

Кривкина Евгения Олеговна

**РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ СЕРДЕЧНО-
СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ, ОБЛАДАЮЩИХ СОБСТВЕННЫМИ
АТРОМБОГЕННЫМИ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Антонова Лариса Валерьевна

Официальные оппоненты:

Карпенко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением сердечно-сосудистой хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Нарыжная Наталья Владимировна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной кардиологии Научно-исследовательского института кардиологии - филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «08» декабря 2026 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В. И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте www.transpl.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСТИО 001.21

кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день отмечается непрерывный рост частоты развития атеросклероза среди населения, в том числе с поражением коронарных артерий и периферических кровеносных сосудов. В связи с этим возрастает количество хирургических вмешательств по восстановлению эффективного кровотока в поврежденных кровеносных сосудах посредством их протезирования, наложения шунтов или заплат [Pasheh-Tala S., 2016]. Наилучшим вариантом для хирургического лечения вышеназванной патологии является использование аутологичного материала (собственных кровеносных сосудов), который, однако, имеет ограниченную доступность по причине ранее перенесенных операций с использованием данных сосудов, прогрессирующего атеросклероза и других заболеваний. В свою очередь, изделия из ксеногенных и синтетических материалов, применяемые в клинической практике в настоящее время, подвержены высокому риску тромбообразования, а также гиперплазии неоинтимы в отдаленный послеоперационный период. В связи с этим наиболее актуальной является проблема отсутствия изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии на основе альтернативных материалов, не вызывающих подобных осложнений [Антонова Л. В. и др., 2018].

Одной из перспективных современных областей, занимающихся разработкой сосудистых протезов и заплат, является сосудистая тканевая инженерия [Антонова Л.В. и др., 2022; Shoji T. et al., 2018]. Данная область позволяет использовать нестандартные виды материалов для создания медицинских изделий (биodeградируемые полимеры, природные полимеры, аутологичные биологические жидкости и ткани), оригинальные подходы к их изготовлению, обеспечивающие пористость создаваемых конструкций и, вследствие этого, эффективную миграцию в стенку данных конструкций собственных клеток для формирования *in situ* новой здоровой ткани [Антонова Л.В. и др., 2022; Halдар J. et al., 2005; Hu, Y. T. et al., 2017; Ren, X. et al., 2015].

В настоящее время разработано много подходов для наделения тканеинженерных конструкций функциональной активностью, что достигается введением в состав матриц или присоединением к их поверхности биологически активных молекул и белков, содержащих сайты клеточной адгезии, что способствует селективному привлечению сосудистых клеток из окружающих тканей или кровотока. Таким образом, аналогом аутологичной сосудистой ткани или целого нативного сосуда может стать матрикс соответствующей конфигурации, обладающий не только функциональной активностью, но и пролонгированной резорбцией, что позволяет матриксу ремоделироваться с привлечением собственных клеток и тканей пациента с образованием нового сосуда или его части.

Одной из основных проблем, стоящих на сегодняшний день перед всемирным здравоохранением, являются бактериальные инфекции. В сердечно-сосудистой хирургии инфекция сосудистого трансплантата зачастую имеет тяжелые осложнения и сопровождается высокими показателями смертности [Aboshady I. et al., 2012; Revest M. et al., 2015]. Несмотря на размещение протезного трансплантата в неинфицированном поле, около 20% шунтов инфицируются, а окклюзия трансплантата может составлять от 21% до

27% [Murphy D.J. et al., 2016; Roth G.A. et al., 2020; Li H.L. et al., 2018]. При этом заражение операционного поля происходит даже несмотря на оптимальную асептическую технику и процедуры стерилизации. Этиология инфекций зачастую носит многофакторный характер, источником инфекции при протезировании могут послужить как экзогенные, так и эндогенные факторы (бактериемия) [Кривкина Е.О. и др., 2021; Kingsmore D.B. et al., 2021; Wilson W.R. et al., 2016].

Патогенная микробная адгезия к поверхности имплантированного материала приводит к образованию биопленки с высокой устойчивостью бактерий в составе биопленки к антибиотикам и защитным механизмам хозяина, что приводит к инфицированию имплантата [Антонова Л.В. и др., 2021; Gouveia E Melo R. et al., 2021; Levin S.R. et al., 2020]. В этом случае единственным выходом является замена имплантата, что также не гарантирует снижение риска повторного заражения. Однократное введение антибиотиков при операции и дальнейший пероральный приём лекарственных средств зачастую не позволяет достичь необходимой местной концентрации и, таким образом, вылечить эти инфекции, поскольку биопленка защищает бактерии от антибактериальных агентов [Антонова Л.В. и др., 2019; Levin S.R. et al., 2020].

В связи с высоким ростом возникновения резистентности к антибиотикам, хорошую перспективу на сегодняшний день имеет использование катионных амфифилов. Простые методы синтеза данных соединений, а также их высокая антибактериальная активность и низкая цитотоксичность позволяют создавать эффективное противомикробное покрытие на поверхности нетканых матриц [Hasan A. et al., 2014].

Нетканые биodeградируемые матрицы в силу своей высокой пористости и длительной резорбции с привлечением клеток моноцитарно-макрофагальной системы теоретически могут провоцировать не только тромбообразование, но и подвергаться микробному обсеменению и поддерживать процессы воспаления. В связи с этим подобные матрицы, хоть и являются отличной альтернативой синтетическим материалам, нуждаются в дополнительном модифицировании поверхности атромбогенными и противомикробными соединениями с целью предупреждения риска тромбоза или микробного обсеменения после имплантации в сосудистое русло [Shoji T. et al., 2018; Radke D. et al., 2018].

Поэтому разработка матриц для сердечно-сосудистой хирургии, обладающих собственными атромбогенными и противомикробными свойствами, является по-прежнему актуальной, так как способствует получению эффективных медицинских изделий, устойчивых к тромбозу и инфицированию в долгосрочной перспективе.

Степень разработанности темы исследования

Проблема частого тромбоза и микробного обсеменения имплантированных в артериальное русло медицинских изделий и высокая потребность в эффективных медицинских изделиях для нужд сердечно-сосудистой хирургии способствовали развитию широкого перечня методов поверхностного модифицирования, способствующих предупреждению фатальных рисков несостоятельности проектируемых изделий с целью повышения их долгосрочной эффективности. Поэтому данное исследование направлено на

улучшение функциональных характеристик высокопористых конструкций, имплантируемых в артериальное русло, которые позволяют повысить процент их эффективного использования в долгосрочной перспективе. В качестве модели для демонстрации эффективности выбранных подходов по модифицированию поверхности выбраны биodeградируемые сосудистые протезы малого диаметра, как прототипы изделий, наиболее подверженных тромбозу и микробному обсеменению.

В Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» разработаны и апробированы технологии создания функционально активных сосудистых протезов и заплат, содержащих проангиогенные факторы и адгезивные молекулы, тропные к эндотелиальным клеткам [Сенокосова Е.А и др., 2020; Антонова Л.В. и др., 2018; Антонова Л.В. и др., 2019]. Проведены работы по повышению тромборезистентности внутренней поверхности сосудистых протезов путем воссоздания *in vitro* эндотелиального монослоя с использованием преколонизирования напряжением сдвига [Ханова М.Ю. и др., 2021; Ханова М.Ю. и др., 2022].

Однако нерешенным остается вопрос одномоментной защиты стенки высокопористых конструкций, имплантируемых в артериальный кровоток, от тромбоза и микробного обсеменения.

Цель исследования

Разработать биodeградируемые матрицы с различными вариантами модифицирования катионным амфифилом и илопростом и оценить их эффективность в эксперименте.

Задачи исследования

1. Разработать различные способы поверхностного модифицирования пористых биodeградируемых матриц из поликапролактона с использованием катионного амфифила и илопроста.
2. Провести сравнительный анализ структурных, физико-механических, биосовместимых и противомикробных свойств биodeградируемых матриц до и после модифицирования илопростом и катионным амфифилом.
3. Изучить активность и скорость высвобождения илопроста и катионного амфифила, присоединенных различными способами к поверхности биodeградируемых матриц.
4. В эксперименте *in vivo* на модели крысы оценить антибактериальную активность матриц с катионным амфифилом, имплантированных в рану, инфицированную *Staphylococcus aureus*.
5. В эксперименте *in vivo* на модели овцы оценить долгосрочную эффективность и полноценность ремоделирования биodeградируемых матриц с атромбогенным и противомикробным покрытием на примере имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овец.

