

# РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФОРМИРОВАНИЯ АТРОМБОГЕННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОКРЫТИЯ ДЛЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

DOI: 10.17691/stm2020.12.6.01

УДК [616.13–77+615.1]–089.844

Поступила 23.04.2020 г.



**Л.В. Антонова**, д.м.н., зав. лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**Е.О. Кривкина**, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**М.А. Резвова**, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов

отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**В.В. Севостьянова**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**В.О. Ткаченко**, к.т.н., старший научный сотрудник<sup>2</sup>;

**Т.В. Глушкова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов

отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**Т.Н. Акентьева**, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов

отдела экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**Ю.А. Кудрявцева**, д.б.н., зав. отделом экспериментальной медицины<sup>1</sup>;

**Л.С. Барбараш**, д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Сосновый бульвар, 6, Кемерово, 650002;

<sup>2</sup>Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 11, Новосибирск, 630090

**Цель исследования** — разработать технологию формирования атромбогенного лекарственного покрытия для биodeградируемых пористых каркасов и оценить физико-механические и гемосовместимые свойства функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов с лекарственным покрытием и без такового.

**Материалы и методы.** Сосудистые протезы из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона с инкорпорированными в их состав сосудистым эндотелиальным фактором роста, основным фактором роста фибробластов и хемоаттрактантной молекулой SDF-1 $\alpha$  изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга. Дополнительная поверхностная модификация протезов осуществлена посредством формирования гидрогелевого покрытия из поливинилпирролидона, способного связывать лекарственные средства в результате комплексообразования. В качестве атромбогенных лекарственных препаратов использовали нефракционированный гепарин и илопрост.

**Результаты.** После модификации сосудистых протезов гепарином и илопростом модуль Юнга повышается в 5,8 раза, что говорит о большей жесткости данных графтов относительно немодифицированных аналогов. На поверхности сосудистых протезов с лекарственным покрытием гепарин + илопрост агрегация тромбоцитов была в 3,3 раза меньше, чем на немодифицированных аналогах, и в 1,8 раза меньше в сравнении с интактной обогащенной тромбоцитами плазмой. Поверхность сосудистых протезов с гепарином и илопростом не была подвержена адгезии тромбоцитов и белков крови.

**Заключение.** Формирование на поверхности биodeградируемых протезов лекарственного покрытия, содержащего нефракционированный гепарин и илопрост, значительно улучшает атромбогенные свойства графтов, но способствует повышению их жесткости.

Для контактов: Антонова Лариса Валерьевна, e-mail: antonova.la@mail.ru

**Ключевые слова:** биodeградируемые сосудистые протезы; графты малого диаметра; атромбогенное лекарственное покрытие; гемосовместимость.

**Как цитировать:** Antonova L.V., Krivkina E.O., Rezvova M.A., Sevostyanova V.V., Tkachenko V.O., Glushkova T.V., Akentyeva T.N., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash L.S. A technology for anti-thrombogenic drug coating of small-diameter biodegradable vascular prostheses. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(6): 6–14, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.01>

English

## A Technology for Anti-Thrombogenic Drug Coating of Small-Diameter Biodegradable Vascular Prostheses

L.V. Antonova, MD, DSc, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 E.O. Krivkina, Junior Researcher, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 M.A. Rezvova, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 V.V. Sevostyanova, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 V.O. Tkachenko, PhD, Senior Researcher<sup>2</sup>;  
 T.V. Glushkova, PhD, Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 T.N. Akentyeva, Junior Researcher, Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 Yu.A. Kudryavtseva, DSc, Head of the Department of Experimental Medicine<sup>1</sup>;  
 L.S. Barbarash, MD, DSc, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd, Kemerovo, 650002, Russia;

<sup>2</sup>Budker Institute of Nuclear Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 11 Acad. Lavrentieva Avenue, Novosibirsk, 630090, Russia

**The aim of the study** was to develop a technology for anti-thrombogenic drug coating of biodegradable porous scaffolds and to evaluate the physicomechanical and hemocompatible properties of functionally active vascular prostheses with and without a drug coating.

**Materials and Methods.** Vascular prostheses from polyhydroxybutyrate/valerate and polycaprolactone with the incorporated vascular endothelial growth factor, the main fibroblast growth factor, and the chemoattractant SDF-1 $\alpha$  were made by emulsion electrospinning. Additional surface modification of the prostheses was carried out by forming a hydrogel coating of polyvinylpyrrolidone capable of binding drugs as a result of complexation. Unfractionated heparin and iloprost were used as anti-thrombogenic drugs.

**Results.** We show that after the modification of vascular prostheses with heparin and iloprost, a 5.8-fold increase in the Young's modulus value was noted, which indicated a greater stiffness of these grafts compared to the unmodified controls. Platelet aggregation on the surface of heparin + iloprost coated vascular prostheses was 3.3 times less than that with the unmodified controls, and 1.8 times less compared to intact platelet-rich plasma. The surface of vascular prostheses with heparin and iloprost was resistant to adhesion of platelets and blood proteins.

