

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний»**

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Антонова Лариса Валерьевна

Кемерово 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОСТЬ И ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗРАБОТКИ МАТРИКСОВ С АТРОМБОГЕННЫМИ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	19
1.1 Проблема отсутствия эффективных медицинских изделий для реконструкции артериального русла	19
1.2 Антитромботические лекарственные средства, используемые для модификации поверхности изделий, предназначенных для нужд сердечно- сосудистой хирургии	22
1.3 Подходы по формированию антимикробных покрытий конструкций, имплантируемых в кровеносное русло.....	35
1.3.1 Противомикробная эффективность ионов серебра.....	38
1.3.2 Противомикробная активность антибактериальных препаратов в составе медицинских изделий, имплантируемых в кровеносное русло ..	40
1.3.3 Комбинированная антибактериальная обработка имплантатов для нужд сердечно-сосудистой хирургии	46
1.3.4 Особенности противомикробной обработки высокопористых изделий из биodeградируемых полимеров	48
1.4 Перспектива использования антимикробных пептидов и катионных амфифилов в качестве низкомолекулярных модификаторов полимерных материалов.....	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
2.1 Изготовление биodeградируемых матриксов с лекарственным покрытием.....	55

2.1.1 Изготовление полимерных матриц методом электроспиннинга	55
2.1.2 Изготовление полимерных трубчатых каркасов методом электроспиннинга	56
2.1.3 Формирование внешней армирующей спирали трубчатых каркасов.....	56
2.2 Формирование лекарственного покрытия.....	57
2.2.1 Присоединение лекарственных препаратов к поверхности биodeградируемых матриц методом комплексообразования	57
2.2.2 Присоединение катионного амфифила к поверхности биodeградируемых матриц методом ковалентной сшивки.....	60
2.3 Стереомикроскопия биodeградируемых трубчатых каркасов до и после формирования внешней армирующей спирали	61
2.4 Сканирующая электронная микроскопия	61
2.4.1 Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых матриц до имплантации	61
2.4.2 Сканирующая электронная микроскопия поверхности эксплантированных биodeградируемых матриц	62
2.5 Физико-механические испытания	63
2.6 Определение краевых углов смачивания	64
2.7 Оценка гемосовместимости полимерных образцов	64
2.7.1 Оценка степени гемолиза эритроцитов	64
2.7.2 Оценка адгезии и индекс деформации тромбоцитов	65
2.7.3 Оценка агрегации тромбоцитов	67
2.8 Детекция и скорость высвобождения лекарственных препаратов из биodeградируемых матриц	67

2.8.1 Качественная и количественная оценка наличия илопроста на поверхности биodeградируемых матриксов и в анализах	67
2.8.2 Качественная и количественная оценка наличия катионного амфифила на поверхности биodeградируемых матриксов.....	68
2.9 Оценка антибактериальной активности катионного амфифила в составе биodeградируемых матриксов	70
2.10 Оценка матричных свойств биodeградируемых матриксов в зависимости от варианта поверхностной модификации лекарственными препаратами	70
2.10.1 Заселение полимерных матриксов эндотелиальными клетками	70
2.10.2 Оценка клеточной жизнеспособности	71
2.10.3 Оценка клеточной пролиферации	72
2.10.4 Оценка цитотоксичности матриксов с различной лекарственной наполненностью	72
2.11 Имплантация полимерных матриксов	74
2.11.1 Моделирование внутримышечной инфицированной раны на модели крыс	74
2.11.2 Имплантация матриксов в инфицированную рану крыс	75
2.11.3 Имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец..	76
2.12 Ультразвуковой мониторинг проходимости имплантированных сосудистых протезов.....	77
2.13 Гистологическое исследование	78
2.14 Иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных сосудистых протезов.....	80
2.15 Сравнительный протеомный анализ.....	81

2.16 Статистические методы	84
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ И	
ТЕСТИРОВАНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ <i>IN VITRO</i>	85
3.1 Оценка качества поверхностного модифицирования биodeградируемых матриксов лекарственными препаратами	85
3.1.1 Определение ИК-спектров основных составляющих матриксов до и после модифицирования	85
3.1.2 Количественная оценка высвобождения илопроста, присоединенного к поверхности матриксов методом комплексообразования	89
3.1.3 Оценка присутствия катионного амфифила на поверхности биodeградируемых матриксов и интенсивности его высвобождения	92
3.2 Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых матриксов в зависимости от варианта поверхностного модифицирования	99
3.3 Физико-механические характеристики биodeградируемых матриксов в зависимости от вариантов поверхностного модифицирования	101
3.4 Краевые углы смачиваемости	103
3.5 Результаты оценки гемосовместимости биodeградируемых матриксов	104
3.5.1 Гемолиз эритроцитов	104
3.5.2 Адгезия тромбоцитов	105
3.5.3 Агрегация тромбоцитов	111
3.6 Результаты изучения матриксных свойств полимерных образцов в зависимости от вариантов поверхностного модифицирования	113

3.6.1 Скрининг цитотоксичности матриксов в режиме реального времени.....	113
3.6.2 Адгезия, жизнеспособность и пролиферативная активность эндотелиальных клеток при культивировании на поверхности матриксов	117
3.7 Оценка антимикробной эффективности катионного амфифила в составе матриксов	121
ГЛАВА 4. АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАТРИКСОВ С КАТИОННЫМ АМФИФИЛОМ В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЫ.....	128
4.1 Результаты гистологического исследования эксплантированных образцов матриксов	131
4.2 Результаты окраски эксплантированных образцов по Граму	135
4.3 Результаты сканирующей электронной микроскопии эксплантированных матриксов с окружающими тканями	138
ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ С АТРОМБОГЕННЫМ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМ ПОКРЫТИЕМ.....	143
5.1 Основные характеристики сосудистых протезов с атромбогенным и противомикробным покрытием	143
5.2 Сравнительные результаты долгосрочной проходимости сосудистых протезов.....	145
5.2.1 Результаты аутоартериальной имплантации	145
5.2.2 Результаты имплантации немодифицированных сосудистых протезов.....	147

5.2.3 Результаты имплантации сосудистых протезов с атромбогенным и противомикробным покрытием	152
5.2.4 Результаты протеомного профилирования	157
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	173
ВЫВОДЫ	181
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	184
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	185
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	187

ВВЕДЕНИЕ

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 [141]. 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 [5].

Одной из перспективных современных областей, занимающихся разработкой сосудистых протезов и заплат, является сосудистая тканевая инженерия [13, 172]. 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 [13, 91, 104, 177]. В настоящее время разработано много подходов

для наделения тканеинженерных конструкций функциональной активностью, что достигается введением в состав матриксов 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 [22, 124]. Несмотря на размещение протезного трансплантата в неинфицированном поле, около 20% шунтов инфицируются, а окклюзия трансплантата может составлять от 21% до 27% [60, 86, 115]. 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) [8, 144, 199]. 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 [11, 127, 164]. 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 [10, 164].

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 [93].

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 [172, 193].

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 [3, 5, 10]. Проведены работы по повышению тромборезистентности внутренней поверхности сосудистых протезов путем воссоздания *in vitro* эндотелиального монослоя с использованием преколонизирования напряжением сдвига [17, 18].

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 матриксов 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 матриксов 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 матриксов.

2. Катионный амфифил, присоединенный к поверхности матриксов 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 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), использованной для выполнения модифицирования, и высвобождается с поверхности матриксов в течение 90 суток.

4. Матриксы на основе поли(ε-капролактон)а с катионным амфифилом, присоединенным посредством ковалентной сшивки, оказывают мощный цитотоксический эффект в отличие от матриксов с присоединением катионного амфифила в концентрации 0,25 мг/мл и илопроста в концентрации 0,2 мкг/мл методом комплексообразования.

5. Матриксы 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 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 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 матриц в 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 источника, из которых 18 – отечественных и 186 – зарубежных авторов. Работа изложена на 210 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 63 рисунками и содержит 20 таблиц, 5 формул.

ГЛАВА 1. АКТУАЛЬНОСТЬ И ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗРАБОТКИ МАТРИКСОВ С АТРОМБОГЕННЫМИ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМИ СВОЙСТВАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Проблема отсутствия эффективных медицинских изделий для реконструкции артериального русла

Ведущей причиной возрастающей смертности населения во всем мире являются сердечно-сосудистые заболевания, а также связанный с ним ряд патологических состояний, таких как ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового кровообращения, тромбоз внутренних вен, артерий и другие заболевания [87, 94, 126, 130, 141].

Распространенные методы восстановления просвета сосудов заключаются в использовании малоинвазивных процедур: баллонной дилатации и установки внутрисосудистого стента [14, 133, 175, 176]. При восстановлении просвета кровеносных сосудов малоинвазивными хирургическими методами используют стенты на основе биосовместимых металлов и/или полимеров, которые доставляют в стенозированные сосуды через небольшое отверстие в бедренной артерии [14, 133]. Несмотря на то, что ангиопластика и имплантация стента являются часто выполняемыми операциями при лечении сосудистых заболеваний, оба этих метода лечения имеют свои осложнения. Так, при ангиопластике высок риск рестеноза, тогда как при имплантации стента может наблюдаться миграция стента, разрыв сосудов, образование аневризм, компрессия или деформация стента [85].