Научная новизна исследования

1. Впервые создана технология поверхностного модифицирования высокопористых биodeградируемых матриц катионным амфифилом с использованием ковалентной сшивки.
2. Впервые создана технология поверхностного модифицирования высокопористых биodeградируемых матриц катионным амфифилом и илопростом посредством комплексообразования.
3. Впервые проведен сравнительный анализ эффективности биodeградируемых матриц на основе поликапролактона, модифицированных илопростом и катионным амфифилом посредством комплексообразования и ковалентной сшивки.
4. Впервые в условиях моделирования инфицированной раны на крысах доказана эффективность противомикробного покрытия с катионным амфифилом, присоединенным к поверхности матриц посредством комплексообразования.
5. Впервые разработан биodeградируемый сосудистый протез малого диаметра из поликапролактона, модифицированный катионным амфифилом и илопростом посредством комплексообразования и продемонстрировавший долгосрочную проходимость на модели овцы.

Практическая значимость работы

Создание биodeградируемых матриц с атромбогенными и противомикробными свойствами станет основой для разработки эффективных медицинских изделий различной конфигурации, способных к полноценному ремоделированию и устойчивых к бактериальному обсеменению и тромбозу.

Методология и методы исследования

Методологической основой данного диссертационного исследования стали труды отечественных и зарубежных авторов в области разработок полимерных сосудистых протезов и заплат для артериальной реконструкции. Для решения поставленных задач использован комплекс физико-химических, микроскопических, культуральных, гистологических, иммуногистохимических и биологических методов исследования:

1. Метод электроспиннинга.
2. Метод послойного наплавления.
3. Физико-механические испытания.
4. Метод компьютерного моделирования.
5. Метод краевых углов смачивания.
6. Метод сканирующей электронной микроскопии.
7. Методы оценки гемосовместимости образцов.
8. Метод инфракрасной спектроскопии.
9. Метод электронно-зондового микроанализа.
10. Метод хромато-масс-спектрометрии.

11. Метод световой, флуоресцентной и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.
12. Культуральные методы исследования.
13. Имплантация опытных образцов полимерных матрицков внутримышечно крысам и сосудистых протезов в сонную артерию овец.
14. Метод ультразвуковой диагностики.
15. Метод гистологического исследования.
16. Метод иммуногистохимического исследования.
17. Метод иммунофлуоресцентного исследования.
18. Метод определения уровня мРНК.
19. Метод иммуноблоттинга.
20. Протеомный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанные способы поверхностного лекарственного модифицирования высокопористых матрицков на основе поли(ϵ -капролактон)а посредством ковалентной сшивки или комплексообразования позволяют присоединять катионный амфифил и илопрост, не меняя структуру поверхности и физико-механические свойства матрицков.
2. Катионный амфифил, присоединенный к поверхности матрицков на основе поли(ϵ -капролактон)а различными способами, обладает дозозависимым свойством провоцировать гемолиз эритроцитов и деформацию тромбоцитов при схожей антибактериальной активности против штаммов патогенных микроорганизмов.
3. Илопрост, присоединенный к поверхности матрицков на основе поли(ϵ -капролактон)а посредством комплексообразования в количестве 0,2 мкг/мл, сохраняет свои антиагрегантные свойства вне зависимости от дозы ионизирующего излучения (10 или 15 кГр), использованной для выполнения модифицирования, и высвобождается с поверхности матрицков в течение 90 суток.
4. Матрицксы на основе поли(ϵ -капролактон)а с катионным амфифилом, присоединенным посредством ковалентной сшивки, оказывают мощный цитотоксический эффект в отличие от матрицков с присоединением катионного амфифила в концентрации 0,25 мг/мл и илопроста в концентрации 0,2 мкг/мл методом комплексообразования.
5. Матрицксы на основе поли(ϵ -капролактон)а, содержащие минимальную концентрацию катионного амфифила (0,25 мг/мл), присоединенного к поверхности матрицков посредством комплексообразования, оказывают выраженную антибактериальную активность в отношении золотистого стафилококка в условиях инфицированной раны на модели крысы.
6. Сосудистые протезы диаметром 4 мм, изготовленные на основе поли(ϵ -капролактон)а и содержащие катионный амфифил в концентрации 0,25 мг/мл и илопрост в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенные посредством комплексообразования, спустя 6 месяцев имплантации в сонные артерии овец сохраняют свою проходимость в 50,0% случаев и подвергаются ремоделированию без молекулярных признаков инфекции и активного воспаления.

Степень достоверности и апробация результатов

Дизайн исследования, репрезентативное количество экспериментальных наблюдений, использование современных высокоинформативных методик, анализ научных данных с применением современных методов статистической обработки и программного обеспечения может свидетельствовать о высокой достоверности выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе. Выводы, представленные в настоящей работе, не получили критических замечаний и были опубликованы в рецензируемых изданиях.

Апробация работы состоялась 10 декабря 2025 года на заседании проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» в присутствии сотрудников клинических, экспериментальных отделов и лабораторий института.

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: XIX Международная конференция по химии и физикохимии олигомеров «Олигомеры-2022» (Суздаль, 2022); Международный конгресс CRISPR-2023 (Новосибирск, 2023); VI Российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2023); Юбилейный XII Всероссийский съезд трансплантологов (Москва, 2024); XIII Инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации, посвященный 80-й годовщине Победы в Великой Отечественной войне 1941-1945 годов» (Кемерово, 2025); XV Международный конгресс «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2025); VII Российский Национальный конгресс «Трансплантация и донорство органов» с международным участием (Москва, 2025).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты работы внедрены в исследовательскую деятельность отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и в преподавательскую деятельность кафедры Кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии «Кемеровского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором лично сформулирована концепция, цели и задачи, разработан дизайн исследования, разработаны и отработаны протоколы изготовления полимерных изделий методом электроспиннинга и их модификация лекарственными препаратами и соединениями с антибактериальной активностью, выполнены операции по имплантации биodeградируемых матриксов внутримышечно крысам и биodeградируемых сосудистых протезов – в сонную артерию овец. Автор полностью выполнил гистологическое

исследование и принимал участие в проведении иммунофлуоресцентного анализа эксплантированных образцов полимерных изделий, экспериментах на культурах эндотелиальных клеток. Сформировал базы данных, выполнил статистическую обработку, анализ и обобщение полученных результатов.

Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, консультативную и организационную помощь в выполнении данного исследования своему научному руководителю, доктору медицинских наук Л.В. Антоновой. Автор также искренне благодарит за профессиональное и личное участие сотрудников отдела экспериментальной медицины НИИ КПССЗ к.б.н. Сенокосову Е. А., к.б.н. Глушкову Т. В., к.б.н. Ханову М.Ю., к.м.н. Миронова А.В., Сахарову В.М.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, которые представлены 8 статьями, из них 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 4 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в Scopus, 2 – в Scopus и Web of Science); 7 работ являются материалами конференций. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав с описанием оригинальных результатов и заключения с последующими выводами и практическими рекомендациями. Список литературы включает 204 литературных источников, из которых 18 – отечественных и 186 – зарубежных авторов. Работа изложена на 210 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 63 рисунками и содержит 20 таблиц, 5 формул.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для изготовления полимерных матриц использовали биodeградируемый полимер – поликапролактон (poly-ε-caprolactone, ПКЛ) молекулярной массой 80000 kDa (Sigma Aldrich, США). В качестве растворителя использовали неполярный органический растворитель хлороформ ХЧ (Вектон, Россия). Полимерные трубчатые каркасы диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из 12% ПКЛ в трихлорметане при следующих параметрах: подающая игла размером 22G, напряжение на конце иглы – 20 кВ, скорость вращения коллектора – 1000 об/мин, скорость подачи раствора – 0,5 мл/ч, скорость перемещения иглы – 60 мм/с, расстояние до коллектора – 15 см, намоточный коллектор диаметром 4 мм. Формирование армирующей спирали на внешней поверхности протезов в прямом и обратном направлении проводили на оригинальной установке, состоящей из каретки с экструдером и вращающегося вала, в следующем режиме: скорость вращения вала – 1 об/с, скорость движения каретки – 1 мм/с, скорость подачи пластика – 0,5 мм/с (сопло экструдера – 0,5 мм), температура подачи волокна – 160°C.

