovascular Pathology as the Basis for Predicting Thrombotic Risks During Preclinical Tests of Vascular Prostheses. *Sovremennye tehnologii v medici-*

- ne. 2021; 13 (1): 52–58. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17691/stm2021.13.1.06.
33. Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Ханова МЮ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ, Миронов АВ и др. Результаты преклинических испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели овцы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (3): 80–93. Antonova LV, Krivkina EO, Khanova MYu, Velikanova EA, Matveeva VG, Mironov AV et al. Results of preclinical trials in a sheep model of biodegradable small-diameter vascular grafts. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (3): 80–93. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2022-3-80-93.
34. 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.
35. Antonova LV, Krivkina EO, Sevostianova VV, Mironov AV, Rezvova MA, Shabaev AR et al. Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model. *Polymers (Basel)*. 2021 Aug 8; 13 (16): 2637. doi: 10.3390/polym13162637.
36. Wang C, Li Z, Zhang L, Sun W, Zhou J. Long-term results of triple-layered small diameter vascular grafts in sheep carotid arteries. *Med Eng Phys*. 2020 Nov; 85: 1–6. doi: 10.1016/j.medengphy.2020.09.007.
37. Matsuzaki Yu, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang Yu-C, Miyamoto S, Kelly J et al. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model. *Acta Biomater*. 2020 Oct 1; 115: 176–184. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.011.
38. Ono M, Kageyama S, O’Leary N, El-Kurdi MS, Reinöhl J, Solien E et al. 1-Year Patency of Biorestorative Polymeric Coronary Artery Bypass Grafts in an Ovine Model. *JACC Basic Transl Sci*. 2023 Nov 9; 8 (1): 19–34. doi: 10.1016/j.jacbts.2022.06.021.
39. Dyl L, Topol M. The femoral artery and its branches in the baboon *Papio Anubis*. *Folia Morphol (Warsz)*. 2007 Nov; 66 (4): 291–295.
40. Chai D, Cuneo S, Falconer H, Mwenda JM, D’Hoo-ghe T. Olive baboon (*Papio anubis anubis*) as a model for intrauterine research. *J Med Primatol*. 2007 Dec; 36 (6): 365–369. doi: 10.1111/j.1600-0684.2006.00204.x.

Статья поступила в редакцию 17.09.2024 г.
The article was submitted to the journal on 17.09.2024