

## РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МАТРИЦЫ ИЗ L-ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА

ПОПОВ Г.И.<sup>1</sup>, ПОПРЯДУХИН П.В.<sup>2</sup>, ДОБРОВОЛЬСКАЯ И.П.<sup>2</sup>, ЮДИН В.Е.<sup>2,3</sup>,  
ВАВИЛОВ В.Н.<sup>1</sup>, ЮКИНА Г.Ю.<sup>4</sup>, ИВАНЬКОВА Е.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Отдел сосудистой хирургии, Научно-исследовательский институт хирургии и неотложной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Минздрава РФ,

<sup>2</sup> Лаборатория механики полимеров и композиционных материалов, Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,

<sup>3</sup> Лаборатория полимерных материалов для тканевой инженерии и трансплантологии, Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого,

<sup>4</sup> Лаборатория патоморфологии, Научно-исследовательский центр, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

*В целях создания тканеинженерного сосудистого имплантата получена матрица из нановолокон биodeградируемого полимера L-полилактида. Разработана методика кристаллизации матрицы на стержне, позволяющая производить образцы с прочностными и деформационными характеристиками, превышающими аналогичные значения для нативных сосудов. Проведена серия хронических экспериментов по имплантации разработанной матрицы в брюшную аорту крыс сроком до 16 мес. Получены удовлетворительные показатели проходимости матриц (71%). По данным гистологического исследования, с течением времени происходит биодеградация матрицы и формирование новой сосудистой стенки, отсутствуют признаки воспаления или миоинтимальной гиперплазии в зоне анастомозов. Резорбция волокон полимера начинается через 12 нед. экспозиции и полностью завершается через 64 нед. К этому времени формируются неоинтима и неоадвентиция, состав и структура которых близки к строению нативного сосуда. Недостаточно высокие механические свойства зоны реконструкции являются причиной образования аневризм.*

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, матрица, нановолокно, L-полилактид, сосудистый имплантат.

### ВВЕДЕНИЕ

На настоящий момент использование нативного аутологичного материала при реконструктивных сердечно-сосудистых операциях остается «золотым стандартом». Количество вмешательств, в ходе которых необходимо замещать или шунтировать пораженные сосуды, огромно [1]. Для этих целей в клинике используют либо аутологичные артерии и вены, либо синтетические протезы. Однако результаты применения данных методов не удовлетворяют в полной мере требованиям современной сердечно-сосудистой хирургии.

Решением проблемы может стать разработка тканеинженерного сосудистого имплантата (ТИСИ) с применением методов тканевой инженерии, являющегося по своей сути искусственным сосудом, имитирующим структуру и функцию естественного

сосуда, чувствительным к нейрогуморальному воздействию со стороны организма реципиента.

В настоящее время разрабатывают несколько методик получения ТИСИ: послойная тканевая инженерия [2], искусственные сосуды из грануляционной ткани [3], децеллюляризированные трансплантаты [4], использование трубчатых биорезорбируемых полимерных матриц [5]. Суть последней методики заключается в культивировании клеточного материала на биорезорбируемой полимерной матрице в условиях биореактора, имитирующего биологические и механические факторы, которые способствуют пролиферации и дифференцировке клеток. Предполагается, что после имплантации такого графта в организм реципиента, на фоне продолжающейся биодеградации структур полимера, произойдет образование новой сосудистой стенки за счет ранее

культивированных клеток [6]. В последнее время появился ряд работ, в которых авторы отказываются от этапа культивирования клеток на матрице *in vitro* ввиду его сложности и длительности и тем самым пытаются упростить методику и приблизить ее передачу в клинику [7–9]. Предполагается, что образование новой сосудистой стенки произойдет за счет рекрутированных клеток организма реципиента *in vivo*.