Модифицирование лекарственными препаратами поверхности биodeградируемых матриц проводили двумя способами. Первый способ – методика комплексообразования, заключающаяся в полимеризации поверхности биodeградируемых матриц с поливинилпирролидоном (ПВП) и последующего присоединения лекарственных препаратов: готовые полимерные матрицы или трубчатые каркасы на основе ПКЛ погружали на 30 мин в 10% раствор ПВП в этиловом спирте с полным заполнением внутреннего канала трубчатых каркасов. По истечении времени матрицы изымали и высушивали на воздухе в течение 12 часов и полимеризовали с поверхностью матриц ПКЛ посредством ионизирующего излучения с помощью ускорителя ИЛУ-10 (ИЯФ СО РАН, Новосибирск) с общей поглощенной дозой 10 и 15 кГр. После завершения облучения матрицы отмывали в стерильных условиях от остатков неполимеризовавшегося ПВП и проводили присоединение илопроста (Ил) и амфифила 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид (А) к свободным реакционным группам ПВП. Для этого в стерильных условиях готовили рабочий раствор амфифила в концентрации 0,25 или 0,5, или 1,0 мг/мл (для этого 0,025 или 0,05, или 0,1 г сухого вещества амфифила растворяли в 2 мл метанола). Затем готовый раствор амфифила медленно добавляли в колбу со стерильной водой для инъекций при постоянном перемешивании, доводя объем до 96 мл. Затем в колбу вводили 2 мл илопроста из расчета 20 мкг на 100 мл готового раствора (концентрация 0,2 мкг/мл). Далее для присоединения лекарственных препаратов к ПВП покрытие отмытые матрицы выдерживали в приготовленном модифицирующем растворе в течение 30 минут в условиях постоянного покачивания. По истечении времени экспозиции матрицы и трубчатые каркасы ПКЛ/ПВП/Ил/А высушивали на воздухе в стерильных условиях в течение 12 часов.

Второй способ – методика связывания катионного амфифила 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид, содержащего в своей структуре аминогруппу, с поверхностью биodeградируемых матриц посредством ковалентной сшивки. Катионный амфифил с аминогруппой получен путем

каталитического восстановления азидогруппы в соединении водородом. Далее проведено ковалентное присоединение амфифила к поверхности полимера. Степень модификации для катионного амфифила, содержащего алифатическую аминоруппу, составила $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см². В качестве линкерной группы был выбран гексаметилендиамин, так как его использование позволяет вводить на поверхность полимерную поверхность сосудистых протезов несколько большее количество аминогрупп (до $8,9 \times 10^{-9}$ Моль/см²).

Детекцию и скорость высвобождения илопроста из биodeградируемых матриц оценивали посредством инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, катионного амфифила (по наличию брома) – с использованием метода электронно-зондового микроанализа, энергодисперсионной X-лучевой спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии. Структуру поверхности полимерных матриц до и после модифицирования и имплантации лабораторным животным оценивали с помощью стереомикроскопа SZ2-IL-ST (Olimpus, Япония) с окуляр-микрометром и сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония). Оценку механических свойств биodeградируемых матриц с различными вариантами поверхностного лекарственного модифицирования проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75 на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), с использованием тензодатчика номинальной нагрузки 50 Н с пределом допустимой погрешности $\pm 1\%$, скорость подъема траверсы при испытании 50 мм/мин, при температуре окружающей среды 37°C, поддерживаемой термокамерой. Предел прочности материала оценивали, как максимальное напряжение при одноосном растяжении (МПа) до разрушения. Упруго-деформативные свойства материала оценивали с помощью модуля Юнга (МПа). Толщину образцов измеряли толщиномером – ТР с пределом допустимой погрешности $\pm 0,01$ мм (прижимное усилие не более 1,5 Н). Полученные данные экспортировали как отношение относительного удлинения (мм) к напряжению (МПа), претерпеваемому образцом. Анализ краевых углов смачивания (θ) выполнен посредством измерения углов контакта дистиллированной воды с поверхностью полимерных матриц. Краевые углы дистиллированной воды измеряли в условиях оттекания (при подведении пузырька воздуха к поверхности, погруженной в жидкость) для обеспечения хорошей воспроизводимости результатов на образцах высокой пористости. Объем капель (пузырьков) 10-20 мкл. Краевые углы определяли путем обработки профиля видеоизображения капель (пузырьков) с помощью авторской программы Promer, в основе которой лежит поиск приближенного решения уравнения Лапласа, описывающего профили искривленных поверхностей раздела в гравитационном поле [Bogdanova Yu.G. et al., 2021]. Гемосовместимость поверхности матриц оценена посредством изучения гемолиза эритроцитов, адгезии и агрегации тромбоцитов после контакта поверхности матриц с кровью и обогащенной тромбоцитами плазмой. Оценка антибактериальной активности катионного амфифила, использованного для поверхностной модификации биodeградируемых матриц методом комплексообразования и ковалентной сшивки, выполнена посредством бактериологического исследования, в котором использованы следующие штаммы микроорганизмов: *K.pneumonia* № 5055, *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *P.mirabilis* ATCC 3177, *P.aeruginosa* ATCC 27853. Данные микроорганизмы выбраны для эксперимента ввиду их распространенности при инфекционных осложнениях

в кардиохирургии. Оценку матриксных свойств биodeградируемых матриц в зависимости от варианта поверхностной модификации лекарственными препаратами выполняли посредством оценки адгезии, жизнеспособности и пролиферативной активности гибридомы эндотелиальных клеток Ea.hy 926, культивированной на поверхности матриц. Дополнительная оценка цитотоксичности матриц выполнена в режиме реального времени посредством измерения клеточного индекса (КИ) в процессе культивирования клеток гибридомы Ea.hy 926 в присутствии матриц в условиях клеточного анализатора RTCA xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США).

Антибактериальная активность матриц с катионным амфифилом оценена на модели крысы в условиях инфицированной раны, содержащей *Staphylococcus aureus* в концентрации 10^5 - 10^{12} КОЕ/мл. Срок наблюдения – 14 суток.

Для оценки эффективности сочетанного действия илоprostа и катионного амфифила в составе прототипа конкретного медицинского изделия (в данной работе – сосудистого протеза диаметром 4 мм) в сонные артерии овец имплантированы сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А с катионным амфифилом и илоprostом, присоединенными к поверхности протезов методом комплексообразования в концентрациях 0,25 мг/мл и 0,2 мкг/мл, соответственно (опытная группа, n=12). В качестве основной группы сравнения выступили немодифицированные сосудистые протезы ПКЛ диаметром 4 мм (контрольная группа 1, n=6). С целью оценки вклада хирургической манипуляции на стенке сонной артерии овцы в повышение частоты ее тромбоза в отдаленном послеоперационном периоде выполнена аутоартериальная имплантация сонных артерий овец (контрольная группа 2, n=8). Срок наблюдения за имплантированными протезами составил 6 месяцев, за реимплантированными участками сонных артерий после аутоартериальной имплантации – 12 месяцев. Дополнительно инфицированная рана в зоне локации сосудистых протезов не моделировалась. Проходимость сосудистых протезов спустя 1 и 5 сутки, 1, 3 и 6 месяцев после имплантации оценивали с использованием портативной переносной системы цветной доплерографии премиум-класса M7 (Mindray, Китай). Эксплантированные образцы полимерных матриц и сосудистых протезов изучены с помощью сравнительного гистологического, иммунофлуоресцентного и протеомного анализов.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы «Graph Pad Prism 7.04». Биоинформатический анализ при протеомном профилировании проводился с использованием баз данных Gene Ontology, COMPARTMENTS, UniProtKB. Ключевые слова, Reactome и Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе было доказано, что для формирования антимикробного покрытия высокопористых матриц пригодны катионные амфифилы – химические соединения, механизм действия которых основан на разрушении бактериальных мембран и разрушении бактериальной рибонуклеиновой кислоты, что способно препятствовать не только микробной адгезии, но и формированию биопленки на поверхности медицинских изделий. Для поверхностного модифицирования ПКЛ-матриц, изготовленных методом электроспиннинга, использован 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид – катионный амфифил с высокими антибактериальными свойствами [Yarinich, L.A. et al., 2015]. Для сравнительной оценки эффективности присоединения 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида были использованы два вида поверхностного модифицирования: метод комплексообразования и метод ковалентной сшивки. Содержание 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида на поверхности ПКЛ-матриц после ковалентной сшивки составило $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см². При поверхностном модифицировании ПКЛ-матриц методом комплексообразования концентрация катионного амфифила составляла 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл. Доказано, что при инкубации в стерильном фосфатно-солевом буфере ПКЛ-матриц катионный амфифил оставался на поверхности матриц вне зависимости от способа его присоединения – посредством ковалентной сшивки или методом комплексообразования.