Высокая распространенность атеросклероза внутренних сонных артерий и совершенствование диагностики данного заболевания приводит к ежегодному повышению числа операций каротидной эндартерэктомии с целью восстановления проходимости сонной артерии [2, 119].

На сегодняшний день используют три подхода к лечению стеноза сонной артерии: консервативное, каротидная эндартерэктомия (КЭА) и стентирование [183]. Однако несмотря на развитие малоинвазивных методов, КЭА является «золотым стандартом» хирургического лечения и профилактики острого нарушения мозгового кровообращения [2, 16, 183]. Однако наличие пролонгированных атеросклеротических бляшек не позволяет выполнить процедуру стандартным и наиболее часто используемым эверсионным способом каротидной эндартерэктомии, в связи с чем возникает необходимость закрывать артериотомный доступ с помощью заплаты [6, 16, 111].

Опубликовано большое количество работ со сравнительными результатами реконструкции сонной артерии с использованием биологических и синтетических заплат. Результаты рандомизированных контролируемых исследований по эффективности использования заплат из полиэтилентерефталата (Polyethyleneterephthalate, PET), политетрафторэтилена (Polytetrafluoroethylene, PTFE) и бычьего перикарда показали широкий спектр осложнений в отдаленном периоде с одинаковой частотой [2, 16, 65]. Следовательно, используемые на сегодняшний день заплаты не могут в полной степени удовлетворить потребности сосудистой хирургии, что делает необходимым разработку новых материалов и подходов к созданию эффективных сосудистых заплат [2]. Тканеинженерные сосудистые заплаты помогли бы избежать проблем, возникающих при использовании вышеназванных материалов за счет возможности восстановления собственных тканей в месте имплантации. Для достижения такого результата биodeградируемый матрикс должен обладать высокой биосовместимостью, обеспечивать миграцию клеток в толщу материала, их пролиферацию и дифференцировку [2, 16].

В ситуациях же, требующих полную замену поврежденных кровеносных сосудов, золотым стандартом является использование аутологичных вен или артерий пациента. Однако свыше 30% пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями не имеют подходящих сосудов вследствие их использования в

более ранних операциях или атеросклеротического повреждения, пожилого возраста пациента, либо других осложнений, вызванных сопутствующими заболеваниями [26, 112, 139, 141]. Более того, при необходимости повторного шунтирования зачастую очень сложно найти подходящий сосуд [196].

Альтернативой аутооттрансплантатам являются клинически одобренные синтетические сосудистые протезы из PET и PTFE [7, 43, 65, 99]. Они демонстрируют высокую эффективность при протезировании крупных сосудов с внутренним диаметром более 6 мм. Высокая скорость кровотока в крупных сосудах, относительно инертные свойства и прочность PTFE и PET способствуют сохранению проходимости и целостности стенки данных синтетических имплантатов в условиях высокого давления. В свою очередь, сосудистые протезы малого диаметра (менее 5 мм) из PTFE и PET имеют высокую склонность к тромбозу, что обусловлено низкой скоростью кровотока в этих сосудах и несоответствием комплаентности материала имплантата с тканями кровеносного сосуда, что также является и причиной гиперплазии неоинтимы в зоне анастомоза с последующим стенозом сосуда [14, 43, 49, 65, 159].

Актуальным подходом к созданию медицинских изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии является тканевая инженерия (ТИ), основанная на различных тактиках работы с биосовместимыми и биodeградируемыми полимерами. Различные методы ТИ позволяют спроектировать искусственные тканеподобные матриксы/ткани с необходимыми структурными и механическими свойствами

[7, 78, 99, 187]. Сосудистый протез из такого материала обладает способностью к синхронному процессу биodeградации и ремоделирования своей стенки с вектором формирования новообразованной сосудистой ткани при участии клеток организма [123, 150, 192]. Однако данный процесс достаточно длителен и сопровождается такими рисками, как тромбоз, аневризмообразование и микробное обсеменение [7, 82, 98, 103]. Дополнительное атромбогенное и противомикробное модифицирование поверхности полимерных сосудистых

протезов способно нивелировать существующие проблемы, что позволит достичь успешной долгосрочной проходимости и полноценного ремоделирования подобных изделий [7].

1.2 Антитромботические лекарственные средства, используемые для модификации поверхности изделий, предназначенных для нужд сердечно-сосудистой хирургии

В настоящее время существует три основные стратегии, используемые для увеличения тромбрезистентности поверхностей, контактирующих с кровью. К ним относятся создание биоактивной поверхности с использованием антитромботических агентов, пассивация поверхности имплантатов гидрофильными и цвиттер-ионными полимерами, которые препятствуют контакту основного материала изделия с кровью и предотвращают неспецифическую адгезию белка, и эндотелизация внутренней поверхности имплантата [177, 186, 193]. Следует отметить, что создание эндотелиального слоя необходимо в основном при разработке тканеинженерных сосудистых протезов, тогда как две первые стратегии применимы при модификации всех типов медицинских изделий, контактирующих с кровью [14].

Вторым основным требованием помимо тромбрезистентности является отсутствие возникновения бактериального инфицирования в зоне локации имплантированного в кровоток изделия [162]. Бактериальная инфекция трансплантата может привести к ложным аневризмам, кровотечениям, хронически инфицированным ранам и сепсису, несмотря на общепринятую послеоперационную антибиотикопрофилактику [79, 162, 170]. Поэтому создание медицинских изделий, устойчивых к тромбозам и инфекциям после имплантации в кровеносное русло — одна из главных задач современных исследований в тканевой сосудистой инженерии.

В условиях кровотока любая конструкция подвергается адгезии белка к своей поверхности, активирует систему комплемента и тромбоциты, а также вызывает реакцию на инородное тело [177]. Характер взаимодействия имплантата с кровью определяется главным образом его типом, свойствами материала, параметрами кровотока и местом имплантации. Кроме того, особенности материала имплантата имеют большое значение и при выборе способа его модификации с целью улучшения биосовместимости и тромборезистентности [14].

Для увеличения гемосовместимости имплантатов, контактирующих с кровью, широко применяют антитромботические агенты, такие как антикоагулянты и антиагреганты, которые иммобилизируют на поверхности изделия. Антикоагулянты представляют группу препаратов, угнетающих активность свёртывающей системы крови и препятствующих образованию тромбов. Наиболее используемым антитромботическим агентом для модификации сосудистых имплантатов и тканеинженерных сосудистых протезов является гепарин. Он представляет собой антикоагулянт прямого действия, эндогенный сульфатированный гликозаминогликан, содержащийся в тучных клетках [14, 117]. Антикоагулянтное действие гепарина обусловлено его связыванием с антитромбином III, который ингибирует активированные факторы коагуляции, в частности тромбин (фактор II), Ха, XIIa и IXa. Связывание гепарина с антитромбином III вызывает конформационное изменение, которое открывает реактивный сайт антитромбина III, в несколько раз увеличивая его способность ингибировать факторы свертывания крови [14, 132, 167]. Более того, гепарин взаимодействует с большим количеством факторов роста, которые имеют гепарин-связывающий домен. Системы доставки, содержащие данный антикоагулянт, могут предотвращать ферментативную деградацию связанных факторов роста, тем самым усиливая их биологические функции [14, 165]. Значительные перспективы применения для антитромбогенной модификации имеют и другие антикоагулянты. Например, гирудин – пептид, состоящий из 65

аминокислот, который является высокоселективным прямым ингибитором тромбина, не зависит от антитромбина III или кофакторов и не инактивируется тромбоцитарным фактором IV [14, 47, 108]. Также существуют его аналоги: лепирудин, полученный по рекомбинантной технологии из медицинской пиявки и используемый для лечения гепарин-индуцированной тромбоцитопении, представляющий собой полипептид из 65 аминокислот, способный прочно связываться как с каталитическим сайтом, так и с расширенным сайтом распознавания субстрата тромбина; и бивалирудин, синтетический полипептид из 20 аминокислот, который напрямую ингибирует тромбин по механизму, аналогичному механизму лепирудина [14, 35, 46].

Увеличение тромборезистентности сосудистых имплантатов показано и при их модификации антиагрегантами, особенно в сочетании с антикоагулянтами. Наиболее известным лекарственным препаратом, ингибирующим активацию и агрегацию тромбоцитов, является ацетилсалициловая кислота. Механизм ее действия заключается в подавлении биосинтеза тромбоксана A₂, находящегося в тромбоцитах [14, 197, 202]. Большой интерес исследователей в качестве антитромботического агента для обработки сосудистых протезов также вызывает илопрост – синтетический аналог простагличина, который угнетает функцию тромбоцитов, препятствует спазму сосудов, способствуя их расширению, обладает цитопротекторными и иммуномодулирующими свойствами, а также оказывает длительное благоприятное воздействие на микроциркуляцию. Илопрост характеризуется метаболической и химической стабильностью, имеет короткий период полураспада, что повышает его эффективность при клиническом использовании [14, 62, 90, 171]. В клинической практике илопрост активно применяется в лечении легочной артериальной гипертензии [26, 36, 57, 74, 109, 110].

При внутривенном введении в виде прерывистой инфузии илопрост снижал боль в покое и улучшал заживление язв у 40%-60% пациентов с критической ишемией нижних конечностей, включая пациентов с сахарным диабетом.