Вновь созданный искусственный сосуд должен отвечать следующим требованиям: 1) быть биосовместимым и устойчивым к инфекции; 2) быть герметичным и тромборезистентным, что обеспечивается покрытием внутренней поверхности искусственного сосуда эндотелием; 3) иметь механические характеристики, позволяющие производить хирургические манипуляции, а также выдерживать длительные гидродинамические нагрузки; 4) иметь вазоактивные физиологические свойства, включая способность к спазму или дилатации в ответ на нервный или химический раздражитель. Кроме того, необходимо обеспечить возможность создавать ТИСИ в достаточном количестве и с различными характеристиками для решения любых клинических задач [10].

Цель работы – разработка способа получения методом электроспиннинга матрицы малого диаметра на основе микро- и нановолокон из L-полилактида (ПЛА), изучение ее структуры и механических характеристик, а также оценка возможности использования матрицы для получения ТИСИ без предварительного культивирования клеточного материала в длительном хроническом эксперименте *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### ПОЛУЧЕНИЕ МАТРИЦЫ ИЗ НАНОВОЛОКОН ПЛА

Трубчатые матрицы на основе нановолокон ПЛА молекулярной массой полимера  $M_w=50$  кДа (фирма Corbion Puras, Нидерланды) получали методом электроформования из раствора ПЛА в хлороформе на лабораторной установке Nanon-01A (Япония). Раствор полимера концентрацией 15% (мас.) с помощью инжекторного насоса подавали через электрод-фильтр в электрическое поле (напряжением 16 кВ) при расстоянии между электродами 0,15 м, осаждение волокон происходило на цилиндрическом электроде. Скорость вращения цилиндрического электрода диам. 1,1 мм равнялась 1500 об/мин. Получены трубчатые образцы с внутренним диам. 1,1 мм и толщиной стенки 320 мкм.

### КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МАТРИЦЫ ИЗ ПЛА

Для повышения механических характеристик и стабильности в биологической среде ПЛА-ма-

трицы подвергались термообработке в свободном и фиксированном состояниях при температуре 70 °С в течение 1 ч. Термообработку аморфного образца в фиксированном состоянии проводили на цилиндрическом стержне диам. 1,1 мм.

### ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МАТРИЦЫ

Механические характеристики матриц изучали на универсальной установке Instron model 5943 (Великобритания) в режиме одноосного растяжения образца со скоростью 10 мм/мин. Определяли модуль упругости, прочность и деформацию трубчатых образцов, полученных из ПЛА, диам. 1,1 мм до разрыва без кристаллизации (толщина стенки 320 мкм), после кристаллизации в свободном состоянии (толщина стенки 370 мкм) и после кристаллизации в фиксированном состоянии (толщина стенки 250 мкм). В качестве контроля использовали образцы нативной аорты крысы. Длина рабочей части всех испытуемых образцов составляла 20 мм.

### ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ МАТРИЦЫ

При исследовании микроструктуры трубчатых образцов на основе нановолокон из ПЛА применяли метод сканирующей электронной микроскопии; использовали микроскоп Supra-55 VP фирмы Carl Zeiss (Германия). Температуры стеклования, плавления и кристаллизации ПЛА определяли с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC 204 F1 Phoenix (фирма NETZSCH, Германия) в атмосфере аргона.

### ТЕХНИКА ИМПЛАНТАЦИИ МАТРИЦЫ В СОСУДИСТОЕ РУСЛО

Оперированы крысы-самцы весом 300–350 г одной генетической линии под ингаляционной анестезией (1,5% изофлурана, вводный наркоз – 3% изофлурана). Выполняли Y-образную лапаротомию, мобилизацию инфраренального отдела аорты с перевязкой поясничных артерий. После иссечения инфраренальный отдел аорты протезировали ПЛА-матрицей с внутренним диам. 1,1 мм и длиной 8–10 мм. Во всех опытах после включения кровотока значимого кровотечения сквозь стенку матрицы или по линии анастомозов не было. Проподимость матриц оценивали классической методикой [11] сразу после вшивания протеза и через 30 мин. Животных содержали в виварии в отдельных клетках при свободном доступе к пище и воде. В послеоперационном периоде наблюдали за цветом и температурой кожных покровов задних конечностей животных, их двигательной активностью. Всего оперировано 21 животное, сроки наблюдения составляли 1, 4, 12, 24, 48, 56, 64 нед.

## АНГИОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ангиографическое исследование выполняли на установке Philips Allura Xper FD 20 (Нидерланды) после открытой punctии брюшной аорты крысы выше зоны ее протезирования. Использовали 300 мг/мл контрастного вещества «Омнипак» (Omnipaque) (фирма GE Healthcare AS (Норвегия).

## ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

В ходе эксплантации графта проводили его исследование с участками нативной аорты, далее препарат фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине (рН=7,4) в течение 24 ч. Для закрепления материала в парафиновые блоки использовали изопропиловый спирт или эфир. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для визуализации соединительной ткани и эластических волокон применяли метод Маллори и метод Вейгерта–Ван Гизона (расходный материал фирмы Bio-Optica, Италия).

Для выявления эндотелия применяли иммуногистохимический метод, оценивали иммунореактивность белка PECAM-1/CD31. Проводили инкубацию срезов с поликлональными козьими антителами к PECAM-1/CD31 (расходный материал фирмы Santa Cruz Biotechnology, США). Для выявления комплекса «антиген – антитело» использовали набор реагентов Super Sensitiv Polymer-HRP IHC Detection System (фирма BioGenex, США). Препараты докрашивали гематоксилином Джилла (фирма Bio-Optica, Италия).

Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при окуляре x10, объективе x4, x10, x40, x100. Фотосъемку выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (фирма Leica, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученная матрица имеет внутренний диам. 1,1 мм, толщину стенки 320 мкм. По данным электронной микроскопии, матрица состоит из волокон диам. 1,5–4,0 мкм. Рентгеноструктурный анализ показал, что волокна полимера характеризуются аморфной структурой и не имеют

преимущественной ориентации, между ними располагаются поры размером до нескольких сотен микрометров (рис. 1, а, б).

Для повышения механических характеристик и стабильности в биологической среде матрицы подвергали термообработке в свободном и фиксированном состояниях при температуре 70 °С в течение 1 ч. Как показали результаты дифференциальной сканирующей калориметрии и рентгеновского исследования, после термообработки при температуре выше температуры стеклования происходит частичная кристаллизация полимера, степень кристалличности термообработанных образцов ПЛА составляла около 44%.

Наблюдалось увеличение толщины стенки матрицы, обработанной в свободном состоянии, до 370 мкм и уменьшение ее внутреннего диам. до 0,85 мм (рис. 1, б, г) при формировании более рыхлой волокнистой структуры стенки.

В результате термообработки аморфного образца в фиксированном состоянии на стержне диам. 1,1 мм толщина стенки матрицы уменьшилась до 250