Модифицирование методом ковалентной сшивки снизило предел прочности ПКЛ-матриц в 1,5 раза ($p < 0,05$). По другим показателям между группами матриц, модифицированных методами ковалентной сшивки или комплексообразования, достоверных отличий не выявлено. Используемые методы поверхностного модифицирования также достоверно не меняли структуру поверхности, но оказывали различное влияние на биосовместимость конечного изделия.

Известная дозозависимая способность катионных амфифилов провоцировать гемолиз эритроцитов была выявлена и в настоящем исследовании. Так, использование 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл для поверхностного модифицирования ПКЛ-матриц методом комплексообразования и в количестве $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см² для модифицирования ПКЛ-матриц методом ковалентной сшивки приводило к гемолизу эритроцитов, контактировавших с поверхностью матриц, в 2,5%-100,0% случаев, соответственно, что превышало допустимый уровень гемолиза эритроцитов после контакта с материалом.

Модифицирование поверхности ПКЛ-матриц катионным амфифилом посредством ковалентной сшивки привело к значимому увеличению числа адгезированных тромбоцитов (в 8,8 раза выше, чем на поверхности немодифицированного ПКЛ-матрикса; $p < 0,05$) и повышению индекса деформации тромбоцитов (в 1,3 раза выше, чем на поверхности немодифицированного ПКЛ-матрикса; $p < 0,05$) после контакта поверхности данных матриц с обогащенной тромбоцитами плазмой (таблица 1). Присоединение методом комплексообразования 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-

ил)пентан тетрабромида в концентрации 0,25 мг/мл к поверхности ПКЛ-матриков не только не провоцировало гемолиз эритроцитов, но и не вызывало значимой адгезии и деформации тромбоцитов (таблица 1). Так, на поверхности матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл после контакта с обогащенной тромбоцитами плазмой определяли тромбоциты преимущественно II типа деформации (до 62,5% от общего количества), тогда как на поверхности матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл и ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл – тромбоциты III и IV типа деформации (от 89,0 до 94,8% от общего количества).

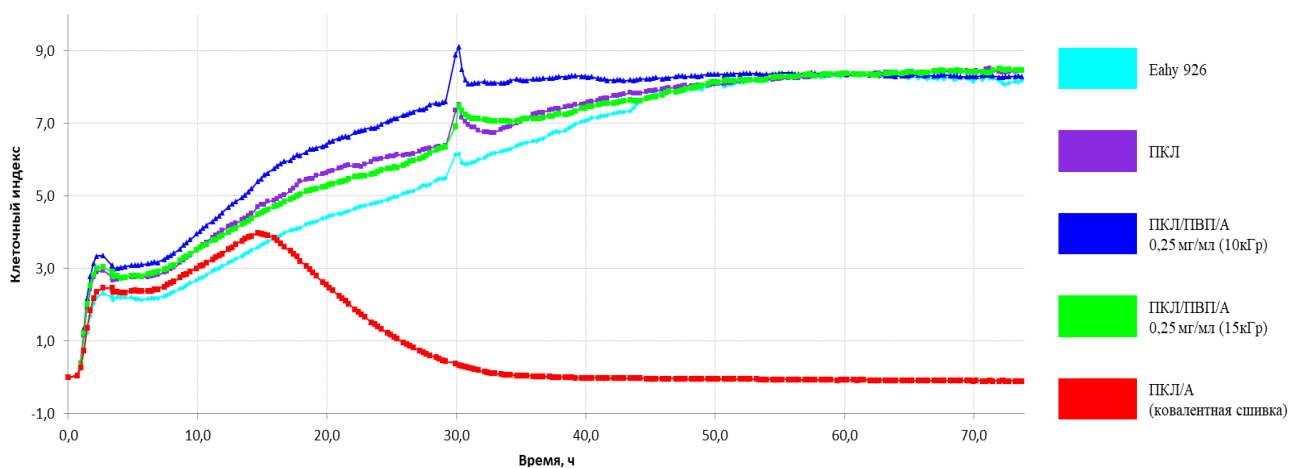
Таблица 1 - Показатели адгезии тромбоцитов после контакта с полимерными матриксами в зависимости от варианта поверхностного модифицирования

Вид образца	Тип деформации тромбоцита, %					Количество тромбоцитов на 1 мм ² Me (Q1-Q3)	Индекс деформации Me (Q1-Q3)
	I	II	III	IV	V		
ПКЛ	4,7	46,5	41,8	4,7	2,3	1734,0 (866,9-3179,0)	2,5 (2,0-2,7)
ПКЛ/ПВП (10 кГр)	8,1	64,9	16,2	10,8	0,0	1927,0 (96,3-3082,0)	2,2[#] (0,5-2,5)
ПКЛ/ПВП (15 кГр)	12,5	25,0	12,5	50,0	0,0	1728,0 (846,4-3058,0)	1,9[#] (0,0-2,8)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	3,7	56,0	31,4	8,9	0,0	1310,0 (0,0-3176,0)	1,3^{*/**/#} (0,0-2,6)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр)	3,0	27,3	45,5	21,2	3,0	1156,0 (0,0-3082,0)	1,91^{*/#} (0,0-2,9)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр)	0,0	0,8	63,8	33,1	2,3	7321,0^α (2697,0-9440,0)	3,4^α (3,2-3,5)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	12,5	62,5	18,8	6,2	0,0	770,6 (0,0-1445,0)	1,3^{*/**/#} (0,0-2,4)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр)	4,7	6,3	71,8	17,2	0,0	1349,0 (0,0-3275,0)	1,3^{*/**/#} (0,0-2,8)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр)	0,6	1,4	50,6	44,2	3,2	8091,0^α (963,3-9300,0)	3,4^α (1,6-3,6)
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	0,9	3,5	65,0	27,0	3,6	15219,0^α (5105,0-26104,0)	3,28^α (3,2-3,4)

Примечание: *-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ; **-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ/ПВП (10 кГр); ***-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ/ПВП (15 кГр); #-p<0,05 относительно ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр), ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр) и ПКЛ/А ковалентная сшивка; α-p<0,05 относительно всех прочих групп матриков с поверхностным лекарственным модифицированием, выполненным методом комплексообразования

Также доказано, что включение в состав лекарственного покрытия антиагреганта илопроста и его совместное присоединение с катионным амфифилом методом комплексообразования к поверхности ПКЛ-матриков обеспечило выход илопроста в течение 90 суток и значительно снизило показатели агрегации тромбоцитов после контакта матриков с обогащенной тромбоцитами плазмой (в 4,5-8,0 раз в зависимости от концентраций параллельно присоединяемого катионного амфифила; $p < 0,05$) в сравнении с матриками, не содержащими илопрост. Не выявлено достоверного влияния на агрегацию тромбоцитов дозы ионизирующего излучения в 10 и 15 кГр, используемого для полимеризации ПКЛ-матриков с ПВП с целью последующего присоединения лекарственных препаратов методом комплексообразования. Используемые режимы облучения также не оказывали пагубного влияния на активность и высвобождение лекарственных препаратов, на физико-механические и биосовместимые свойства матриков. В итоге для полимеризации матриков, подлежащих преclinical испытаниям, использовано облучение с общей поглощенной дозой 15 кГр, так как позволяет одновременно проводить полимеризацию поливинилпирролидона к поверхности биodeградируемых изделий и стерилизацию.