**Conclusion.** Drug (unfractionated heparin and iloprost) coating of the surface of biodegradable prostheses significantly improved the anti-thrombogenic properties of these grafts but contributed to the increased stiffness of the prostheses.

**Key words:** biodegradable vascular prostheses; small-diameter grafts; anti-thrombogenic drug coating; hemocompatibility.

### Введение

Стенотические повреждения и окклюзия кровеносных сосудов являются причинами или ассоциированы с рядом сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Хирургическое лечение данных состояний заключается в замене поврежденного кровеносного сосуда участком аутологичного сосуда либо сосудистым протезом [1]. Аутологичные вены и артерии имеют ограниченную доступность вследствие ранее перенесенных операций с участием данных сосудов, прогрессирующего атеросклероза и других заболеваний сосудов, предполагаемых к использованию в качестве шунтов. В свою

очередь синтетические протезы с диаметром менее 6 мм, используемые в клинической практике в настоящее время, подвержены высокому риску тромбообразования, а также гиперплазии неоинтимы в отдаленный послеоперационный период, в связи с чем крайне редко применяются для замены артерий и вен малого калибра [2]. Чтобы нивелировать данные проблемы, производители делают попытки формирования на поверхности синтетических протезов атромбогенного лекарственного покрытия, что в ряде случаев улучшает проходимость протезов диаметром 6 мм [3]. Однако наиболее острой остается проблема создания эффективного сосудистого имплантата диаметром менее 4 мм.

Одной из перспективных современных областей, занимающихся разработкой протезов кровеносных сосудов, является сосудистая тканевая инженерия [4]. Существуют различные подходы к тканевой инженерии кровеносных сосудов, но все они направлены на создание функционального сосудистого имплантата, имеющего строение, сходное с организацией тканей нативной артерии, и демонстрирующего проходимость в отдаленный послеоперационный период. Основой подобного сосудистого протеза является искусственный трубчатый матрикс, чаще всего выполненный из биodeградируемых природных и/или синтетических полимеров, обладающих высокой биосовместимостью [5]. Матрикс представляет собой каркас, который заселяется аутологичными клетками в условиях *in vitro* или *in situ*. Заселение матрикса *in vitro* собственными клетками пациента является очень трудоемким, длительным, дорогостоящим процессом, сложно осуществимым в условиях клиники, особенно при проведении экстренных операций. В свою очередь заселение матрикса клетками *in situ*, т.е. непосредственно в месте имплантации, происходит благодаря естественным процессам биоремоделирования имплантата. Введение биологически активных веществ, таких как ростовые факторы, хемокины, интерлейкины, аминокислоты и других, в структуру имплантата и их пролонгированное высвобождение могут имитировать естественные биохимические сигналы и стимулировать процесс регенерации с формированием всех структурных слоев сосудистой ткани, в том числе эндотелия [6, 7].

Несмотря на перспективность и кажущуюся простоту данного подхода, разрабатываемые протезы демонстрируют ряд недостатков, связанных с возникновением осложнений после имплантации, в частности тромбообразования, что приводит к необходимости усиления атромбогенных свойств поверхности тканеинженерных высокопористых сосудистых протезов малого диаметра.

Решением данных проблем может стать формирование тромборезистентной внутренней поверхности протеза для предотвращения тромбообразования в ранний послеоперационный период [7–10].

Ранее в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово) был разработан и протестирован в условиях *in vitro* и *in vivo* биodeградируемый сосудистый протез малого диаметра на основе полигидроксипиратата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) с послойным инкорпорированием в состав полимерного трубчатого каркаса проангиогенных факторов (GFmix) в процессе эмульсионного электроспиннинга [11–13]. В конечном изделии сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) инкорпорирован во внутреннюю треть стенки протеза, а комплекс, состоящий из основного фактора роста фибробластов (bFGF) и хемоаттрактантной молекулы SDF-1 $\alpha$ , — в наружные 2/3 стенки протеза. Отличительной особенностью итогов

имплантации в брюшную часть аорты крыс графтов PHBV/PCL диаметром 1,5 мм с послойно инкорпорированным в трубчатый каркас комплексом GFmix (VEGF + bFGF + SDF-1 $\alpha$ ) явилось активное привлечение под воздействием GFmix из кровотока и окружающих тканей к внутренней поверхности графтов зрелых и прогениторных клеток. На основе этих клеток уже через 3 мес формировались слой зрелых эндотелиальных клеток, полноценная неоинтима, слой гладкомышечных клеток и определялись коллагены I и IV типов [12]. Итоговая 12-месячная проходимость биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix диаметром 1,5 мм составила 93,3% [12].