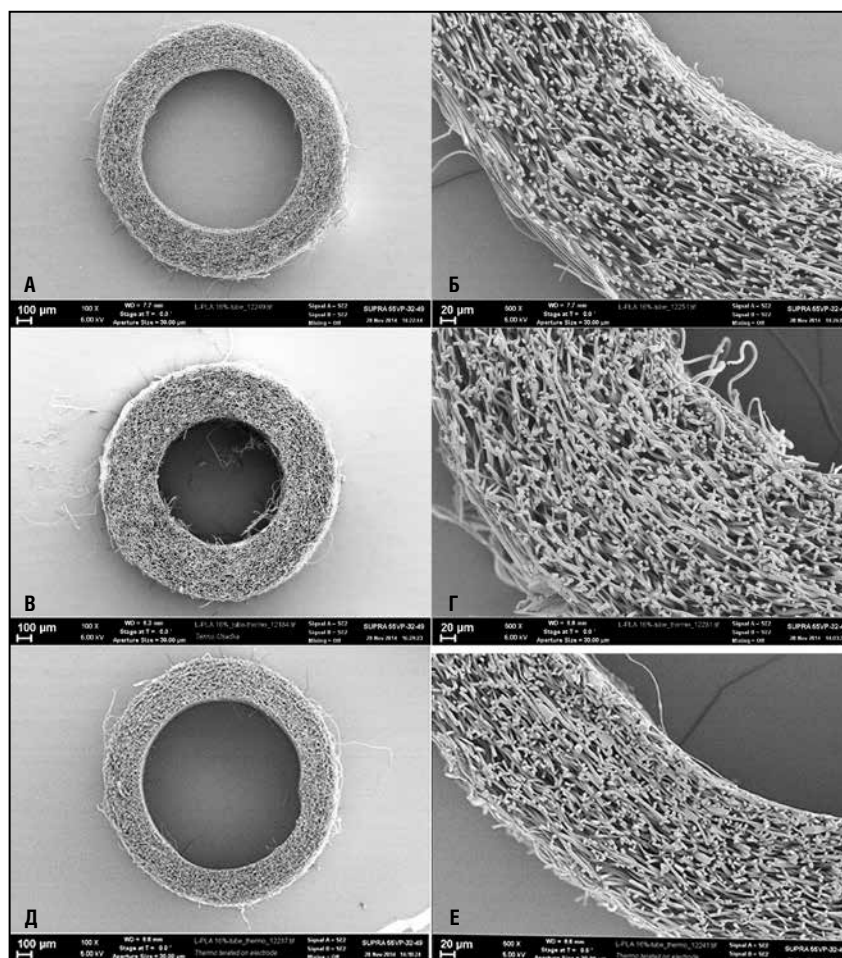


Рис. 1. Поперечное сечение матриц на основе микроволокон из L-полилактида (электронная микроскопия): а, б – исходное состояние; в, г – матрица, закристаллизованная в свободном состоянии; д, е – матрица, закристаллизованная в фиксированном состоянии

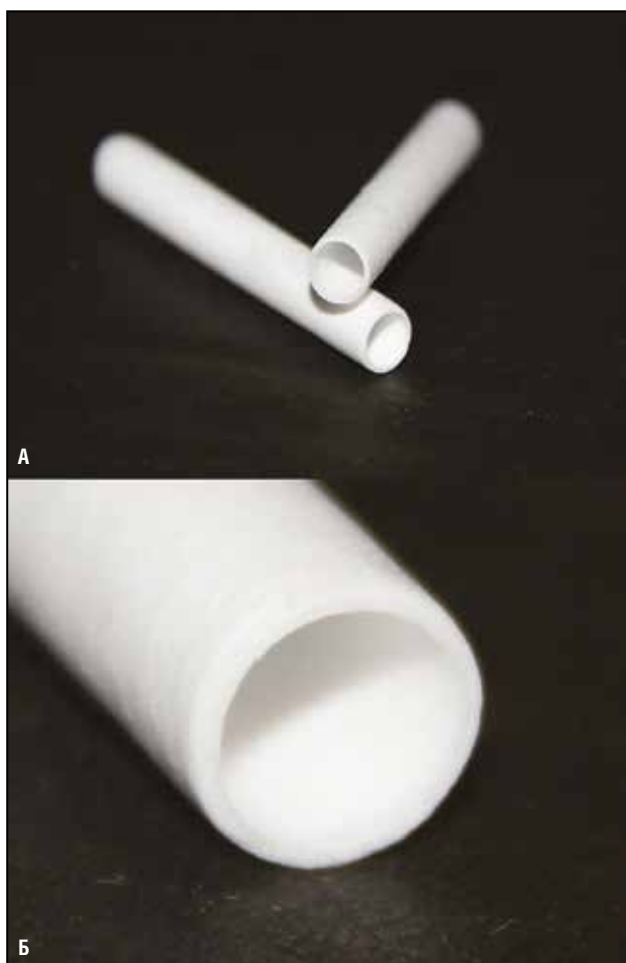


Рис. 2. Внешний вид термообработанной в фиксированном состоянии матрицы, полученной методом электроспиннинга: а – без увеличения; б – при трехкратном увеличении