Аналогичные преимущества наблюдались при облитерирующем тромбоангиите, а у пациентов с тяжелым феноменом Рейно более короткие курсы терапии снижали частоту, интенсивность и продолжительность ишемических эпизодов как минимум на 6 недель. Немногочисленные сравнительные исследования, проведенные на сегодняшний день (например, против нифедипина при феномене Рейно; против низких доз аспирина при облитерирующем тромбоангиите), показали преимущество илопроста. Мощное, быстро обратимое антиагрегантное действие илопроста делает его пригодным для применения в экстракорпоральном кровообращении и для интраоперационного контроля гепарин-индуцированной активации тромбоцитов [90].

В клиническом исследовании, проведенном Deser S.B., отмечается, что дополнительное внутривенное введение илопроста в периоперационном периоде при чрескожной баллонной ангиопластике периферических артериальных окклюзионных заболеваний улучшает проходимость сосудов и снижает частоту повторных вмешательств [63].

Обзорная статья Banerji B. и его команды объединяет и подытоживает многообещающие результаты применения илопроста при различных сосудистых заболеваниях. Авторы отмечают, что илопрост демонстрирует положительные эффекты в отношении вазодилатации, антиагрегантной активности, а также повышает фибринолитическую активность и улучшает кровоснабжение. Авторы отмечают потенциал для расширения клинического применения илопроста и возможное его применение в других областях, а также характеризуют илопрост как идеальный препарат для устранения выраженной вазоконстрикции и тромбоза [101].

Перечисленные антикоагулянты и антиагреганты активно используют при разработке изделий, имплантируемых в кровеносное русло: протезов, стентов, тканеинженерных конструкций. При этом существуют различные подходы к иммобилизации лекарственных средств на поверхности изделий [14].

Так, синтетические протезы кровеносных сосудов на основе PTFE и PET, обладающие высокой прочностью и демонстрирующие высокую эффективность при протезировании крупных сосудов, в случае использования для протезирования сосудов малого диаметра имеют плохую проходимость в результате ранних тромбозов и гиперплазии неоинтимы. Это делает необходимой дополнительную антитромботическую модификацию внутренней поверхности этих синтетических протезов [14].

Для увеличения тромборезистентности сосудистых PTFE протезов Lin P. и соавторы покрывали внутреннюю поверхность имплантатов гепарином с применением технологии CARMEDA Bioactive surface (W.L. Gore & Associates, Inc., Швеция) [14, 81]. Данная технология заключалась в предварительной частичной деполимеризации нефракционированного гепарина дезаминированием азотистой кислоты, что позволило получить молекулы гепарина с пониженной молекулярной массой, которые содержали отдельные реакционноспособные альдегидные группы. Далее на поверхности протеза формировали базальный слой, состоящий из чередующихся слоев анионного полисахарида декстрансульфата и катионного полимера полиэтиленimina. Полученный субстрат содержал функциональные аминогруппы, которые используются для ковалентного связывания гепарина. Функционирование модифицированных протезов оценивали *in vivo* на модели билатерального наложения шунта на бедренную артерию собак. Каждому животному имплантировали PTFE с гепарином с одной стороны и немодифицированный PTFE – с другой стороны, в качестве контроля. Исследование показало, что на поверхности протезов, содержащих антикоагулянт, адгезия тромбоцитов через 24 часа была ниже на 72% по сравнению с контролем. Также процент проходимости имплантатов с гепариновым покрытием составил 89% против 44% в контрольных образцах. Более того, иммобилизированный гепарин способствовал значительному снижению гиперплазии неоинтимы к концу 4-недельного срока

эксперимента [14, 81]. Позднее результаты были подтверждены в аналогичном длительном эксперименте с имплантацией протезов сроком на 2 года [14, 179].

В свою очередь, Al Meslmani В. с коллегами покрывали внутреннюю поверхность РЕТ-протезов гепарином в сочетании с коллагеном [14, 66]. Коллаген использовали для увеличения биосовместимости имплантатов. Два вида протезов РЕТ, тканый и вязанный, модифицировали в несколько этапов. Сначала на поверхность протезов вводили функциональные карбоксильные группы. Далее материал подвергали реакции аминотворения с использованием этилендиамина для получения аминотворения. Гепарин и коллаген ковалентно связывали с поверхностью протезов, содержащим аминотворения, с помощью глутарового альдегида. Данная технология присоединения позволила сохранить активные центры гепарина доступными для связывания с антитромбином III. Модификация антикоагулянтном ингибировала адгезию тромбоцитов, а также формирование фибринового сгустка как на тканом протезе РЕТ, так и на вязаном [14, 66].

Еще одним из способов создания лекарственных покрытий является использование биосовместимых полимеров в качестве носителя [14, 204]. Так, была показана возможность гепаринизации сосудистого протеза из РТФЕ с использованием хитозана. Для того, чтобы присоединить полимер к имплантату, в молекулу хитозана предварительно вводили светочувствительную азидную группу. Сшивка хитозана, содержащего азидную группу, с поверхностью протеза РТФЕ выполнена с помощью ультрафиолетового облучения. Гепарин иммобилизовали на хитозановом покрытии, благодаря способности данных веществ к комплексообразованию. Комплекс хитозан/гепарин препятствовал адгезии тромбоцитов и других клеток на внутренней поверхности протезов, что было показано в эксперименте *in vitro* после контакта имплантатов с кровью. Более того, в модифицированных РТФЕ протезах, имплантированных в подкожную вену собак, не отмечали образования тромбов в просвете, но при этом наблюдали активный процесс ремоделирования стенки кондуитов. Основная цель

такого подхода заключалась в постепенной деградации комплекса хитозан/гепарин и его замене эндотелиальным слоем [14, 204].

Снижение уровня тромбоза PTFE протезов отмечали, также и при их модификации илопростом в сочетании с тканевым активатором плазминогена (Tissue plasminogen activator, tPA), превращающим плазминоген в фибринолитический фермент – плазмин [14, 142]. Илопрост и tPA фиксировали на внутренней поверхности имплантатов с помощью сурфактанта тридодecilметиламмонийхлорида, который обеспечивает нековалентное связывание лекарственных средств, имеющих отрицательный заряд. Недельный срок имплантации модифицированных протезов в брюшную часть аорты крыс показал значительное снижение вероятности раннего тромбоза по сравнению с обычными кондуитами PTFE [14, 142].

Интересные результаты были получены в работе Heise M. и его коллег, которые для создания антитромботического покрытия использовали комбинацию антикоагулянта, полиэтиленгликоль-гирудина (ПЭГ-гирудин/PEG-гирудин), и антиагреганта илопроста [14, 145]. Лекарственные средства вводили в раствор биосовместимого биodeградируемого полимера полимолочной кислоты (polylactide acid, PLA). Полученной смесью дважды обрабатывали сосудистые PTFE протезы для получения плотного покрытия. В результате шестинедельной имплантации модифицированных кондуитов в бедренную артерию свиней была показана их полная проходимость с сохранением объема тока крови на дооперационном уровне и незначительной неоинтимой в дистальном анастомозе. Такой результат был достигнут благодаря медленной деградации PLA и постепенному локальному высвобождению лекарственных средств. Также авторы обратили внимание на то, что гирудин является оптимальной заменой гепарину при антитромботической модификации имплантатов, поскольку сами гепаринизированные протезы имеют ряд недостатков. Это обусловлено тем, что гепарин осуществляет свою функцию, активируя антитромбин III, который, в свою очередь, способен ингибировать тромбин. Но при этом гепарин не имеет

эффективности в отношении тромбина, связанного с фибриновым сгустком. Кроме того, длительное высвобождение гепарина из протеза может провоцировать развитие тромбоцитопении у некоторых пациентов и, как следствие, приводить к кровотечению и тромбоэмболическим осложнениям [14, 145].

Научные разработки покрытий с антитромботическими средствами для модификации синтетических сосудистых протезов привели к созданию ряда коммерческих технологий, которые сегодня существуют на рынке медицинских изделий, таких как BIOLINE Coating (Maquet Cardiovascular, LLC, Германия), CARMEDA Bioactive surface (W.L. Gore & Associates, Inc, Швеция), Flowline BIPORE Heparin (Jotec GmbH, Германия), PM Flow Plus Heparin (Perouse Medical, Франция) [14, 44].

На сегодняшний день матриксы, изготавливаемые с применением методов и подходов тканевой инженерии, являются многообещающей альтернативой существующим медицинским изделиям, используемым в сердечно-сосудистой хирургии. При разработке эффективных сосудистых протезов и заплат для артериальной реконструкции с формированием на их поверхности тромборезистентного лекарственного покрытия следует учитывать сложность используемых комбинаций различных материалов для их изготовления и структуру, имитирующую нативный внеклеточный матрикс [14, 20, 83, 173]. Основными материалами для создания тканеинженерных сосудистых протезов и заплат являются биосовместимые биodeградируемые полимеры, имеющие высокую прочность и оптимальные упруго-деформативные свойства, такие как поликапролактон (polycaprolactone, PCL), PLA, полигликолевая кислота (polyglycolic acid, PGA) и их сополимеры, например сополимер молочной и гликолевой кислот (poly(lactic acid-co-glycolic acid), PLGA), сополимер молочной кислоты и поликапролактона (poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), PLCL), фиброин шелка (Silk Fibroin, SF) [4, 9, 14 15, 16, 193].