Однако высокопористая структура поверхности графта обладает способностью провоцировать тромбоз в случае тестирования подобных протезов на крупной животной модели, приближенной к человеку по своей физиологии. Данный факт обуславливает необходимость дополнительного атромбогенного лекарственного покрытия на поверхности функционально активных биodeградируемых высокопористых сосудистых протезов малого диаметра.

**Цель исследования** — разработать технологию формирования атромбогенного лекарственного покрытия для биodeградируемых пористых каркасов и оценить физико-механические и гемосовместимые свойства получаемых функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов.

## Материалы и методы

**Изготовление функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов.** Сосудистые протезы с проангиогенными факторами изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга из смеси PHBV и PCL (Sigma-Aldrich, США). Для инкорпорирования в сосудистые протезы использовали рекомбинантные ростовые факторы человека VEGF и bFGF (Sigma-Aldrich), а также рекомбинантную хемоаттрактантную молекулу человека SDF-1 $\alpha$  (Sigma-Aldrich). Внутренний слой (1/3 стенки) протеза изготавливали из полимерного раствора, содержащего 5% PHBV и 10% PCL, в трихлорметане, смешивали его с раствором VEGF (10 мкг/мл) в физиологическом растворе в соотношении 20:1 с помощью магнитной мешалки до получения эмульсии. Для изготовления внешнего слоя протеза (2/3 стенки) данный полимерный раствор смешивали с раствором, содержащим равные количества bFGF (10 мкг/мл) и SDF-1 $\alpha$  (10 мкг/мл), в физиологическом растворе в соотношении 20:1. Конечная концентрация каждого вида биомолекул составила 500 нг на 1 мл полимерного раствора.

Электроспиннинг осуществляли на установке Nanon-01A (MECC Inc., Япония) при напряжении 23 кВ, скорости подачи раствора 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора 150 мм, с использованием затупленной иглы 22G. В качестве коллектора использовали штифт

диаметром 4 мм. Толщина стенки протезов составила  $400 \pm 46$  мкм.

**Формирование атромбогенного покрытия на поверхности биodeградируемого сосудистого протеза PNBV/PCL/GFmix.** По оригинальной методике [14] выполнено дополнительное покрытие поверхности сосудистого протеза PNBV/PCL/GFmix антиагрегантами и антикоагулянтами. С этой целью на поверхности изготовленных сосудистых протезов формировали полимерную подложку. Для этого образцы предварительно выдерживали в 5% спиртовом растворе поливинилпирролидона (PVP; PanReas, Германия) и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение суток. Далее сосудистые протезы помещали в стеклянные пробирки, которые заполняли инертным газом аргоном и герметично запаковывали парафильмом. Прививку полимера PVP на поверхность сосудистого протеза проводили под действием ионизирующего излучения при мощности дозы 20 кГр и времени облучения 2,5 ч. Одновременно с модифицированием происходила стерилизация сосудистых протезов, поэтому дальнейшие действия по обработке проводили в стерильных условиях. Непривитый полимер отмывали стерильной водой для инъекций в течение 1 ч.

С учетом способности PVP образовывать комплексы последующее модифицирование проводили, используя нефракционированный гепарин, являющийся прямым антикоагулянтом (раствор №1), и илопрост, представляющий собой антиагрегант, в сочетании с гепарином (раствор №2). Модифицирующие растворы готовили на глициновом буфере (pH=2,61): раствор №1 — 25000 МЕ гепарина в 100 мл буфера; раствор №2 — 12500 МЕ гепарина и 20 мкг илопроста в 100 мл буфера. Сосудистые протезы выдерживали в приготовленных растворах в течение 30 мин, высушивали в течение суток на воздухе и размещали в стерильные емкости для хранения.

**Изучение физико-механических свойств.** Оценку механических свойств биodeградируемых сосудистых протезов PNBV/PCL/GFmix с атромбогенным лекарственным покрытием и без такового проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75. Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении сосудистого сегмента с помощью ножа специальной формы. В качестве контроля использовали показатели нативной внутренней грудной артерии человека (а. mammaria), которая рассматривается как «золотой стандарт» при операциях аортокоронарного шунтирования. Сегменты а. mammaria забирали при проведении операции шунтирования у пациентов, подписавших договор информированного согласия на забор материала.

Испытания проведены на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия) с использованием датчика с номинальной силой 50 Н, с пределом допустимой погрешности  $\pm 1\%$ , при скорости перемещения траверсы в процессе испытаний

50 мм/мин. Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при растяжении (МПа) до начала разрушения. Поскольку толщина исследуемых образцов а. mammaria ( $260 \pm 40$  мкм) значительно меньше, чем у полимерных графтов, в качестве дополнительного критерия прочности использовали абсолютное значение максимальной силы, приложенной к образцу до начала разрушения ( $F_{max}$ , Н). Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа), которые определяли в диапазонах физиологического давления (80–120 мм рт. ст.).