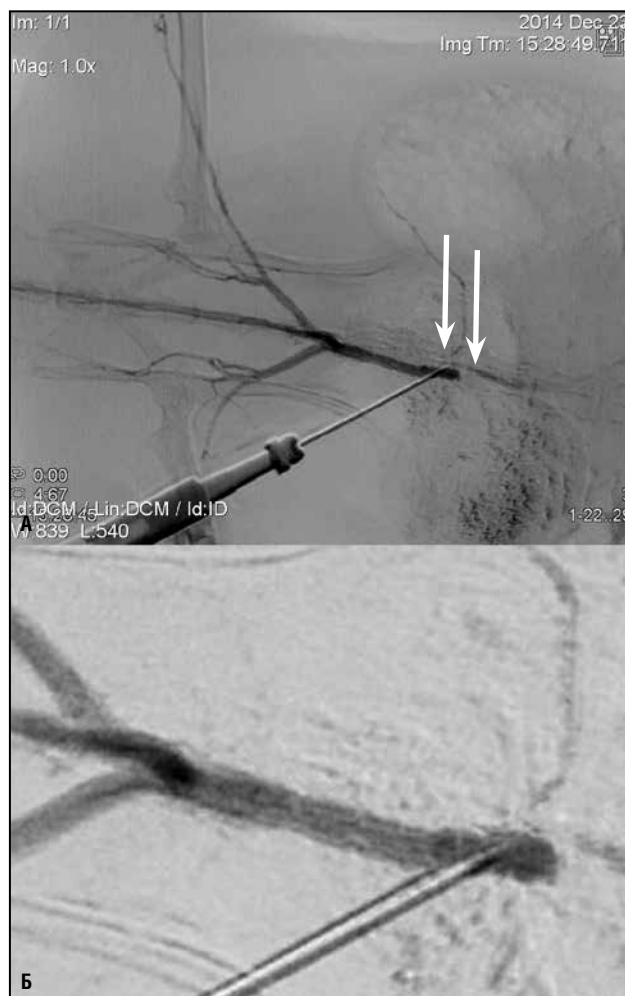


Рис. 3. Прижизненное ангиографическое исследование через 56 нед. после имплантации: а – без увеличения; б – при увеличении

мкм (рис. 1, д, е) без изменения ее внутреннего диаметра при образовании более плотной волокнистой структуры.

Механические характеристики термообработанных матриц были значительно выше, чем таковые исходных аморфных, и превышали аналогичные значения, полученные при исследовании нативной аорты крысы (таблица).

Исходя из полученных данных, для экспериментов *in vivo* выбраны матрицы, термически обработанные в фиксированном состоянии, длиной 8–10 мм (рис. 2).

Эксперименты по имплантации матрицы в брюшную аорту крысы показали, что через 1 нед. признаки воспаления и патологического влияния на окружающие ткани отсутствуют. На внутренней поверхности матрицы, начиная с дистального и проксимального анастомозов, формируется эндотелиальный слой, тогда как центральная ее часть покрыта неоднородным сетчатым

слоем фибрина. Через 4 нед. эндотелий выстилает всю внутреннюю поверхность матрицы. Определен субэндотелиальный слой, сформированный из тонкой сети коллагеновых волокон на всем протяжении матрицы. Признаков гиперплазии неоинтимы в зоне анастомозов не выявлено. Стенка матрица заселена фибробластами и пронизана тонкими коллагеновыми волокнами, а снаружи окружена соединитель-

Таблица

**Сравнительная характеристика механических свойств матриц из L-полилактида и нативной аорты крысы**

Объект	Толщина стенки, мкм	Прочность, МПа	Модуль, МПа	Удлинение, %
Нативная аорта крысы	150	2,27±0,56	17,3±5,1	139,0±32,0
Исходная матрица	320	2,64±0,29	27,0±2,8	258,0±24,0
Матрица, кристаллизованная в фиксированном состоянии	250	3,63±0,41	145,0±11,0	175,0±18,0
Матрица, кристаллизованная в свободном состоянии	370	2,61±0,36	109,0±13,0	96,3±21,0