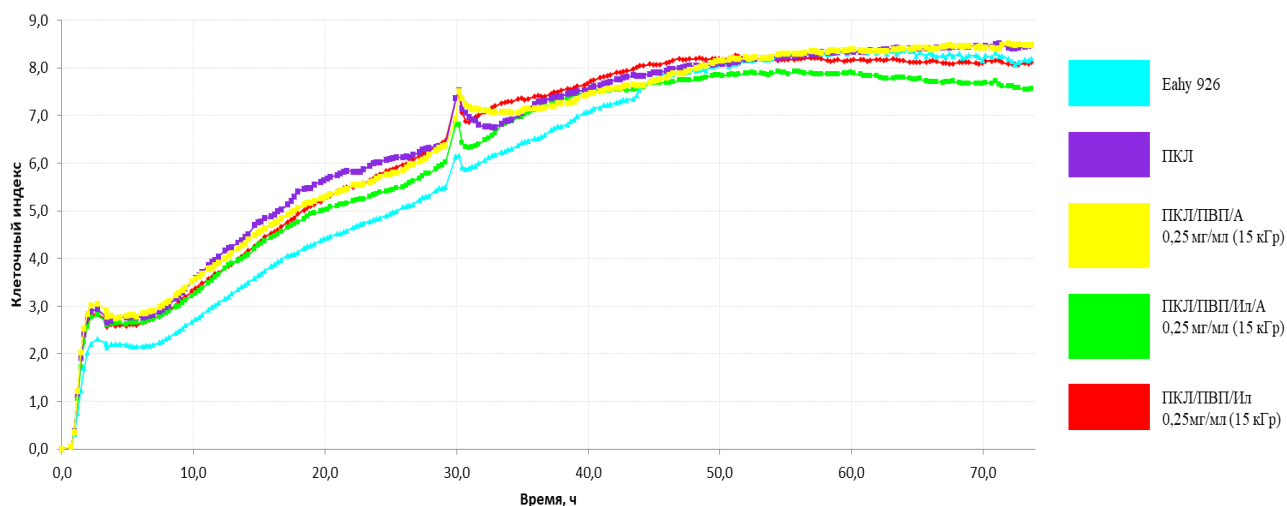
При сравнительной оценке цитотоксических свойств ПКЛ-матриков с различными вариантами поверхностного лекарственного модифицирования выявлен мощный цитотоксический эффект на эндотелиальные клетки линии Ea.hy 926 матриков ПКЛ/А (ковалентная сшивка), что выразилось в гибели клеточной культуры в присутствии данных матриков уже спустя 30 часов инкубирования (рисунок 1).



Примечание: за точку нормализации графика принята точка максимального осаждения клеток после добавления их в лунки планшета

Рисунок 1 – Динамика клеточного индекса культуры Ea.hy 926 в контроле и при культивировании в присутствии биodeградируемых матриков, немодифицированных и модифицированных катионным амфифилом методом комплексообразования и ковалентной сшивки

Сочетанное использование илопроста и катионного амфифила для модифицирования поверхности ПКЛ-матриков методом комплексообразования с применением ионизирующего излучения с общей поглощенной дозой 15 кГр не приводило к достоверному увеличению цитотоксичности матриков (рисунок 2).



Примечание: за точку нормализации графика принята точка максимального осаждения клеток после добавления их в лунки планшета

Рисунок 2 – Динамика клеточного индекса культуры Ea.hy 926 в контроле и при культивировании в присутствии биodeградируемых матриц, немодифицированных и модифицированных илопростом и катионным амфифилом методом комплексообразования с использованием дозы ионизирующего излучения 15 кГр

Клеточный индекс эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 спустя 72 часа культивирования в присутствии данных матриц не имел достоверных отличий от клеточного индекса клеток, культивированных изолированно или в присутствии немодифицированных матриц, или матриц с включением только илопроста или только катионного амфифила.

Полимерные матрицы ПКЛ/ПВП/Ил/А с катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенным методом комплексообразования, продемонстрировали отличные бактериостатические свойства в отношении *K.pneumonia* № 5055, *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *P.mirabillis* ATCC 3177, *P.aeruginosa* ATCC 27853 в месте наложения матриц на агар, не вызывая при этом гемолиза эритроцитов в агаре Мюллера-Хинтона с кровью, что будет гарантированно профилактировать микробное обсеменение стенок матриц после их имплантации в сосудистое русло без пагубного влияния на клетки крови. Однако ПКЛ-матрицы с ковалентной сшивкой катионного амфифила при схожей антибактериальной активности провоцировали гемолиз эритроцитов при наложении на агар Мюллера-Хинтона с кровью. Таким образом, по совокупности свойств, полученных при тестировании матриц на этапе *in vitro*, оптимальным явился матрикс ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр).

Тестирование антибактериальной эффективности матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) *in vivo* выполнено в агрессивных условиях инфицированной раны, моделирование которой выполнено посредством внутримышечной инъекции взвеси культуры *S.aureus* в концентрации 10^5 - 10^{12} КОЕ/мл в подготовленную резаную рану на холке крыс линии Wistar и ожидании развития инфекции в ране в течение 7 суток. Немодифицированные ПКЛ-матрицы выступили в качестве группы сравнения, а инфицированная рана – в качестве положительного контроля. Доказано уменьшение

гнойного содержимого в ранах с матриксами ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) уже через 7 суток после имплантации, которое коррелировало с уменьшением размера гнойных капсул. Небольшие бактериальные скопления обнаружены в основном в периферической части инфицированной раны в отличие от инфицированной раны, не содержащей матрикс с катионным амфифилом (рисунок 3).

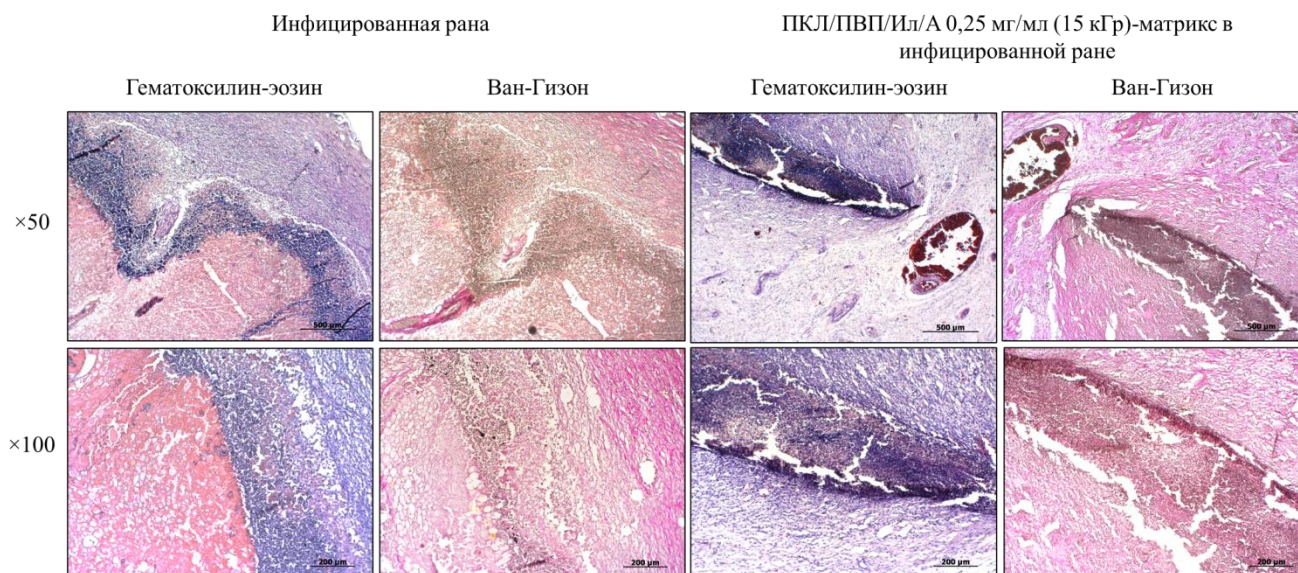


Рисунок 3 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)

При этом размер капсул вокруг немодифицированных ПКЛ-матриксов, содержание в них гнойного содержимого и хаотично разбросанных скоплений бактерий вокруг ПКЛ-матриксов к указанному сроку были больше (рисунок 4).