**Оценка гемосовместимости сосудистых протезов, модифицированных гепарином и гепарином в сочетании с илопростом**

**Гемолиз.** Исследование гемолиза эритроцитов после контакта с поверхностью полимерных образцов проводили согласно стандарту ISO 10993.4. Для оценки степени гемолиза эритроцитов использовали свежую донорскую кровь, в которую добавляли цитрата натрия 3,8% в соотношении цитрата и крови 1:9. Исследуемые образцы размером  $25 \text{ см}^2$  в количестве 5 штук для каждого вида материала помещали в бюксы, содержащие 10 мл физиологического раствора. Бюксы ставили в термостат на 120 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . В качестве положительного и отрицательного контролей использовали физиологический раствор и дистиллированную воду соответственно. Через 2 ч после инкубации в каждый бюкс добавляли по 200 мкл цитратной крови и снова помещали в термостат на 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Затем полимерные образцы изымали из бюксов в соответствующие пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 2800 об./мин с целью осаждения эритроцитов. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo Scientific, США) при длине волны 545 нм.

Степень гемолиза ( $H$ ) в процентах определяли по формуле [15, 16]:

$$H = \frac{D_t - D_{ne}}{D_{pe} - D_{ne}} \cdot 100\%,$$

где  $D_t$  — оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым материалом;  $D_{ne}$  — оптическая плотность положительного контроля;  $D_{pe}$  — оптическая плотность пробы после 100% гемолиза.

За полное отсутствие гемолиза принимали среднее значение показателя оптической плотности физиологического раствора с кровью (положительный контроль), равное 0. За 100% гемолиз принимали среднее значение оптической плотности прибора при измерении дистиллированной воды с кровью (отрицательный контроль), которое составило 0,279.

**Агрегация тромбоцитов.** Исследование проводили согласно стандарту ISO 10993.4. Для исследования также использовали свежую донорскую цитратную кровь с соотношением цитрата и крови 1:9. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы

(ОТП) кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об./мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали при помощи повторного центрифугирования ОТП в течение 20 мин при 4000 об./мин. БТП использовали для калибровки прибора. В качестве положительного контроля применяли интактную ОТП.

Измерения осуществляли в спонтанном режиме без индукторов агрегации. Для восстановления уровня ионов  $Ca^{*2}$  в цитратной крови использовали раствор  $CaCl_2$  с мол. массой 0,025 моль, после чего проводили измерения. Соотношение пробы и реагента составило 250 мкл ОТП и 25 мкл  $CaCl_2$ . Время контакта исследуемых образцов с ОТП — 3 мин.

Максимум агрегации тромбоцитов крови измеряли на полуавтоматическом 4-канальном анализаторе агрегации тромбоцитов АРАСТ 4004 (LABiТес, Германия).

**Адгезия тромбоцитов.** Метод оценки степени адгезии тромбоцитов крови к поверхности исследуемых материалов основан на визуальном анализе степени трансформации адгезированных тромбоцитов, а также на подсчете их количества [15].

Образцы исследуемых матрикс (по 3 образца в каждой группе) размером 0,5 см<sup>2</sup> инкубировали в 300 мкл ОТП, полученной вышеописанным способом. Инкубацию проводили в течение 2 ч при 37 °С, после чего образцы промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH=7,4) для удаления неадсорбированных компонентов плазмы. Далее образцы фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида в течение 2 ч, после чего снова промывали в PBS и обезживали в серии спиртов с восходящей концентрацией от 30 до 100% (30, 50, 70, 80 и 100%) в течение 15 мин в каждом с последующим досушиванием при комнатной температуре. Готовые образцы монтировали на специальные столики с помощью углеродного скотча, на поверхности образцов формировали токопроводящее золото-палладиевое покрытие при помощи вакуумной установки EM ACE200 (Leica Microsystems GmbH, Австрия).

Оценку степени адгезии тромбоцитов осуществляли на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 5 кВ в условиях высокого вакуума. Для исследования использовали 9 наиболее характерных полей, выбранных случайным образом. Адгезивную способность поверхности материалов оценивали по индексу деформации тромбоцитов, зависящей от степени их трансформации: от I типа (сферической формы) до V типа (абсолютно плоской). Индекс рассчитывали по формуле [15–17]:

$$\text{индекс деформации} = (\text{количество тромбоцитов типа I} \cdot 1 + \text{количество тромбоцитов типа II} \cdot 2 + \text{количество тромбоцитов типа III} \cdot 3 + \text{количество тромбоцитов типа IV} \cdot 4 + \text{количество тромбоцитов типа V} \cdot 5) / \text{общее количество тромбоцитов.}$$

**Структура поверхности.** Оценку структуры поверхности биодegradируемых сосудистых протезов

PHBV/PCL/GFmix до и после формирования атромбогенного лекарственного покрытия осуществляли с помощью сканирующего электронного микроскопа S-3400N при ускоряющем напряжении 5 кВ в условиях высокого вакуума. Образцы монтировали на специальные столики с помощью углеродного скотча и на их поверхности формировали токопроводящее золото-палладиевое покрытие при помощи вакуумной установки EM ACE200 (Leica Microsystems GmbH, Австрия).