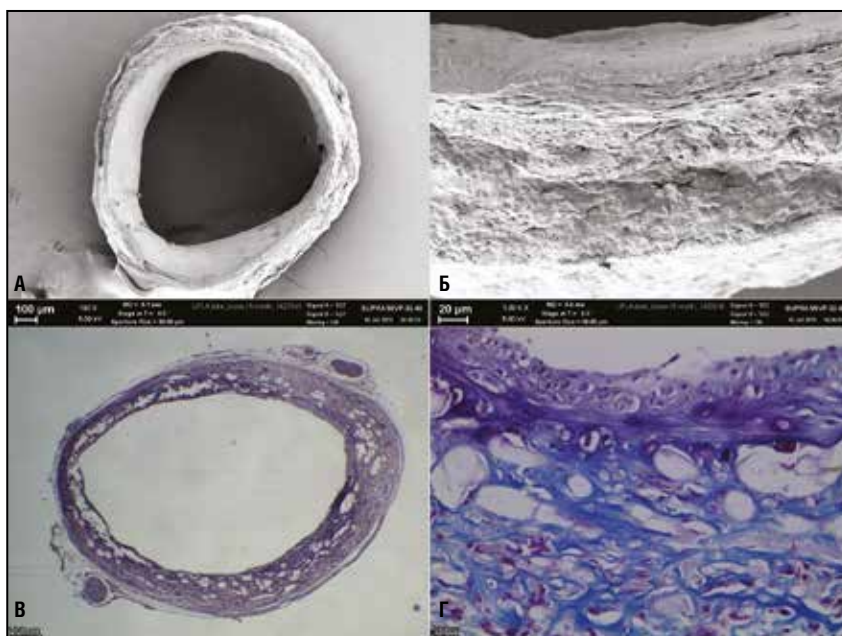


Рис. 4. Поперечный срез матрицы через 64 нед.: а, б – электронная микроскопия; в, г – гистологическое исследование по Маллори (x10, x40 соответственно)

нотканной капсулой, образованной более крупными коллагеновыми волокнами. Первые признаки биорезорбции волокон полимера определяли через 12 нед. после операции. Гистологическое исследование через 56 нед. показало, что неоинтима представлена эндотелием и широким субэндотелиальным слоем, состоящим из коллагеновых и единичных эластических волокон, расположенных вплотную друг к другу. Неомедия характеризуется неупорядоченным положением толстых пучков коллагеновых волокон. Выявлены фрагменты ПЛА, между которыми располагаются преимущественно фибробласты. Адвентиция представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с сосудами. При электронной микроскопии волокна ПЛА сильно фрагментированы и частично резорбированы. По данным прижизненного ангиографического исследования, матрицы проходима, границы протезирования едва различимы, признаков стеноза или дилатации нет (рис. 3). Через 64 нед. (n=3) фрагменты волокон ПЛА не выявлены, их место занимали только новообразованные ткани, толщина стенки сосуда от 100 до 160 мкм (рис. 4). Неоинтима представлена эндотелием и субэндотелиальным слоем, содержащим коллагеновые и эластические волокна. Клеточный состав неомедии – в основном фибробласты и коллагеновые волокна, которые формируют неупорядоченно расположенные пучки. Неоадвентиция образована рыхлой волокнистой соединительной тканью с сосудами. Во всех трех наблюдениях на данном сроке отмечено появление веретенообразных аневризм той или иной степени выраженности (рис. 5). Прходимость графтов составила 71% (15/21).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что разработанные сосудистые матрицы из волокон ПЛА после специальной термообработки соответствуют ряду требований, предъявляемых при создании ТИСИ. В опытах *in vivo* доказана биосовместимость и безопасность полученных матриц. На всех сроках эксперимента *in vivo* признаков воспалительной реакции в зоне операции не выявлено. Устойчивость к инфекции подтверждается отсутствием инфекционных осложнений во всех опытах. Интраоперационно отмечено, что, несмотря на высокую пористость структуры стенки графта, герметичность сохраняли как стенки протеза, так и линии анастомозов и мест проколов