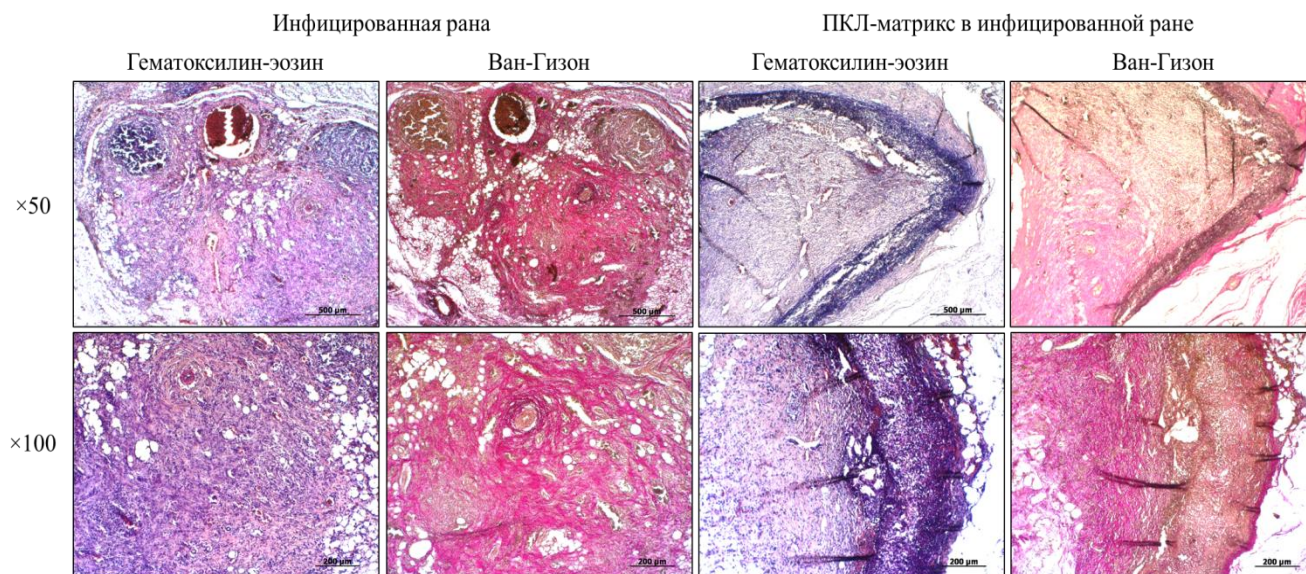


Рисунок 4 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации ПКЛ-матриксов – окраска гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону

Клеточный состав содержимого капсул подтвердил сохранение активного воспаления вокруг немодифицированных ПКЛ-матриков и его отсутствие вокруг матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр). Спустя 14 суток в опытной группе произошло практически полное очищение раны от гнойного содержимого в отличие от инфицированной раны, в которую не имплантировался матрикс с катионным амфифилом (рисунок 5).

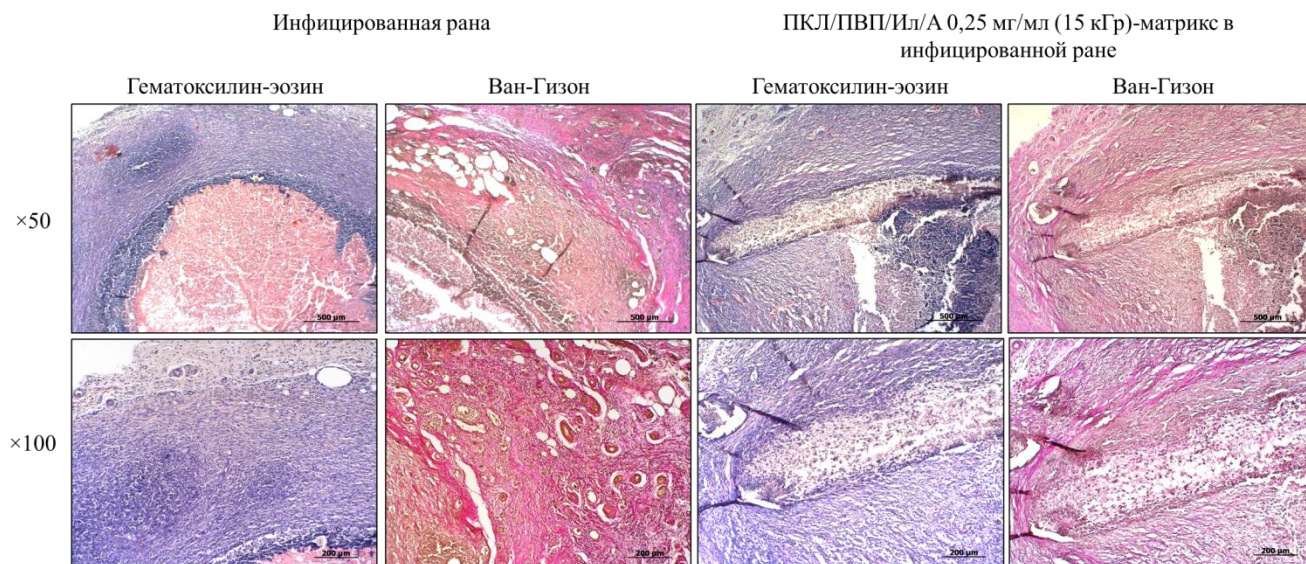


Рисунок 5 – Гистологическая картина спустя 14 суток имплантации матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)

При окраске препаратов по Граму спустя 14 суток вокруг матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А бактериальные скопления не были обнаружены ни в одном из случайно выбранных полей зрения, ни в периферической части инфицированной раны, ни в фиброзной ткани центра инфицированной раны.

Для оценки эффективности сочетанного действия илопроста и катионного амфифила в составе медицинского изделия, контактирующего с кровью после имплантации, в сонные артерии овец имплантированы сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А диаметром 4 мм с катионным амфифилом и илопростом, присоединенными к поверхности протезов методом комплексообразования в концентрациях 0,25 мг/мл и 0,2 мкг/мл, соответственно.

Перед этим на примере аутоартериальной имплантации выявлено, что стандартная хирургическая манипуляция на стенке сонных артерий овцы сама по себе способна приводить к тромбозу просвета реимплантированных участков сонных артерий в 12,5% случаев.

Использование для имплантации в сонную артерию овец сосудистых протезов ПКЛ с высокопористой стенкой и отсутствием атромбогенного лекарственного покрытия спустя 6 месяцев имплантации привело к тромбозу просвета сосудистых протезов в 100,0% случаев.

Поверхностное лекарственное покрытие, включившее в себя илопрост в концентрации 0,2 мкг/мл и катионный амфифил в концентрации 0,25 мг/мл,

способствовало повышению проходимости сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А: спустя 6 месяцев имплантации протезы сохраняли проходимость в 50,0% случаев.

Эксплантированные сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А сохраняли свой первоначальный диаметр, признаков аневризмообразования не выявлено (рисунок 6). На внешней поверхности эксплантированных протезов сквозь неоадвентицию просматривалась армирующая спираль без признаков нарушения целостности (рисунок 6, А). Внутренняя поверхность эксплантированных проходимых сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А была свободна от каких-либо признаков пристеночного тромбообразования, что косвенно подтверждает эффективность илопроста, присоединенного к поверхности протезов методом комплексообразования (рисунок 6, Б).



Рисунок 6 – Вид эксплантированного сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы: А – макрофото; Б – стереомикроскопия, ув.×10

На поперечном срезе стенки ремоделированного сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А визуализировалась неоинтима и неоадвентиция (рисунок 6, Б).

По результатам гистологического исследования выявлено, что спустя шесть месяцев имплантации трубчатый каркас сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А практически полностью резорбировался и заместился новообразованной сосудистой тканью, при этом нити внешней армирующей спирали сохраняли свою целостность (рисунок 7). Параллельно с резорбцией основного полимерного каркаса формировалась трехслойная новообразованная сосудистая ткань, по строению схожая со стенкой интактной сонной артерии овцы. Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А были эндотелизированы на всем протяжении, что является обязательным условием для сохранения гемосовместимости и тромборезистентности имплантированных протезов в долгосрочной перспективе. При этом не обнаружено активного воспалительного процесса, а незначительная кальцификация стенки протеза выявлена в одном случае (рисунок 7).



Рисунок 7 – Результаты гистологического исследования explантированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонные артерии овец, ув.×100

Неоинтима со стороны просвета протезов на всем протяжении выстлана зрелыми эндотелиальными клетками CD31+vWF+, расположенными на мембране, содержащей коллаген IV типа (рисунок 8).