**Статистический анализ.** Обработку данных проводили в программе Prism 8.0 (GraphPad, США). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Статистически значимых различий в напряжении между а. маттария и полимерными сосудистыми графтами вне зависимости от вида модификации не выявлено ( $p > 0,05$ ) (табл. 1). Стоит отметить, что при толщине графтов, превышающей толщину а. маттария в 1,5 раза, усилие, необходимое для разрушения образцов данных сосудистых протезов, было выше, чем для образцов а. маттария, более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ). Данный факт указывает на некоторое превосходство полимерных сосудистых протезов на основе PHBV/PCL по прочностным характеристикам. С учетом того, что полимерный сосуд в отличие от нативного не способен к обновлению, при адекватном подборе толщины он будет иметь некий запас прочности для функционирования в организме человека.

После модификации сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix гепарином, а также гепарином в сочетании и илопростом отмечено повышение модуля Юнга, что говорит о большей жесткости данных графтов относительно немодифицированных аналогов ( $p < 0,05$ ).

Биодegradируемые сосудистые протезы PHBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин+илопрост отличались статистически значимо большей максимальной силой, прикладываемой к образцу до начала его разрушения, а также демонстрировали максимальную жесткость, превышающую в 1,7 раза аналогичный показатель графтов PHBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин, в 5,8 раза — протезов PHBV/PCL/GFmix и в 20,6 раза — а. маттария ( $p < 0,05$ ). Относительное удлинение всех видов исследуемых полимерных графтов превысило аналогичный показатель а. маттария более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты показали положительное влияние модификации как гепарином, так и гепарином в сочетании с илопростом на механические свойства сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix.

Таблица 1

**Механические свойства полимерных сосудистых протезов PNBV/PCL/GFmix до и после формирования атромбогенного лекарственного покрытия и a. mammaria (Me [25; 75])**

Показатели	PNBV/PCL/GFmix	PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин	PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин+илопрост	a. mammaria
Напряжение, МПа	3,05 [2,90; 3,20]	2,66 [1,69; 3,81]	3,94 [3,78; 3,99]	2,48 [1,36; 3,25]
<i>F</i> <sub>max</sub> , Н	2,30 [2,20; 2,50] <sup>+</sup>	2,52 [2,05; 2,93]	3,08 [2,93; 3,30] <sup>**</sup>	0,96 [0,67; 2,50]
Относительное удлинение, %	121,70 [117,10; 129,60] <sup>+</sup>	59,46 [45,60; 87,48] <sup>**</sup>	109,17 [92,29; 116,06] <sup>+</sup>	29,72 [23,51; 39,62]
Модуль Юнга, МПа	8,60 [8,0; 9,64] <sup>+</sup>	28,70 [26,0; 36,50] <sup>**</sup>	49,95 [44,90; 54,70] <sup>**</sup>	2,42 [1,87; 3,19]

Примечание. Статистическая значимость различий значений ( $p < 0,05$ ): \* — относительно PNBV/PCL/GFmix; + — относительно a. mammaria.

Степень гемолиза эритроцитов не превышала 2% после контакта крови с сосудистыми протезами PNBV/PCL/GFmix как с лекарственным покрытием, так и без такового (табл. 2), что свидетельствует о высокой гемосовместимости поверхности всех исследуемых образцов [18]. Между графтами, модифицированными гепарином и сочетанием гепарина с илопростом, статистически значимых различий не выявлено. При сравнении показателей сосудистых протезов с лекарственным покрытием и без такового установлено статистически значимое повышение степени гемолиза у сосудистых протезов с атромбогенным лекарственным покрытием ( $p < 0,05$ ), но при этом его уровень не выходил за допустимые 2%.

Максимум агрегации тромбоцитов интактной ОТП, выступившей в качестве положительного контроля, составил 14,61 [13,63; 17,72]%. Выявлено почти двукратное повышение уровня агрегации тромбоцитов на поверхности сосудистых протезов PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин в сравнении с интактной ОТП ( $p < 0,05$ ), тогда как аналогичный показатель у графтов PNBV/PCL/GFmix без лекарственного покрытия не имел с интактной ОТП статистически значимых различий (см. табл. 2). Формирование на поверхности графтов PNBV/PCL/GFmix лекарственного покрытия PVP+гепарин+илопрост позволило в 2,1 и 3,3 раза уменьшить агрегацию тромбоцитов в сравнении с немодифицированными аналогами и протезами PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин соответственно, а также в 1,8 раза — в сравнении с интактной ОТП ( $p < 0,05$ ).

После контакта с кровью на поверхности графтов PNBV/PCL/GFmix с атромбогенным лекарственным покрытием и без него отмечено присутствие тромбоцитов и белков крови (табл. 3).