Процесс электроспиннинга позволяет изготавливать прототипы медицинских изделий с возможностью включения в состав их нановолокон различных терапевтических агентов, с настраиваемой кинетикой высвобождения [13, 15, 18, 107]. Молекулы, такие как гепарин, могут быть иммобилизованы на поверхности полимерных матриц для снижения риска тромбоза [14, 61].

Разработка сосудистых протезов малого диаметра, изготовленных методом электроспиннинга из PCL, ковалентно связанного с молекулами гепарина, была продемонстрирована в работе Duan H.Y. и соавторов [14, 61]. Прикрепление гепарина к PCL осуществляли с помощью реакционной смеси N-гидроксисукцинимид (N-hydroxy-succinimide, NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) до начала изготовления протеза. Такое связывание лекарственного средства гораздо прочнее и эффективнее, чем простое введение в полимер или адсорбция на поверхности готового изделия. Исследования *in vitro* показали наличие у сосудистых протезов из гепарин-связанного PCL хороших антикоагулянтных свойств, а также более высокую скорость биodeградации и гидрофильность по сравнению с PCL. Положительное влияние этих свойств на проходимость и регенерацию сосудистой стенки было показано при имплантации протезов с гепарином в бедренную артерию собак [14, 189].

Тканеинженерный сосудистый протез более сложной конструкции был предложен Norouzi S.K. и Shamloo A [14, 138]. Внутренний слой имплантата изготавливали ко-электроспиннингом PCL и желатина с получением двух типов волокон. Создание внешнего слоя осуществляли лиофилизацией желатинового гидрогеля, что позволяло получить материал с крупными порами для эффективной инфильтрации клеток в стенку протеза из окружающих тканей. Для того, чтобы придать данной конструкции антитромботические свойства, в растворы PCL и желатина предварительно вводили гепарин, и далее осуществляли эмульсионный электроспиннинг. Благодаря данному подходу, молекулы антикоагулянта были запечатаны внутри волокон, их высвобождение

происходило в процессе деградации полимера и способствовало снижению адгезии тромбоцитов на поверхности имплантата [14, 138].

Успешная иммобилизация гепарина с помощью ионных связей также была показана на сосудистых протезах, изготовленных ко-электроспиннингом PCL и хитозана [14, 73]. Добавление природных биodeградируемых полимеров, таких как хитозан, желатин, коллаген, к синтетическим – PCL, PLA, PGA, PLGA, позволяет повысить биосовместимость имплантатов и при этом сохранить их прочность. Относительно прочные ионные связи обеспечивали стабильный выход гепарина с поверхности полимерных волокон протеза в окружающую среду. Оценка гемосовместимости *in vitro* продемонстрировала снижение адгезии тромбоцитов, удлинение активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени, а также предотвращение тромбообразования *in vivo* после гепариновой модификации протеза [14, 73].

Для увеличения биосовместимости тканеинженерных сосудистых протезов из PLA, также полученных методом электроспиннинга, Aslani S. с коллегами наносили на поверхность имплантата лизат человеческой амниотической мембраны, так как она богата структурными и функциональными белками внеклеточного матрикса, коллагеном, эластином, ламинином и протеогликанами [14, 201]. При этом для обеспечения тромборезистентности имплантата авторы использовали ацетилсалициловую кислоту, которую вводили в раствор PLA при проведении электроспиннинга. Биodeградация PCL обеспечивала медленное высвобождение лекарственного средства из стенки протеза. При этом антитромботическая обработка и покрытие элементами внеклеточного матрикса способствовали высокой гемосовместимости импланта, что было подтверждено *in vitro* исследованиями гемолиза и свертываемости крови [14, 201].

Перспективные результаты демонстрируют и подходы, заключающиеся в совместной иммобилизации на поверхности полимерного материала гепарина и других биологически активных молекул, регулирующих реакцию на инородное тело и ремоделирование имплантата. Например, Gao J. и соавторы использовали

технологии послойной самосборки для создания покрытия из гепарина и полиэтиленimina, модифицированного селеном, на волокнистых PCL протезах [14, 188]. Модифицированный полиэтиленimin был выбран в качестве катализатора высвобождения оксида азота (NO) из эндогенных NO-доноров, S-нитрозотиолов. В свою очередь, NO способен снижать реакцию воспаления, рост неоинтимы и стимулировать образование эндотелия, который является естественной тромборезистентной выстилкой кровеносных сосудов [14, 188].

Для ускорения формирования эндотелиального слоя на внутренней поверхности сосудистых протезов и заплат для артериальной реконструкции часто применяют сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF) в комбинации с гепарином [14, 104]. Комбинация VEGF с гепарином способна обеспечить антитромбогенные свойства поверхности на ранних сроках имплантации до формирования монослоя эндотелиальных клеток. Так, при изготовлении сосудистого протеза гепарин и VEGF вводили внутрь полимерного волокна из смеси поли(L-лактид-ко-капролактон)а (poly(l-lactide-co-caprolactone) [P(LLA-CL)]), коллагена и эластина с помощью коаксильного электроспиннинга [14, 103]. Стенка полученного имплантата состояла из двуслойных волокон, внутренний слой которых содержал биоактивные вещества. Высвобождение VEGF и гепарина при деградации внешнего слоя волокна обеспечивало их дозированную доставку, препятствовало чрезмерному поступлению в кровь и возможным осложнениям в результате передозировки. Данные протезы демонстрировали хорошую проходимость и отсутствие тромбообразования при имплантации в брюшную аорту кроликов [14, 104]. Гепаринизированные трансплантаты продемонстрировали многообещающие результаты в исследованиях на собаках Sheng W. с коллегами включили гепарин в P(LLA-CL)-протезы с помощью коаксиального электроспиннинга. С добавлением этапа презэндотелизации они достигли 89% проходимости при имплантации гепаринизированных протезов в бедренную артерию собак на 24 недели [14, 84].

Другими биоактивными молекулами, которые используют совместно с антитромботическими агентами, являются хемоаттрактанты. При этом гепарин может выступать не только как антикоагулянт, но и как молекула, связывающая хемоаттрактантные молекулы с поверхностью имплантата. Эффективность такого подхода была показана Wang W. с коллегами [14, 134]. Они изготавливали тканеинженерный матрикс из смеси PLA, PLGA и PLCL методом термически-индуцированного фазового разделения. Данный метод позволяет создавать полимерные матриксы с микро- и наноструктурой. Гепарин конъюгировали на поверхности матрикса, затем к гепаринизированному матриксу добавляли раствор стромального фактора 1α (Cell-derived factor-1 alpha, SDF- 1α). Благодаря способности SDF- 1α связываться с гепарином, на поверхности матрикса получали покрытие, которое обладало антитромботическими свойствами и привлекало эндотелиальные клетки [14, 134].

Кроме введения антитромботических средств непосредственно в полимер или их ковалентной конъюгации на поверхности материала в качестве средств доставки также могут быть использованы наночастицы. В недавнем исследовании представлена разработка композитного тканеинженерного сосудистого протеза, имеющего в составе мезопористые наночастицы кремнезема, которые обладают высокой биосовместимостью, большой удельной поверхностью и упорядоченной системой пор [14, 76]. Иммобилизацию гепарина на поверхность наночастиц осуществляли посредством молекулы этиленгликоля. Выполняя функцию линкера, этиленгликоль также усиливал антитромботический эффект гепарина за счет своей способности ингибировать адгезию белков. Наночастицы, нагруженные этиленгликолем и гепарином, вводили во внутренний слой стенки протезов, изготовленный электроспиннингом из PLGA с коллагеном. Внешний слой протеза формировали из полиуретана для обеспечения длительной механической поддержки. Высвобождение наночастиц с биоактивными веществами способствовало увеличению антикоагуляционных свойств материала протеза, снижало адгезию тромбоцитов на его поверхности. Кроме того, при

имплантации в каротидную артерию кроликов модифицированные протезы демонстрировали высокую проходимость, а внутренний слой полностью биодеградировал через 8 недель, препятствуя тромбообразованию и стимулируя регенерацию тканей сосудистой стенки [14, 76].

В целом, широкий спектр технологий изготовления тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра, а также используемых материалов и их комбинаций, позволяет создавать имплантаты с различными антитромботическими модификациями. При этом возможно введение в конструкции как антикоагулянтов и антиагрегантов, так и нетромбогенных материалов, например, эластина и этиленгликоля [14, 193].

На сегодняшний день большая часть медицинских изделий с антитромботической модификацией, существующих на рынке и применяемых в клинической практике, изготовлена с применением технологии CARMEDA BioActive Surface (CBAS). Данная технология позволяет создавать покрытия с не высвобождающимся гепарином, иммобилизованным на поверхности имплантата [14, 44]. Гепаринизированные по данной технологии PTFE протезы сосудов, Gore Propaten (W.L. Gore & Associates, США), демонстрировали проходимость аналогичную аутологичным трансплантатами при краткосрочных наблюдениях после проведения бедренно-подколенного шунтирования [14, 96]. В свою очередь, анализ пятилетней имплантации, проведенный Samson R.H. с соавторами, показал достоверно лучшую проходимость модифицированных гепарином протезов PTFE (85,2%) в сравнении с PTFE без покрытия (53,9%) также при бедренно-подколенном шунтировании [14, 97]. Кроме того, в недавнем многоцентровом ретроспективном исследовании долгосрочной имплантации 1401 синтетических биоактивных гепарин-связанных протезов из PTFE (HB-ePTFE graft, Gore Propaten; W.L. Gore & Associates, США), установленная первичная проходимость имплантатов составила 67%, что выше значений этого показателя для протезов PTFE, который по данным разных источников не превысил 35% [160]. Технология CARMEDA также использовалась для модификации

коронарных стентов гепарином до появления сосудистых имплантатов с покрытиями, обеспечивающими высвобождение антипролиферативных препаратов. Примером гепаринизированных стентов является НЕРАСОАТ (Cordis, Johnson & Johnson Interventional Systems, США), который демонстрировал положительные результаты по снижению адгезии тромбоцитов и уменьшению риска ранних тромбозов в экспериментальных исследованиях [14, 44]. Однако в международном многоцентровом проспективном исследовании на 3098 пациентах различий по количеству тромбозов между гепарин-модифицированными и немодифицированными стентами установлено не было [14, 27].