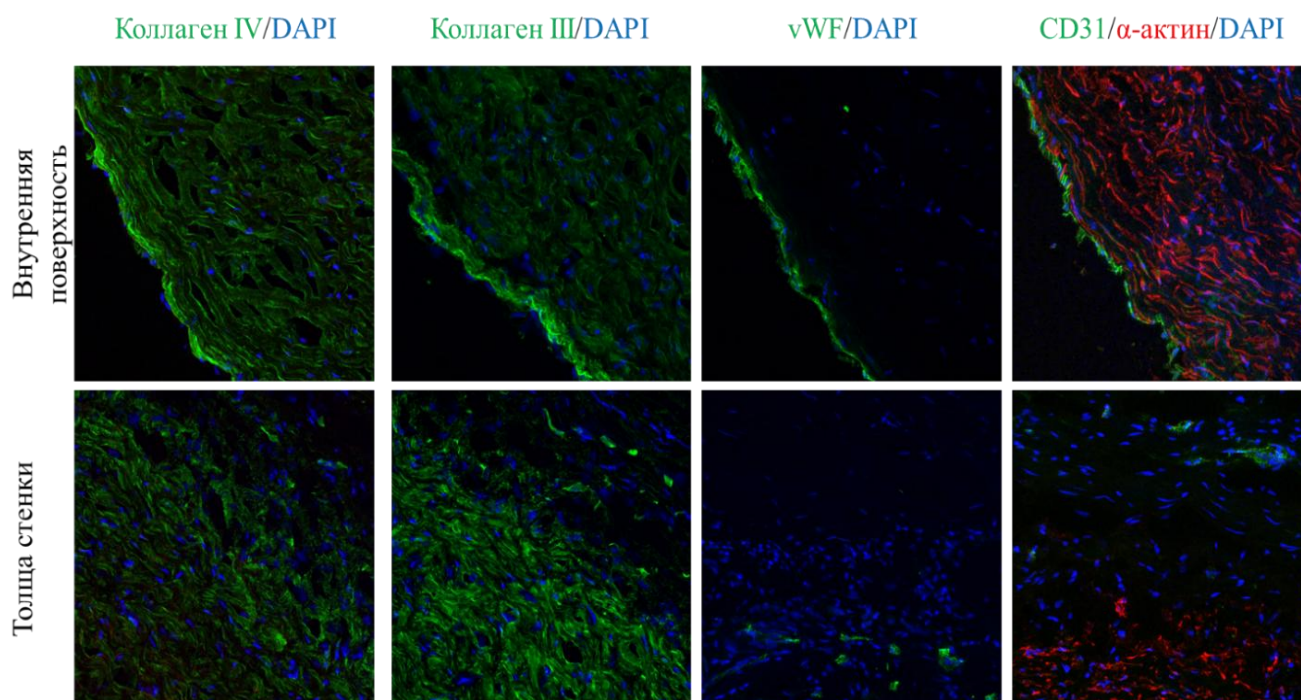


Рисунок 8 – Результаты иммунофлуоресцентного исследования explантированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: панель CD31/α-актин/DAPI: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие α-актин (красное свечение); панель Coll I/Coll IV/DAPI: коллаген I типа (красное свечение), коллаген IV типа (зеленое свечение); панель Coll III/DAPI: коллаген III типа (зеленое свечение); панель vWF/DAPI: фактор фон Виллебранда (зеленое свечение). Ядра всех клеток окрашены ядерным красителем DAPI (синее свечение), ув.×200

В неоинтима были богато представлены клетки, содержащие α -актин, и коллагены III и IV типа (рисунок 8). Средний слой содержал остаточные нити ПКЛ и фибробластоподобные клетки, окруженные обилием коллагеновых волокон III и IV типа. Неоадвентиция характеризовалась большим количеством коллагеновых пучков и *vasa vasorum*.

Чтобы оценить все тонкости процесса ремоделирования и возможного косвенного влияния на данный процесс лекарственных препаратов, входящих в состав атромбогенного и противомикробного лекарственного покрытия сосудистых протезов, впервые было выполнено протеомное профилирование эксплантированных биodeградируемых сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А в сравнении с интактными контрлатеральными сонными артериями овец. Анализ основных компонент показал четкое различие интактных сонных артерий и сосудистых протезов (объясняемая вариация 71%), тогда как вариация между образцами, составляющими каждую группу, была относительно низкой (объясняемая вариация 8%). Количество уникальных или значительно активированных белков составило 145 в интактных сонных артериях и 128 – в сосудистых протезах. В интактных сонных артериях выявлено большое количество сократительных белков, служащих маркерами сократительных гладкомышечных клеток (СГМК) (7/145); белков внеклеточного матрикса, составляющих базальную мембрану (16/145); белков антиоксидантной защиты (5/145), включая Cu-Zn, митохондриальную супероксиддисмутазу и глутатион S-трансферазу. Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А почти не содержали специфических маркеров СГМК (например, тяжелой цепи миозина гладких мышц и смузелина), а наиболее распространенные маркеры СГМК (например, кальпонин и трансгелин/SM22 α) демонстрировали незначительную относительную экспрессию в сосудистых протезах ПКЛ/ПВП/Ил/А. Хроническое воспаление, выявленное в стенке сосудистых протезов, вызвано активной работой макрофагов, что подтверждено обнаружением многочисленных лизосомальных маркеров и экспрессией CD68, слабой антиоксидантной защитой, являющейся ответной реакцией на окислительный стресс. Вся полученная картина - итог естественных процессов биорезорбции полимерного трубчатого каркаса протезов, происходящих с участием клеток ретикуло-гистиоцитарной системы, и никак не связана с инфицированием и развившемся на его фоне истинным воспалением. Сосудистые протезы не имели молекулярных признаков инфекции и кальцификации.

Таким образом, преимуществом разработанных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А явилось контролируемое замещение биodeградируемого трубчатого каркаса новообразованной сосудистой тканью, по строению очень схожей с тканью интактной контрлатеральной сонной артерии овцы (в соответствии с результатами протеомного профилирования – идентичность 1028 белков из 1301 изученного). Ремоделирование не сопровождалось осложнениями, такими как тромбоз, массивная кальцификация и инфекция).

Однако наиболее существенным недостатком процессов естественного ремоделирования сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А явилось отсутствие эластина и белков истинных сократительных гладкомышечных клеток. Это потенциально может привести к недостаточной податливости стенки протезов под воздействием пульсовой волны кровотока, либо склонности новообразованной сосудистой ткани к аневризматическому расширению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка коммерчески доступных медицинских изделий, обладающих атромбогенной и противомикробной активностью, имеет большое значение для текущих потребностей трансплантологии, сердечно-сосудистой хирургии, нейрохирургии и микрохирургии. При создании высокопористых матриксов, предназначенных для имплантации в кровотоки, нельзя исключать возможность их микробного обсеменения в случаях существующей у пациентов транзитной бактериемии [Liesenborghs L. et al., 2020]. Инфекция высокопористого трансплантата, особенно если это сосудистый протез, может спровоцировать или еще больше усилить тромбоз [Liesenborghs L. et al., 2020; Polzin, A. et al., 2022]. Поэтому поверхность разрабатываемых высокопористых медицинских изделий, особенно на основе биodeградируемых полимеров, должна быть защищена от возможности микробной и тромбоцитарной адгезии.

В настоящей работе было доказано, что для формирования антимикробного покрытия высокопористых матриксов пригодны катионные амфифилы с широким спектром антибактериальной активности и антиагреганты. Для сравнительной оценки эффективности присоединения катионного амфифила 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида были использованы два вида поверхностного модифицирования: метод комплексообразования и метод ковалентной сшивки. Содержание 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида на поверхности ПКЛ матриксов при ковалентной сшивке составило $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см². При поверхностном модифицировании ПКЛ-матриксов методом комплексообразования исследованы три концентрации катионного амфифила: 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл.

Доказано, что после инкубации в стерильном фосфатно-солевом буфере ПКЛ-матриксов катионный амфифил оставался на поверхности матриксов вне зависимости от способа его присоединения – посредством ковалентной сшивки или методом комплексообразования. Также доказано, что включение в состав лекарственного модифицирующего покрытия антиагреганта илоprostа и его совместное присоединение с катионным амфифилом к поверхности ПКЛ-матриксов методом комплексообразования обеспечило высвобождение илоprostа в течение 90 суток и значительно снизило показатели адгезии и агрегации тромбоцитов после контакта матриксов с обогащенной тромбоцитами плазмой.