Структура поверхности полимерных графтов PNBV/

Таблица 2

**Гемолиз эритроцитов и агрегация тромбоцитов крови человека после контакта с полимерными графтами, % (Me [25; 75])**

Вид графта	Степень гемолиза эритроцитов	Максимум агрегации тромбоцитов
Интактная плазма, обогащенная тромбоцитами	—	14,61 [13,63; 17,72]
PNBV/PCL/GFmix	0 [0; 0]	17,25 [16,30; 17,96]
PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин	0,36 [0,36; 0,72] <sup>*</sup>	26,78 [25,47; 31,53] <sup>**</sup>
PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин+илопрост	0,36 [0,36; 0,36] <sup>*</sup>	8,22 [8,13; 8,78] <sup>**</sup>

Примечание. Статистическая значимость различий значений ( $p < 0,05$ ): \* — относительно PNBV/PCL/GFmix; + — относительно a. mammaria.

PCL/GFmix представляла собой пористый матрикс с волокнами разной толщины по причине наличия в исходном растворе для электроспиннинга факторов роста в виде водной фазы. Модификация гепарином и гепарином в сочетании с илопростом не оказала влияния на структуру исходного полимерного матрикса (см. рисунок).

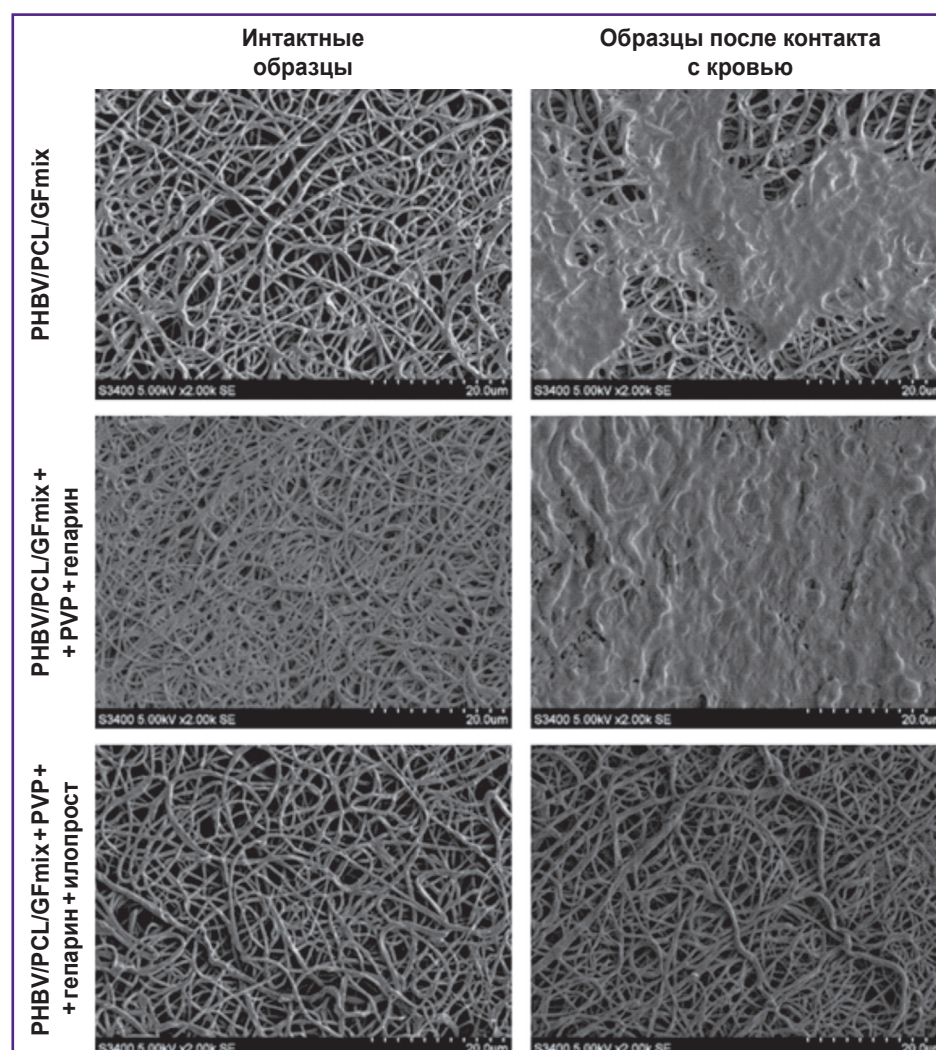
После контакта с кровью поверхность сосудистых протезов PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин+илопрост не была подвержена адгезии тромбоцитов и белков крови. На поверхности сосудистых протезов PNBV/PCL/GFmix и PNBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин преобладали тромбоциты III типа (см. табл. 3, рисунок). Несмотря на то, что значение максимума агрегации тромбоцитов на поверхности графтов с нефракционированным гепарином было в два раза больше, чем на поверхности PNBV/PCL/GFmix, по индексу деформации данные графты не имели статистически значимых различий.