Таким образом, к основным подходам антитромботической модификации можно отнести конъюнирование лекарственных средств на поверхности имплантата и использование биodeградируемых полимеров для создания покрытия, что обеспечивает пролонгированную локальную доставку препаратов. Совместное использование антитромботических агентов с биологически активными молекулами, участвующими в регуляции регенерации стенки сосуда, является основным вектором разработок эффективных имплантатов для использования в сердечно-сосудистой хирургии [14].

1.3 Подходы по формированию антимикробных покрытий конструкций, имплантируемых в кровеносное русло

Помимо тромбообразования имплантатов серьезной проблемой остается их инфицирование, влекущее за собой тяжелые осложнения и высокие показатели смертности [8, 146]. Несмотря на размещение стерильных сосудистых протезов в обработанном антисептиками операционном поле, около 20% из них инфицируются [8, 161]. Точную этиологию инфицирования сосудистого протеза установить сложно, в большинстве случаев она имеет многофакторный характер. Обсеменение микроорганизмами сосудистого протеза может происходить как экзогенным, так и эндогенным путем (бактериемия) [8, 24].

В ряде случаев патогенные бактерии способны заселять поверхность имплантированных устройств с образованием защитной биопленки [8, 12]. Биопленка представляет собой скопление адгезированных бактерий, окруженных полисахаридной капсулой, которая секретируется микроорганизмами. Полисахаридная капсула вместе с белками, нуклеиновыми кислотами и липидами образует защитное покрытие вокруг кластеров клеток. Образование защитной биопленки обеспечивает механическую стабильность и создание полимерной пространственной сети между отдельными бактериальными клетками. Биопленка препятствует проникновению антибактериальных препаратов внутрь колоний бактерий, при этом устойчивость бактерий к антибиотикам в биопленке может в разы превышать устойчивость одиночных бактерий. Кроме того, биопленка предохраняет колонии бактерий от взаимодействия с антителами хозяина, что тормозит запуск иммунного ответа [8].

В клинической практике для профилактики инфицирования сосудистых протезов выполняют однократное внутривенное введение антибиотика непосредственно перед имплантацией с последующим пероральным приемом препарата и тщательном соблюдении асептических условий [8, 48]. Однако наличие защитной биопленки не позволяет достичь необходимой местной концентрации препарата, и такой способ профилактики становится неэффективным. Самый эффективный способ по предупреждению образования биопленки на поверхности протезного материала – предотвращение адгезии бактериальных клеток на начальном этапе инфицирования протезного материала [8]. Этого можно добиться путем формирования дополнительного антибактериального покрытия на поверхности имплантируемого изделия [8].

«Идеальное» антимикробное покрытие должно соответствовать ряду определенных критериев. Так, используемые препараты должны обладать пролонгированным действием против патогенов, наиболее часто вызывающих инфицирование протезов и места имплантации [8]. В большинстве случаев причиной раннего (<4 месяцев) инфицирования сосудистых протезов является *Staphylococcus aureus*

(*S.aureus*) (32%), тогда как этиология более позднего (>4 месяцев) инфицирования с последующей хронизацией процесса часто связана с *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*). В последнее время выросло количество сосудистых инфекций, вызванных *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), особенно среди пациентов с длительной госпитализацией (23%-49%). Инфекция MRSA инвазивна, тяжело поддается лечению и часто сопровождается сепсисом [8, 56]. Грамотрицательные микроорганизмы *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*), *Enterobacter* и *Proteus mirabilis* (*P.mirabilis*) хоть и относятся к редким возбудителям инфицирования трансплантата, представляют особую проблему из-за их высокой вирулентности и тенденции разрушать стенку сосудов. Ключевым шагом для предотвращения инфицирования сосудистого протеза может быть уничтожение бактерий до того, как они успеют прикрепиться к каркасу трансплантата [8]. Соответственно, необходимо обеспечение постоянной стандартизированной дозы препарата в протезе на этот период. При этом активность противомикробного препарата должна быть достаточной в периоперационном периоде, и не приводящей к резистентности микроорганизмов. Хорошо известно, что при использовании антибиотиков часто формируются штаммы бактерий с антибактериальной высокой устойчивостью, например, MRSA [8, 118].

Метод фиксации препарата к каркасу не должен менять химическую природу субстрата. При этом концентрация, применяемая локально на поверхности протеза, должна оказывать защитное антимикробное действие, не вызывая сенсебилизации и не нарушая процесса заживления окружающих тканей. Помимо вышесказанного, стоит учесть необходимость быстрой и адекватной васкуляризации сосудистых протезов в процессе раннего заживления, на которую не должно оказывать пагубного влияния антимикробное покрытие [8, 125].

Основные способы противомикробной обработки медицинских изделий связаны с применением ионов серебра, противомикробных препаратов. В стадии разработки – покрытия на основе антимикробных пептидов и катионных амфифилов [8].

1.3.1 Противомикробная эффективность ионов серебра

Серебро – бактериостатическое средство широкого спектра действия, которое, в отличие от антибиотиков, не дает появления резистентных штаммов бактерий. Антимикробный механизм действия ионов серебра связан со способностью менять клеточный метаболизм или биологические функции бактерий путем связывания с макромолекулами, такими как мембранные фосфолипиды, лизосомальные ферменты, нуклеиновые кислоты, а также путем активации ионных каналов или вторичных сигнальных путей, приводящих к гибели бактерий [8, 131]. Антимикробное действие серебра проявляется отсрочено, по опубликованным данным спустя 24 часа и позднее после начала воздействия [8, 106]. Отмечают лучшую эффективность ионов серебра против грамотрицательных бактерий, таких как кишечная палочка, по сравнению с грамположительным золотистым стафилококком [8, 75]. Предполагают, что это связано с различием в толщине слоя пептидогликана, который препятствует действию ионов серебра на бактериальную стенку.

На сегодняшний день в клинической практике используется два коммерческих сосудистых протеза на основе материала PET с серебряным покрытием – Intergard Silver (InterVascular, La Ciotat, Франция) и дополнительно модифицированный триклозаном Intergard Synergy (Maquet, Orleans, Франция). Серебро находится в ткани самого протеза и коллагеновом слое, обеспечивая активное высвобождение сразу после имплантации и далее замедленное высвобождение в течение 30 дней. Однако результаты клинических исследований ставят под сомнение антибактериальную эффективность покрытия серебром [8, 158]. Ретроспективное сравнение результатов имплантации полиэфирного протеза Intergard Silver со стандартными протезами без покрытия показало отсутствие значимого влияния на риск инфицирования трансплантата. В то же время, отмечены некоторые положительные результаты имплантации протезов с серебряным покрытием в аорто-подвздошно-бедренное положение [8, 158].

Помимо сомнительного антибактериального эффекта серебряного покрытия имеются противоречивые данные относительно его влияния на воспалительную реакцию окружающих тканей. В работе Jeanmonod P. и соавторов описан положительный эффект ацетата серебра на биосовместимость и васкуляризацию материала PET при подкожной имплантации мышам, а также снижение местной воспалительной реакции по сравнению с необработанными аналогами [8, 72]. Ограничением данных работ является, с одной стороны, несосудистая локализация имплантации материалов, предназначенных для сосудистой имплантации, с другой стороны, использование мелких лабораторных животных, местная и общая реакция которых значительно отличается от реакций человека. Этим можно объяснить альтернативные результаты, полученные в клиническом исследовании. Butany J. и коллеги проанализировали эксплантированные протезы клапанов сердца Silzone (St Jude Medical, St Paul, Minnesota, США), содержащих нитрат серебра. Эксплантация проводилась во время операции по поводу возникших осложнений и несостоятельности протеза, а также в случае летального исхода. На многих эксплантированных образцах в зоне пришивной манжеты определяли большие области паннуса, грануляционной ткани и зон скопления бактерий. Стимулирование местной воспалительной реакции и возможное токсическое действие серебряного покрытия на миокард подтверждено гистологической картиной стойкого лейкоцитарного воспаления, разрушением и гибелью эндотелиальных клеток [8, 143].

Современные литературные данные по антимикробной активности серебра крайне противоречивы и гласят как об эффективности серебра в плане профилактики инфекции имплантантов, так и об отсутствии противомикробного эффекта [8, 75, 80, 106].