Полимерные матриксy ПКЛ/ПВП/Ил/А с катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, и илоprostом в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенными методом комплексообразования, продемонстрировали оптимальные биосовместимые и бактериостатические свойства в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Сосудистые протезы с катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл и илоprostом в концентрации 0,2 мкг/мл демонстрировали проходимость в 50,0% случаев спустя 6 месяцев имплантации в сонные артерии овец и ремоделирование без признаков воспаления и кальцификации, а также синхронизацию процессов деградации стенки протезов с регенерацией сосудистой ткани, что подтверждено в ходе протеомных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Модифицирование поверхности высокопористых матриксов на основе поли(ε-капролактон)а посредством ковалентной сшивки или комплексообразования позволяет присоединять катионный амфифил 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабисцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид и илопрост, сохраняя первоначальную структуру поверхности и физико-механические свойства матриксов.

2. Поверхностное модифицирование катионным амфифилом посредством ковалентной сшивки матриксов на основе поли(ε-капролактон)а оказывает негативное воздействие на гемосовместимые свойства матриксов: гемолиз эритроцитов при контакте с матриксами возникает в 100,0% случаев; выраженная адгезия тромбоцитов с повышением степени их деформации до III-V типа – в 95,6% случаев.

3. Катионный амфифил в концентрации 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл, присоединенный к поверхности матриксов на основе поли(ε-капролактон)а посредством комплексообразования, вызывает гемолиз эритроцитов в 2,5%-35,35%, соответственно. С увеличением концентрации амфифила от 0,5 мг/мл до 1,0 мг/мл нарастает количество адгезированных к поверхности матриксов тромбоцитов с превалированием тромбоцитов III-V типа – в 89,0-98,0% случаев, соответственно. Матриксы на основе поли(ε-капролактон)а, содержащие минимальную концентрацию катионного амфифила (0,25 мг/мл), присоединенного к поверхности матриксов посредством комплексообразования, не провоцируют гемолиз эритроцитов и вызывают незначительную адгезию тромбоцитов с превалированием тромбоцитов II типа – 62,5%.

4. Антибактериальная активность матриксов на основе поли(ε-капролактон)а с катионным амфифилом, присоединенным в различных концентрациях методами ковалентной сшивки или комплексообразования, проявляется бактериостатическим эффектом в зоне наложения матриксов на агар без формирования зон подавления роста патогенных штаммов микроорганизмов.

5. Илопрост, присоединенный к поверхности матриксов на основе поли(ε-капролактон)а посредством комплексообразования в количестве 0,2 мкг/мл, сохраняет свои антиагрегантные свойства вне зависимости от дозы ионизирующего излучения (10 или 15 кГр), примененной для выполнения модифицирования, и высвобождается с поверхности матриксов в фосфатно-солевой буфер в течение 90 суток.

6. Матриксы на основе поли(ε-капролактон)а с катионным амфифилом, присоединенным посредством ковалентной сшивки, оказывают мощный цитотоксический эффект на эндотелиальные клетки линии Ea.hy 926, что приводит к гибели клеточной культуры спустя 30 часов инкубирования в присутствии данных матриксов. Цитотоксичность матриксов с катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл и илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенных посредством комплексообразования с использованием различных доз ионизирующего излучения (10 и 15 кГр), крайне низкая и достоверно не отличается от контроля, в качестве которого выступили эндотелиальные клетки, культивированные на поверхности культурального пластика.

7. Матриксy на основе поли(ε-капролактон)а, содержащие минимальную концентрацию катионного амфифила (0,25 мг/мл), присоединенного к поверхности матриксов посредством комплексообразования, оказывают выраженную антибактериальную активность в условиях инфицированной раны на модели крысы уже спустя 7 суток после имплантации с полным очищением раны от бактерий и гнойного содержимого через 14 суток.

8. Сосудистые протезы диаметром 4 мм, изготовленные на основе поли(ε-капролактон)а и содержащие катионный амфифил в концентрации 0,25 мг/мл и илопрост в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенные посредством комплексообразования, спустя 6 месяцев имплантации в сонные артерии овец сохраняют свою проходимость в 50,0% случаев, подвергаются эндотелизации на всем протяжении и синхронизированному с деградацией стенки протеза ремоделированию, что проявилось в виде увеличения количества белков, участвующих в трансляции, фолдинге и сборке белков, энергетическом метаболизме. Отсутствие молекулярных признаков инфекции и активного воспаления подтверждено отсутствием компонентов комплемента и маркеров нейтрофилов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для предупреждения инфицирования высокопористых медицинских изделий из биodeградируемых полимеров рекомендуется их предварительное поверхностное модифицирование методом комплексообразования катионным амфифилом – 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониабикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромидом.

2. При использовании высокопористых биodeградируемых матриксов в качестве сосудистых протезов рекомендуется выполнять их предварительное поверхностное модифицирование методом комплексообразования илопростом – антиагрегантом, профилактирующим тромбоз просвета сосудистых протезов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Подходы к антитромботической модификации сосудистых имплантатов / В.В. Севостьянова, Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова // Казанский медицинский журнал. – 2020. – Т. 101. – №2. С. 232-242.
- 2) Сосудистые протезы с противомикробным покрытием: экспериментальные разработки и внедрение в клиническую практику / Е.О. Кривкина, В.Г. Матвеева, Л.В. Антонова // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2021. – №3. – С. 90-102.
- 3) Полимерные материалы с антибактериальной активностью: проблемы выбора низкомолекулярных антибактериальных агентов / В.Н. Сильников, Л.С. Королева, Е.О. Кривкина, Л.С. Барбараш // Химия в интересах устойчивого развития. – 2021. – №29. –С. 494–506.
- 4) Оценка биосовместимости и антимикробных свойств биodeградируемых сосудистых протезов различного полимерного состава с тромbogenным и противомикробным лекарственным покрытием / Л.В. Антонова, Е.О. Кривкина, В.Н. Сильников, О.В. Груздева, М.А. Резцова, Т.Н. Акентьева, Т.В. Глушкова, В.О. Ткаченко, В.М. Сахарова, Л.С. Барбараш // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. Т.23. – №2. – С.122-136.
- 5) Controlled and Synchronised Vascular Regeneration upon the Implantation of Ploprost-and Cationic Amphiphilic Drugs-Conjugated Tissue-Engineered Vascular Grafts into the Ovine Carotid Artery: A Proteomics-Empowered Study / L.V. Antonova, A.G. Kutikhin, V.V. Sevostianova, A.A. Lobov, E.A. Repkin, E.O. Krivkina, E.A. Velikanova, A.V. Mironov, R.A. Mukhamadiyarov, E.A. Senokosova, M.Yu. Khanova, D.K. Shishkova, V.E. Markova, L.S. Barbarash // Polymers. – 2022. – Vol.14. – №23. – P.5149.
- 6) Comparison of the Patency and Regenerative Potential of Biodegradable Vascular Prostheses of Different Polymer Compositions in an Ovine Model / L.V. Antonova, V.V. Sevostianova, V.N. Silnikov, E.O. Krivkina, E.A. Velikanova, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, E.A. Senokosova, M.Yu. Khanova, T.V. Glushkova, T.N. Akentieva, A.V. Sinitskaya, V.E. Markova, D.K. Shishkova, A.A. Lobov, E.A. Repkin, A.D. Stepanov, A.G. Kutikhin, L.S. Barbarash // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol.24. – №10. – P.8540.
- 7) Гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра: результаты шестимесячной имплантации на модели овцы / Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Е.А. Великанова, А.В. Сеницкая, А.В. Миронов, А.Р. Шабает, М.Ю. Ханова, Е.А. Торгунакова, Л.В. Антонова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2024. – Т.26. – № 2. – С.105-118.
- 8) Морфогенетические особенности ремоделирования биodeградируемых сосудистых протезов в зависимости от их функциональной составляющей / М.Ю. Ханова, Е.О. Кривкина, Е.А. Сенокосова, А.В. Сеницкая, В.Г. Матвеева, А.В. Миронов, Л.В. Антонова // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2025. – Т.14. – № 3. – С. 27-39.

ПАТЕНТЫ

1. Пат. RU № 2702239 Технология изготовления функционально активных биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра с лекарственным покрытием / Л.В. Антонова, В. В. Севостьянова, М.А. Резвова, Е. О. Кривкина, Ю. А. Кудрявцева, О. Л. Барбараш, Л. С. Барбараш; заявитель и патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний" (НИИ КПССЗ) (RU). – № 2019119912, дата регистрации: 07.10.2019; опубл. 07.10.2019.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

А – Амфифил

Ил – Илопрост

ПКЛ – Поликапролактон

ПВП - Поливинилпирролидон

СГМК – Сократительные гладкомышечные клетки