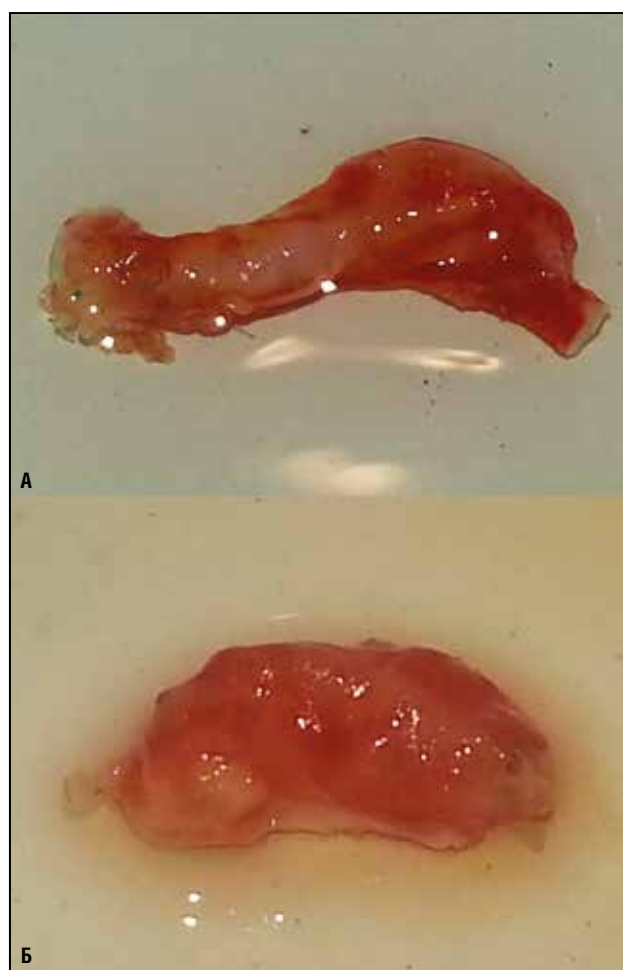


Рис. 5. Зона реконструкции через 64 нед. после имплантации матрицы. Степень выраженности аневризм: а – минимальная; б – максимальная

атравматической иглой. Образование неоинтимы с равномерным слоем эндотелия уже на ранних сроках после операции, отсутствие миоинтимальной гиперплазии на поздних сроках обеспечило высокий уровень первичной проходимости графтов (71%). Полученные матрицы после термообработки в фиксированном состоянии обладают супрафизиологической прочностью, что дает возможность выполнения хирургических манипуляций. Данная методика позволяет создавать такие матрицы в достаточном количестве и с различными размерами.

Несмотря на то, что с 12 нед. эксперимента *in vivo* в стенке матрицы протекают два параллельных процесса (биodeградация микроволокон полимера и формирование элементов новой сосудистой стенки), ее прочность к моменту полной резорбции ПЛА не достигает необходимого уровня, и происходит развитие веретенообразных аневризм зон реконструкции. Через 64 нед. после имплантации формируется новая стенка графта, неоинтима и неоадвентиция имеют морфологическое сходство с нативным сосудом. Однако структура медиа характеризуется неупорядоченно расположенными пучками коллагеновых волокон и фибробластов, что может являться причиной образования аневризм.

Таким образом, полученные методом электроspиннинга сосудистые матрицы из волокон ПЛА, после специальной термообработки пригодны для дальнейшей разработки ТИСИ. Возможно, для предупреждения образования аневризм на месте имплантированного графта необходимо предварительное культивирование клеточного материала на матрице *in vitro*, прежде всего гладкомышечных клеток, или внедрение в состав стенки матрицы волокон биостабильных полимеров.