1.3.2 Противомикробная активность антибактериальных препаратов в составе медицинских изделий, имплантируемых в кровеносное русло

Для придания антимикробной активности медицинским изделиям, контактирующим с кровью, также используется способ иммобилизации антибиотиков к поверхности медицинских имплантатов. Для создания антимикробного покрытия сосудистых протезов и заплат можно применять огромное количество различных антибиотиков [8]. Однако компоненты противомикробного покрытия должны быть легко доступными, дешевыми, простыми в обращении, способными выдерживать процесс стерилизации и иметь хорошо изученные химические и физические характеристики. При соблюдении этих критериев лишь немногие антибиотики остаются потенциальными кандидатами для создания антимикробной защиты изделий, контактирующих с кровью. Наиболее часто используемым для этих целей противомикробным препаратом в сосудистых протезах является рифампицин [8, 89, 163].

Первые работы по иммобилизации рифампицина к поверхности вязаного каркаса PET выполнены в 1983 году [8, 151]. Полученный сосудистый протез имплантировали в инфраренальный отдел аорты собак. Эксплантированные протезы сохраняли антибактериальную активность против *S.aureus* более 24 часов после имплантации [8, 151].

Кроме плазмы крови широкое распространение получили варианты иммобилизации антибиотиков на поверхности протезов с помощью желатина, коллагена и фибрина. Это связано с хорошим пропитыванием, отсутствием токсичности, предсказуемой скоростью деградации этих белков-герметиков, а также простой процедурой стерилизации. Такой вид иммобилизации способствует удержанию и пролонгированной элиминации рифампицина в протезах за счет формирования ионной связи между отрицательно заряженными карбоксильными группами белков (желатин, коллаген, фибрин) и положительно заряженными радикалами рифампицина. Следует отметить, что покрытие рифампицином не

оказывало негативного влияния на раннюю васкуляризацию протезов, пролиферацию клеток и воспалительный ответ [8, 147].

Проведен ряд успешных экспериментов на собаках с заменой аорты на коммерческие протезы PET, покрытые желатином с рифампицином. Протезы контаминировали культурами *MRSA* или *S.epidermidis* [8, 33, 156]. Обработанные образцы отличались устойчивостью к инфекции по сравнению с образцами без модификации. Схожее исследование по протезированию сонной артерии было выполнено на овцах с высокой выживаемостью животных с протезами PET, обработанными рифампицином [8, 37].

Аналогичные результаты получены при использовании других материалов в основе каркаса. В экспериментальном исследовании были протестированы рифампицин-желатиновые протезы из полиэстера Gelseal Graft (Vascutek Ltd, Шотландия) в отношении нескольких групп вирулентных организмов (*S.epidermidis*, *MRSA* и *E.coli*) [8, 116]. Рифампицин-желатиновые каркасы подавляли рост *S.epidermidis*, однако против *E.coli* и *MRSA* оказались недостаточно эффективны, при этом зачастую наблюдались тромбозы. В данном исследовании невосприимчивость *E.coli* и *MRSA* к рифампицину с одной стороны связана с особенностями антибактериального спектра препарата, с другой относительно низкой концентрацией (1мг/мл). В большинстве случаев для формирования антибактериального покрытия протезов используют концентрации рифампицина в диапазоне 13-60 мг/мл [8, 32, 89, 147, 155]. Показано, что динамика высвобождения рифампицина (30 мг/мл) из протезов на основе полиэстера обеспечивает хорошую элиминацию и высокую антимикробную активность вблизи протеза в течение 5-7 дней после имплантации [8, 89]. Однако этого может быть недостаточно для подавления бактерий, сформировавших биопленку, вирулентных бактерий *MRSA*, обитающих в близлежащих тканях, которые в конечном итоге заселяют протез.

Формирование устойчивости *MRSA* к рифампицину представляет собой серьезную проблему и была отмечена уже в ранних исследованиях. Еще в 1995

году группа ученых продемонстрировала устойчивость штамма *MRSA* к рифампицину (1,2 мг/мл) через 3 недели имплантации овцам сосудистого протеза PET. В процессе эксперимента наблюдались абсцессы, разрывы анастомоза и тромбоз, при этом все протезы были инфицированы одним и тем же штаммом *MRSA* [8, 166]. В эксперименте *in vitro* потеря противомикробной активности и формирование устойчивых к рифампицину штаммов *S.epidermidis* были зарегистрированы уже через 7 дней инкубации с образцом [8, 106].

Подводя небольшой итог, стоит отметить, что пропитывание рифампицином является наиболее популярным способом противомикробной обработки сосудистых протезов за счет лучшего связывания с поверхностью имплантата по сравнению с другими антибиотиками и отсутствия токсичности. Однако ограниченный спектр антимикробной активности (в основном грамположительные организмы) и способность формировать устойчивые штаммы микроорганизмов стимулируют к поиску других вариантов противомикробной защиты медицинских изделий, используемых в сердечно-сосудистой хирургии [8].

Одно из направлений связано с изучением эффективности иммобилизации других видов антибиотиков на поверхности полимерных материалов. Проведена попытка иммобилизации ванкомицина на поверхности коммерческих материалов PET и ePTFE. Сравнение результатов подкожной имплантации образцов, обработанных ванкомицином и рифампицином при контаминации *MRSA*, оказалось не в пользу ванкомицина [8, 191].

Антимикробное покрытие небацетином показало свое преимущество перед рифампицином. Bisdas T. с соавторами использовал коммерческие велюровые протезы двойного переплетения Unigraft (BBraun, Melsungen, Германия) на основе полиэфирных волокон. На протезы с помощью абсорбируемого покрытия желатином иммобилизовали рифампицин, даптамицин или небацетин. Сравнивали эффективность обработки против штаммов *S.epidermidis*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* и *E.coli*. Небацетин – комбинированный антибактериальный

препарат, состоящий из неомицина сульфата и бацитрацина, проявил свою эффективность как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных патогенов [8, 157].

Отмечен положительный эффект использования гентамицина, включенного в состав фибринового покрытия. Обработка проведена на сосудистых протезах РЕТ и протестирована на крупных лабораторных животных. Авторы отмечали высокий уровень выхода лекарства в течение недели [8, 153]. Однако эффективность гентамицина ограничена в основном аэробными грамотрицательными микроорганизмами [8].

Даптомицин – относительно новый антибиотик из группы циклических липопептидов, проявляет бактерицидную активность в отношении чувствительных грамположительных микроорганизмов. Описана высокая антибактериальная активность обработки даптомицином против *S.aureus* по сравнению с немодифицированными аналогами. Эксперимент был выполнен на кроликах, которым в брюшную аорту имплантировали РЕТ протезы, обработанные и необработанные даптомицином. Побочных эффектов от предварительной обработки протезов даптомицином в виде токсических или воспалительных реакций не было обнаружено [8, 200].

Учитывая возможность изолированной и сочетанной контаминации микроорганизмами поверхности имплантата и окружающих тканей, улучшить результаты имплантации и расширить спектр антимикробного действия может сочетание местной антибактериальной обработки медицинского изделия и системного введения антибиотика [8, 184, 191]. Lehnhardt F.J. и коллеги имплантировали протезы РЕТ в инфернальный отдел аорты собак и показали положительный эффект использования местной обработки протеза рифампицином и системной профилактики цефамандолом при инокуляции *E.coli* [8, 184]. Аналогичные выводы представлены в эксперименте с местным использованием рифампицина и системным введением ванкомицина [8, 191].

Триклозан представляет собой синтетическое органическое соединение широкого спектра действия, обладающего не только антибактериальной, но и противогрибковой активностью [8]. Особенности иммобилизации и кинетика высвобождения триклозана представлены в работе Hernández-Richter T. [8, 40]. Отмечена способность триклозана связываться с синтетическими материалами без использования промежуточных сшивающих или связывающих веществ, однако эффективность зависит от вида материала. Максимально эффективное связывание наблюдалось с трансплантатами Intergard, в меньшей степени с трансплантатами Fluoropassiv (Vascutek Ltd, Шотландия), в которых полиэфирное волокно покрыто молекулами фторполимера, и практически отсутствовало с материалом Gore-Tex [8]. Элиминацию триклозана из материала Intergard в эксперименте *in vitro* регистрировали в течение 4 недель, при этом кинетика не отличалась в статических и динамических условиях перфузии. Что касается протезов Fluoropassiv и Gore-Tex, то низкий коэффициент связывания препарата приводил к быстрой элиминации в течение первого часа, что ограничивает использование триклозана в данных материалах. Триклозан в протезах Intergard активно подавляет рост *S.aureus* и *Enterococcus faecium* (*E.faecium*), слабо воздействует на *Candida albicans* (*C.albicans*) (минимальная ингибирующая концентрация 10-2 г/л) и не действует на *P.aeruginosa* [40]. Однако при сравнении с рифампицином, обработка триклозаном показала меньшую эффективность в отношении *S.aureus* [8, 163]. К сожалению, в последние годы триклозан входит в состав многих моющих и чистящих средств, в том числе средств гигиены. Его повсеместное использование привело к формированию триклозан-резистентных штаммов бактерий, а также снижению восприимчивости к клинически важным противомикробным препаратам за счет механизмов перекрестной или ко-резистентности [8].

Большинство исследований по всему миру направлено на разработку антимикробных покрытий для синтетических сосудистых протезов. Созданию полимерных заплат для артериальной реконструкции с антимикробными

свойствами посвящено крайне ограниченное количество экспериментальных исследований.