Таблица 3

Индекс деформации тромбоцитов и процентное распределение типов тромбоцитов после контакта с поверхностью полимерных графтов

Вид графта	Тип тромбоцитов, %					Индекс деформации Me [25; 75]
	I	II	III	IV	V	
PHBV/PCL/GFmix	0	15,4	73,1	9,6	1,9	2,70 [1,0; 3,0]
PHBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин	4,3	7,8	75,0	12,9	0	2,63 [1,67; 3,14]
PHBV/PCL/GFmix+PVP+гепарин+ +илопрост	0	0	0	0	0	0 [0; 0]*

\* —  $p < 0,05$  относительно значений графта PHBV/PCL/GFmix.



Адгезия тромбоцитов на внутренней поверхности графтов PHBV/PCL/GFmix, модифицированных гепарином и илопростом в сочетании с гепарином;  $\times 2000$

## Обсуждение

Сосудистые имплантаты, контактирующие с кровью, должны обладать высокой тромборезистентностью. Наиболее часто проблема тромбообразования затрагивает имплантаты, предназначенные для ре-

конструкции сосудов малого диаметра, что связано с особенностями гемодинамики и реологии в данной части кровеносного русла. Увеличение тромборезистентности сосудистых имплантатов достижимо при модификации их поверхности антиагрегантами и антикоагулянтами [19].

На сегодняшний день тканеинженерные сосудистые протезы малого диаметра являются многообещающей альтернативой синтетическим протезам кровеносных сосудов. Однако при их разработке следует учитывать сложность создания используемых комбинаций различных материалов и оценивать структуру поверхности протеза, зачастую имитирующую нативный внеклеточный матрикс, на предмет возможности формирования новообразованной сосудистой ткани на ее основе. Все это в совокупности способно снижать тромборезистентность поверхности создаваемых конструкций, что обуславливает необходимость изучения возможностей усиления атромбогенных свойств подобных имплантатов [19].

В проведенном исследовании опробованы два варианта модифицирования поверхности функционально активных биодеградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix: с использованием низкомолекулярного гепарина и сочетания низкомолекулярного гепарина с илопростом. Модификация протеза антитромботическими средствами осуществляется с помощью формирования на его внутренней поверхности гидрогелевого покрытия из PVP, который способен связывать лекарственные средства в результате комплексобразования. Кроме того, образование на поверхности сосудистого протеза гидрогелевого слоя из PVP увеличивает гидрофильность поверхности протеза, что способствует снижению степени адгезии белковых молекул и форменных элементов крови, в частности тромбоцитов, а также предотвращению конформационных изменений белковых структур. Подвижностью макромолекулярных цепей в гидрогелях в том числе обусловлена и высокая скорость десорбции молекул белка, дополняющая спектр причин их антитромбогенного потенциала.

Пришивку PVP к поверхности протеза PHBV/PCL/GFmix выполняли с помощью метода радиационной прививочной полимеризации, в процессе которой происходит одновременная стерилизация изделия ионизирующим излучением, что позволяет сохранять биоактивность инкорпорированных в состав протеза дифференцировочных факторов. В итоге последующее присоединение лекарственных препаратов через комплексобразование с PVP приводит к формированию такого лекарственного покрытия, при котором лекарственный компонент частично проникает в полимер PVP, а частично остается в просвете сосудистого протеза. Благодаря этому при контакте протеза с кровью антитромбогенное действие лекарственных средств осуществляется мгновенно. Такой способ включения лекарственных препаратов, в отличие от ковалентного связывания, позволяет максимально сохранить их биологическую активность, не создавая стерических препятствий и не блокируя центры связывания молекул с факторами свертывания крови.

При сочетанном использовании нефракционированного гепарина и илопроста удалось добиться до-

стоверного повышения атромбогенных свойств поверхности биодеградируемых сосудистых протезов на основе PHBV/PCL/GFmix.

## Заключение

Технология формирования атромбогенного лекарственного покрытия на поверхности биодеградируемых пористых сосудистых протезов PHBV/PCL/GFmix с сочетанным использованием нефракционированного гепарина и илопроста значительно улучшает гемосовместимость вышеуказанных протезов, что выражается в отсутствии адгезии тромбоцитов и белков крови на поверхности протезов. Ионизирующее облучение с целью сшивки поливинилпирролидона с поверхностью протеза PHBV/PCL/GFmix способствует повышению жесткости и прочности конечного изделия.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках реализации программы работы Научно-образовательного центра «Кузбасс».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература/References

1. Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft — past, present, and future. *Tissue Eng Part B Rev* 2016; 22(1): 68–100, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0100>.
2. Devine C., McCollum C.; North West Femoro-Popliteal Trial Participants. Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg* 2004; 40(5): 924–931, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2004.08.033>.
3. Samson R.H., Morales R., Showalter D.P., Lepore M.R., Nair D.G. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison. *J Vasc Surg* 2016; 64(3): 638–647, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.03.414>.
4. Shoji T., Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Transl Pediatr* 2018; 7(2): 188–195, <https://doi.org/10.21037/tp.2018.02.01>.
5. Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lv J., Ma N., Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev* 2015; 44(15): 5680–5742, <https://doi.org/10.1039/c4cs00483c>.
6. Choi D.H., Kang S.N., Kim S.M., Gobaa S., Park B.J., Kim I.H., Joung Y.K., Han D.K. Growth factors-loaded stents modified with hyaluronic acid and heparin for induction of rapid and tight re-endothelialization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 141: 602–610, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.028>.
7. Hu Y.T., Pan X.D., Zheng J., Ma W.G., Sun L.Z. In vitro and in vivo evaluation of a small-caliber coaxial electrospun vascular graft loaded with heparin and VEGF. *Int J Surg* 2017; 44: 244–249, <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2017.06.077>.
8. Duan H.Y., Ye L., Wu X., Guan Q., Yang X.F., Han F.,



- Liang N., Wang Z.F., Wang Z.G. The in vivo characterization of electrospun heparin-bonded polycaprolactone in small-diameter vascular reconstruction. *Vascular* 2015; 23(4): 358–365, <https://doi.org/10.1177/1708538114550737>.
9. Gao J., Jiang L., Liang Q., Shi J., Hou D., Tang D., Chen S., Kong D., Wang S. The grafts modified by heparinization and catalytic nitric oxide generation used for vascular implantation in rats. *Regen Biomater* 2018; 5(2): 105–114, <https://doi.org/10.1093/rb/rby003>.
10. Wang W., Liu D., Li D., Du H., Zhang J., You Z., Li M., He C. Nanofibrous vascular scaffold prepared from miscible polymer blend with heparin/stromal cell-derived factor-1 alpha for enhancing anticoagulation and endothelialization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019; 181: 963–972, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.065>.
11. Антонова Л.В., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Ханова М.Ю., Севостьянова В.В., Цепочкина А.В., Эльгудин Я.Л., Барбараш Л.С. Оценка in vitro активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матрицы на основе полигидроксибутирата/валерата и поликапролактона. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2018; 7(2): 89–101, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101>.
- Antonova L.V., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Khanova M.Y., Sevostyanova V.V., Tsepokina A.V., Elgudin Y.L., Barbarash L.S. In vitro activity of bioactive molecules incorporated into poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(ε-caprolactone) scaffolds. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2018; 7(2): 89–101, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101>.
12. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Glushkova T.V., Elgudin Ya.L., Barbarash L.S. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2018; 7(2): 25–36, <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36>.
13. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Глушкова Т.В., Миронов А.В., Кривкина Е.О., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1α и VEGF на процессы формирования in vivo тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2018; 20(1): 96–109, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-1-96-109>.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Glushkova T.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Influence of bFGF, SDF-1α, or VEGF incorporated into tubular polymer scaffolds on the formation of small-diameter tissue-engineered blood vessel in vivo. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov* 2018; 20(1): 96–109, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-1-96-109>.
14. Антонова Л.В., Севостьянова В.В., Резцова М.А., Кривкина Е.О., Кудрявцева Ю.А., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Технология изготовления функционально активных биодegradуемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием. Патент РФ 2702239. 2019.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Rezvova M.A., Krivkina E.O., Kudryavtseva Yu.A., Barbarash O.L., Barbarash L.S. *Technology of producing functionally active biodegradable small-diameter vascular prostheses with drug coating*. Patent RU 2702239. 2019.
15. Ye X., Wang Z., Zhang X., Zhou M., Cai L. Hemocompatibility research on the micro-structure surface of a bionic heart valve. *Biomed Mater Eng* 2014; 24(6): 2361–2369, <https://doi.org/10.3233/bme-141049>.
16. Shen X., Su F., Dong J., Fan Z., Duan Y., Li S. In vitro biocompatibility evaluation of bioresorbable copolymers prepared from L-lactide, 1, 3-trimethylene carbonate and glycolide for cardiovascular applications. *J Biomater Sci Polym Ed* 2015; 26(8): 497–514, <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1030992>.
17. Jung F., Braune S., Lendlein A. Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013; 53(1–2): 97–115, <https://doi.org/10.3233/ch-2012-1579>.
18. Jolee Bartrom B.S. *ASTM hemolysis*. NAMSА; 2008.
19. Севостьянова В.В., Кривкина Е.О., Антонова Л.В. Подходы к антитромботической модификации сосудистых имплантатов. *Казанский медицинский журнал* 2020; 101(2): 232–242, <https://doi.org/10.17816/kmj2020-232>.
- Sevostyanova V.V., Krivkina E.O., Antonova L.V. Approaches to antithrombotic modification of vascular implants. *Kazanskij medicinskij zurnal* 2020; 101(2): 232–242, <https://doi.org/10.17816/kmj2020-232>.