**Конфликт интересов отсутствует.**

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14–33–00003).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization. Geneva: WHO Press. 2016; 64.
2. *L'Heureux N., Dusserre N., Konig G., et al.* Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat. Med.* 2006; 12(3): 361–365.
3. *Chue W.L., Campbell G.R., Caplice N., et al.* The dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous artificial blood vessels. *J. Vasc.Surg.* 2004; 39(4): 859–867.
4. *Schaner P.J., Martin N.D., Tulenko T.N., et al.* Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J. Vasc. Surg.* 2004; 40(1): 146–153.
5. *Shin'oka T., Matsumura G., Hibino N., et al.* Midterm clinical result of tissue – engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005; 129(6): 1330–1338.
6. *Chen Q.Z., Harding S.E., Ali N.N., et al.* Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Mater. Sci. Eng.: R: Rep.* 2008; 59(1–6): 1–37.
7. *Song L., Debanti S., Shu C.* Vascular tissue engineering: from *in vitro* to *in situ*. *WIREs Syst. Biol. Med.* 2014; 6: 61–76.
8. *Севостьянова В.В., Елгудин Я.А., Глушкова Т.В. и др.* Использование протезов из поликапролактона для сосудов малого диаметра. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 2015; 21: 1: 44–48.
9. *Попова И.В., Степанова А.О., Плотникова Т.А. и др.* Изучение проходимости сосудистого протеза, изготовленного методом электроspиннинга. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 2015; 21: 2: 136–142.
10. *Thomas A.C., Campbell G.R., Campbell J.H.* Advances in vascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology.* 2003; 12(5): 271–276.
11. *Acland R.* Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery.* 1972; 72: 744–748.

**DEVELOPMENT AND ASSESSMENT OF EFFICACY  
OF L-POLYLACTIDE MATRIX FOR CREATION  
OF A TISSUE-ENGINEERED VASCULAR GRAFT**

**Popov G.I.<sup>1</sup>, Popryadukhin P.V.<sup>2</sup>, Dobrovolskaya I.P.<sup>2</sup>, Yudin V.E.<sup>2,3</sup>,  
Vavilov V.N.<sup>1</sup>, Yukina G.Yu.<sup>4</sup>, Ivankova E.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Vascular Surgery Department, Scientific Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, First Saint-Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov Ministry of Health of the Russian Federation,*

<sup>2</sup> *Laboratory of Mechanics of Biopolymers and Composite Materials, Institute of High-Molecular-Weight Compounds, Russian Academy of Sciences,*

<sup>3</sup> *Laboratory of Polymeric Materials for Tissue Engineering and Transplantology, Peter the Great Saint-Petersburg State Polytechnic University,*

<sup>4</sup> *Laboratory of Pathomorphology, Scientific Research Centre, First Saint-Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia*

*In order to create a tissue-engineered vascular graft we elaborated a matrix consisting of nanofibres of biodegradable polymer L-poly lactide. We worked out the methodology of crystallization of the matrix on a rod, making it possible to manufacture specimens possessing strength and deformity characteristics superior to those of native vessels. This was followed by a series of chronic experiments on implanting the elaborated matrix into the abdominal aorta of rats for the duration of up to 16 months. We obtained satisfactory parameters of the patency of the matrices (71%). According to the findings of histological examination, in the course of time there occurred biodegradation of the matrix and formation of a new vascular wall, with no evidence of either inflammation or neointimal hyperplasia in the zone of the anastomoses. Resorption of the polymeric fibres commenced 12 weeks after exposure and completely terminated after 64 weeks. By that time, both neointima and neoadventitia were formed, whose composition and structure were close to those of the native vessel. Insufficiently high mechanical properties of the zone of reconstruction turned out to be the cause of the formation of aneurysms.*

**Key words:** *tissue engineering, matrix, nanofibre, L-poly lactide, vascular graft.*

---