В одном из таких исследований группа ученых под руководством Draczyński Z. использовала в качестве основы для своих сосудистых заплат для лечения аневризм брюшного отдела аорты антибактериальную ткань Trevira® (Германия), содержащую в составе ионы серебра. Материал обладал гофрированной поверхностью, что позволило значительно снизить водопроницаемость материала и регулировать размеры заплат под индивидуальные случаи. Авторы данного исследования в тестах *in vitro* доказали антимикробную активность материала, подавляющего рост колоний *S.aureus* и *K.pneumoniae*. Также доказано высвобождение ионов серебра в течение 48 часов [28].

В другом исследовании Salmoukas C. и соавторы тестировали PET-заплаты на новозеландских кроликах. Заплаты предварительно обрабатывались даптомицином и имплантировались в брюшную аорту в предварительно зараженном *S.aureus* операционном поле. По результатам проведенного исследования обработка антибиотиком изучаемых заплат привела к значительному снижению бактериальной инфекции (количество колониеобразующих единиц на обработанных заплатах было значительно меньше, чем на необработанных: $(3,21 \times 10^2 \pm 1,02 \times 10^3 \text{ мл}^{-1})$ против $5,18 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^6 \text{ мл}^{-1}$; $p < 0,001$) и предотвращению образования абсцессов [199]. Авторы рекомендовали данные заплаты для лечения аневризм аорты [200]. Таким образом, антибактериальная обработка полимерных материалов хорошо показывает себя на любой форме изделий.

1.3.3 Комбинированная антибактериальная обработка имплантатов для нужд сердечно-сосудистой хирургии

Следующее направление повышения эффективности антимикробной защиты конструкций, имплантируемых в кровеносное русло, связано с использованием одновременно комбинации различных групп антибактериальных препаратов.

Положительный эффект сочетанного покрытия сосудистых протезов рифампицином и ионами серебра вызывает сомнения, поскольку в ряде работ описано усиление антибактериального эффекта серебра, но не рифампицина [8, 75, 169].

В экспериментальной работе Schneider F. и коллег выполнена имплантация собакам модифицированных и немодифицированных протезов из полиэфира с последующей констатацией усиления антибактериального эффекта в отношении *MRSA* и *E.coli* при комбинированной обработке протезов рифампицином/серебром по сравнению с серебром, однако не достигнуто статистически значимых различий с группой, имевшей покрытие одним рифампицином [8, 169]. Схожие результаты получены группой Honig S. в краткосрочном (1 час) эксперименте *in vitro* по отношению к стандартным штаммам *S.epidermidis*, *MRSA*, *P.aeruginosa* и *E.coli* [8, 75].

Антимикробная эффективность комбинации триклозана и серебра представлена в ряде работ автора Berard X. выполненных *in vitro* [8, 53, 106]. Так, в первой работе было проведено краткосрочное сравнение (24 часа) между четырьмя различными трансплантатами: стандартным трансплантатом (Intergard, Getinge Group (Maquet), Швеция), трансплантатом IG, пропитанным рифампицином (IGrif, Getinge Group (Maquet), Швеция), трансплантатом пропитанным серебром (Intergard Silver, IGS, Getinge Group (Maquet), Швеция) и трансплантатом пропитанным серебром и триклозаном (Intergard Synergy, IGSy, Getinge Group (Maquet), Швеция). Исследуемые трансплантаты были отдельно контаминированы инокулятом каждого из следующих микроорганизмов:

S.epidermidis, *MRSA*, *E.coli* и *C.albicans*. В условиях краткосрочного эксперимента *in vitro* лучшую антимикробную активность продемонстрировал сосудистый трансплантат Intergard Synergy, сочетающий в себе комбинацию серебра и триклозана [8, 53]. Чуть позже проведенный повтор исследований со сроком наблюдения в течении 7 суток также подтвердил высокую эффективность протезов Intergard Synergy с комбинированным антимикробным составом [8, 106]. Покрытие триклозан/серебро позволило избежать появления резистентных штаммов [8, 53, 106]. Однако, поскольку данные работы выполнены *in vitro*, окончательный вывод можно будет сделать после проведения долгосрочных экспериментов *in vivo*. Примечательно, что для проявления своих антимикробных свойств, серебру требуется более длительное время контакта с патогенами, при этом серебро выделяется медленнее триклозана и, соответственно, антимикробный эффект обработки серебром отсроченный и длительный [8].

Другим вариантом улучшения противомикробной защиты и расширения спектра воздействия на микроорганизмы является обработка несколькими антибиотиками. Положительный эффект отмечен при обработке коммерческих протезов из полиэстера Gelsoft Plus (Vascutek Ltd, Шотландия) комбинацией рифампицин/тобрамицин [8, 155]. Протезы имплантировали в аорту собакам и контаминировали *S.aureus*. Комбинированное покрытие подавляло развитие инфекции и профилактировало осложнения, вызванные *S.aureus* (перипротезные гематомы и аневризмы) [8, 155]. Хорошие результаты получены при сочетании трех противомикробных препаратов (рифампицин, миноциклин и хлоргексидин). Исследование выполнено на протезах РЕТ, которые вшивали в инфраренальный отдел брюшной аорты свиней и инокулировали *S.aureus*. Тяжелые инфекционные осложнения развивались во всех случаях имплантации протезов без лекарственного покрытия, тогда как протезы с тройным антимикробным компонентом продемонстрировали синергетический эффект, уменьшили или предотвратили прямое периоперационное бактериальное заражение [8, 22, 154]. Эффективность данной комбинации антимикробных препаратов подтвердила

другая группа исследователей, которая помимо *S.aureus* дополнила микробный спектр воздействия *P.aeruginosa*. Модифицированные протезы показали хорошую полимикробную устойчивость к *S.aureus* и подавление роста *P.aeruginosa* в течение трех недель, а также лучшую проходимость и отсутствие тромбоза по сравнению с немодифицированными аналогами [8, 32].

Несмотря на то, что импрегнированные антибиотиками сосудистые протезы появились много лет назад, они широко используются по сей день, а результаты их применения описываются во многих литературных источниках как удовлетворительные, основными проблемами при их применении остаются быстрое возникновение резистентности и относительно короткий период высвобождения антибиотиков из трансплантата [51, 106, 157].

1.3.4 Особенности противомикробной обработки высокопористых изделий из биodeградируемых полимеров

Матрицы из биodeградируемых полимеров представляют альтернативу традиционным синтетическим матрицам. Возможность формировать наноразмерные волокна с помощью электроспиннинга при изготовлении биodeградируемых конструкций позволяет не только имитировать структуру естественного внеклеточного матрикса и облегчать клеточные взаимодействия, но и формировать систему доставки с хорошей сохранностью и стабильностью лекарственного компонента. Различные биоактивные молекулы, включая противомикробные агенты, можно локализовать внутри каркаса или иммобилизовать на его поверхности для контролируемого высвобождения [8, 77].

Группа Yu D.G. покрыла нановолокна полиакрилонитрила (PAN) наночастицами серебра, используя модифицированный процесс коаксиального электроспиннинга, и добилась хорошей антимикробной активности против *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) и *E.coli*. Исследователи отметили, что использование коаксиального электроспиннинга помогло улучшить антибактериальный эффект

серебра за счет изменения его распределения на поверхности нановолокон [8, 148].

Kim K. с соавторами продемонстрировали успешное включение и пролонгированное высвобождение гидрофильного антибиотика мефоксина (цефокситин натрия, MSD) из нановолокнистых каркасов на основе PLGA без изменения свойств структуры и биоактивности. Водный раствор лекарственного препарата вводили в раствор полимера, затем методом электроспиннинга изготавливали нановолокнистый протез. Результаты спектрометрии показали сохранность химической структуры мефоксина в полимере, полученного методом электроспиннинга. Встраивание антибиотика в волокна полимера замедляло процесс высвобождения, что является несомненным преимуществом. Модифицированный матрикс подавлял рост *S.aureus* в течение 48 часов как в статической, так и в динамической среде [8, 107].

Доказательства сохранности и пролонгированного высвобождения ванкомицина из PLGA при введении антибиотика в состав полимера представлены Liu K.S. и коллегами [8, 178]. При подкожной имплантации в течение 35 дней в подкожной клетчатке кроликов регистрировали высокие концентрации ванкомицина, при низком содержании в циркулирующей крови, что свидетельствует о локальной и устойчивой доставке противомикробных агентов [8, 178].

Несмотря на то, что за прошедшие годы в клиническую практику были внедрены различные стратегии покрытия трансплантатов для предотвращения их инфекционного заражения (рифампицин, серебро, серебро/триклозан и другие), ни одна из них не смогла продемонстрировать каких-либо значительных преимуществ в профилактике инфекций [8].

В клинической практике применяются два коммерческих медицинских изделия с антимикробной обработкой: сосудистый протез на основе материала PET с серебряным покрытием – Intergard Silver (Getinge Group (Maquet), Швеция) и дополнительно модифицированный триклозаном Intergard Synergy (Getinge

Group (Maquet), Швеция). Серебро находится в стенке протеза и коллагеновом слое, обеспечивая активное высвобождение сразу после имплантации и далее замедленное высвобождение в течение 30 дней. Однако результаты клинических исследований ставят под сомнение антибактериальную эффективность покрытия серебром, по крайней мере, при определенных видах локализации протезов [8, 158]. Ретроспективное сравнение результатов имплантации полиэфирного протеза Intergard Silver со стандартными протезами без покрытия показало отсутствие значимого влияния на риск инфицирования трансплантата. В то же время, отмечены некоторые положительные результаты имплантации протезов с серебряным покрытием в аорто-подвздошно-бедренное положение [8, 158].

1.4 Перспектива использования антимикробных пептидов и катионных амфифилов в качестве низкомолекулярных модификаторов полимерных материалов

Несмотря на успехи применения фармацевтических препаратов для предотвращения инфицирования протезного материала, использование антибиотиков приводит к быстрому развитию резистентности микроорганизмов. Для преодоления проблемы лекарственной устойчивости необходимо применение новых противомикробных агентов, резистентность к которым не будет формироваться, либо будет развиваться медленнее. Хорошую перспективу представляет использование антимикробных пептидов и катионных амфифилов для создания эффективного противомикробного покрытия [8, 12]. Известно, что мембраны бактериальных клеток (как грамположительные, так и грамотрицательные) образованы фосфолипидами и тейхоевыми кислотами с отрицательным суммарным поверхностным зарядом. Следовательно, полимеры, несущие положительно заряженные функциональные группы, способны лучше взаимодействовать со стенкой бактериальной клетки по сравнению с полимерами с нейтрально или отрицательно заряженной поверхностью [8, 122]. Присутствие на поверхности четвертичных солей аммония (ЧСА), например, поливинилбензиламмонийхлорида, продемонстрировало высокую антибактериальную активность [8, 100]. Третичные аминогруппы, подвергающиеся протонированию в физиологических условиях, будучи введенными в структуру полимера, также придают последнему антибактериальные свойства. Выполнен синтез широкого спектра полимеров, содержащих третичные аминогруппы, на основе полистирола и диметиламиноэтилметакрилата, материалы обладали высокой антибактериальной активностью [8, 41, 128].

Еще одним перспективным направлением для борьбы с бактериальными биопленками и штаммами, устойчивыми к антибиотикам являются антимикробные пептиды (АМП) [8, 12, 93]. О взрывном характере роста интереса к АМП может

свидетельствовать тот факт, что количество уникальных последовательностей АМП, собранных в базе данных с открытым доступом (DRAMP, <http://dramp.cru-bioinform.org/>), содержащей общие, патентные и клинические антимикробные пептиды, увеличилось с 4,5 тысяч в 2016 году до более чем 14 тысяч к середине 2019 года [8, 71]. К началу сентября 2020 года DRAMP содержит информацию о 5877 статьях, 14739 патентах и 76 клинических испытаниях АМП [8, 70].

Считается, что в основе механизма действия большинства антимикробных пептидов первым шагом является нарушение целостности бактериальной мембраны [8, 50]. При этом АМП, по аналогии с антибиотиками, также могут блокировать некоторые ферменты, нарушать функции РНК и ДНК, повреждать мембраны субклеточных компартментов [8, 114, 137]. Разрушение бактериальной стенки делает менее вероятным развитие устойчивости патогенов к АМП, чем к традиционным антибиотикам. Тем не менее, описан ряд механизмов, делающих патогены устойчивыми к катионным АМП и ЧСА, например, за счет снижения общего отрицательного заряда поверхности бактерий [8, 29]. Однако, несмотря на перспективность использования АМП, исследований, посвященных их применению с целью модификации полимерных поверхностей, очень мало [8, 12, 88].

Катионные амфифилы (КА) – молекулы с одной или несколькими положительно заряженными группами и липофильными фрагментами. Данные соединения являются синтетическими аналогами катионных природных АМП, для которых бактериальная мембрана считается основной мишенью. АМП способны вызывать нарушение трансмембранного потенциала бактериальной мембраны, утечку цитоплазматического содержимого и, в конечном итоге, гибель бактериальной клетки [8, 12, 129]. В тоже время, данные соединения являются четвертичными аммониевыми солями и полимерные материалы с привитыми ЧСА можно рассматривать как частный случай КА, иммобилизованных на поверхность [8, 203].

Гидрофильная группа большинства катионных амфифилов – аминогруппа с рН-зависимым зарядом, либо четвертичная аммониевая группа с рН-независимым

положительным зарядом [12]. В доступной литературе существуют подтверждения зависимости антибактериальных свойств КА от конфигурации катионных групп их количества и пространственной ориентации [12, 39, 92, 140, 182].

Известно, что бактерии не способны развивать резистентность к соединениям, основным механизмом действия которых является разрушение клеточной стенки [12]. Однако бактерии способны вырабатывать резистентность к катионным АМП и ЧСА с помощью включения положительно заряженных молекул в клеточную мембрану [12, 121, 135]. При этом использование нескольких соединений с антибактериальными свойствами значительно снижает риск формирования антибиотикорезистентности у бактерий [12, 34].

В литературе описаны примеры синтеза амфифилов в структуру которых включены антибиотики, блокирующие синтез белка [12, 180, 190]. Также существуют работы, в которых доказана высокая антибактериальная активность ряда амфифилов на основе аминогликозидных, в которых катионная часть амфифила – составная часть аминогликозида [12, 38, 45, 136]. Помимо этого, существуют работы по созданию синтетических гибридных молекул, содержащих группы, способные блокировать синтез ДНК и провоцировать разрушение РНК бактерий [12, 23, 42]. Все вышесказанное позволяет создавать КА с улучшенными антибактериальными свойствами [12, 92].

Таким образом, разнообразие синтетических аналогов АМП, и их высокая эффективность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (в том числе к штаммам, устойчивым к антибиотикам), хорошая селективность в отношении клеток млекопитающих, простые методы синтеза и возможность получения амфифилов с низкой степенью возникновения резистентности делают эти соединения наиболее перспективными кандидатами на роль низкомолекулярных модификаторов полимерных материалов с антибактериальными свойствами [11, 12].

Резюме

Исходя из анализа литературы, можно сделать вывод об отсутствии идеального материала для изготовления сосудистых протезов и заплат, способных к полноценному ремоделированию за счет биodeградируемой составляющей и высокой пористости конструкции, но при этом устойчивой к тромбообразованию и инфицированию. Изготовление высокопористых матриц методом электроспиннинга показывает себя самым перспективным методом, позволяя сочетать различные полимеры; оптимизировать параметры каркаса с учетом их дальнейшего применения (таких как размер пор и диаметр волокна); производить модифицирование поверхности каркасов различными терапевтическими агентами и биомолекулами. Но, несмотря на многообещающие результаты доклинических испытаний тканеинженерных сосудистых протезов и заплат, большинство из них по-прежнему демонстрируют высокие показатели стеноза и инфицирования, что не позволяет перейти к клиническим испытаниям. Стоит также отметить, что предпринятые попытки создания сосудистых протезов производились с отдельным применением антимикробного и антитромботического покрытия. Разработки, направленные на создание конструкций с покрытием, сочетающим в себе атромбогенный и противомикробный эффекты, отстывают, что обуславливает актуальность проведенных нами научных исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Изготовление биodeградируемых матриц с лекарственным покрытием

2.1.1 Изготовление полимерных матриц методом электроспиннинга

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).

Для оценки антибактериальных свойств матриц на модели крысы, определения краевых углов смачивания, оценки гемосовместимости, оценки присутствия и скорости высвобождения лекарственных препаратов, а также для оценки матричных свойств были изготовлены полимерные матрицы из 12% раствора ПКЛ в трихлорметане. Полимерный раствор тщательно перемешивали на магнитной мешалке MS7-H550-Pro (DLAB Scientific Co., Ltd, Китай) со скоростью от 1000 до 1200 об/мин до полного растворения полимера и получения однородной консистенции. Из полученного полимерного раствора методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC Inc., Япония) изготавливали полимерные матрицы 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 8 мм. Изготовленные матрицы разрезали в продольном направлении для дальнейшего модифицирования и проведения экспериментов с использованием клеточных культур и на модели крысы.

2.1.2 Изготовление полимерных трубчатых каркасов методом электроспиннинга

Полимерные трубчатые каркасы диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из 12% ПКЛ в трихлорметане. Полимерный раствор перемешивали на магнитной мешалке MS7-H550-Pro (DLAB Scientific Co., Ltd, Китай) со скоростью от 1000 до 1200 об/мин до получения однородной консистенции. Затем из полученного полимерного раствора методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC Inc., Япония) изготавливали трубчатые каркасы 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.

2.1.3 Формирование внешней армирующей спирали трубчатых каркасов

Необходимость формирования антианевризматической защиты биodeградируемых сосудистых протезов продиктована предыдущим опытом нашей команды – получением аневризм стенки биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных на длительный срок в сонные артерии овец [194]. Действие динамической нагрузки, в частности, на биodeградируемые сосудистые протезы может значительно ослабить конструкцию и вызвать не только снижение упруго-деформативных характеристик, но и формирование ранней критической деформации, которая способна привести как к окклюзии просвета сосудистого протеза, так и к его аневризматической деформации на фоне биорезорбции [120]. Поэтому предварительное усиление конструкции является рекомендуемой процедурой для биodeградируемых изделий [1].

После изготовления биodeградируемых трубчатых каркасов диаметром 4 мм, предназначенных для имплантации в сонную артерию овец, методом послойного наплавления (Fused deposition modeling, FDM) сформирован внешний

армирующий каркас в виде перекрещивающейся спирали. В качестве основного полимерного материала для создания армирующей спирали выступил поликапролактон массой 80000 kDa (Sigma Aldrich, США).

Формирование армирующей спирали 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 (Рисунок 1).

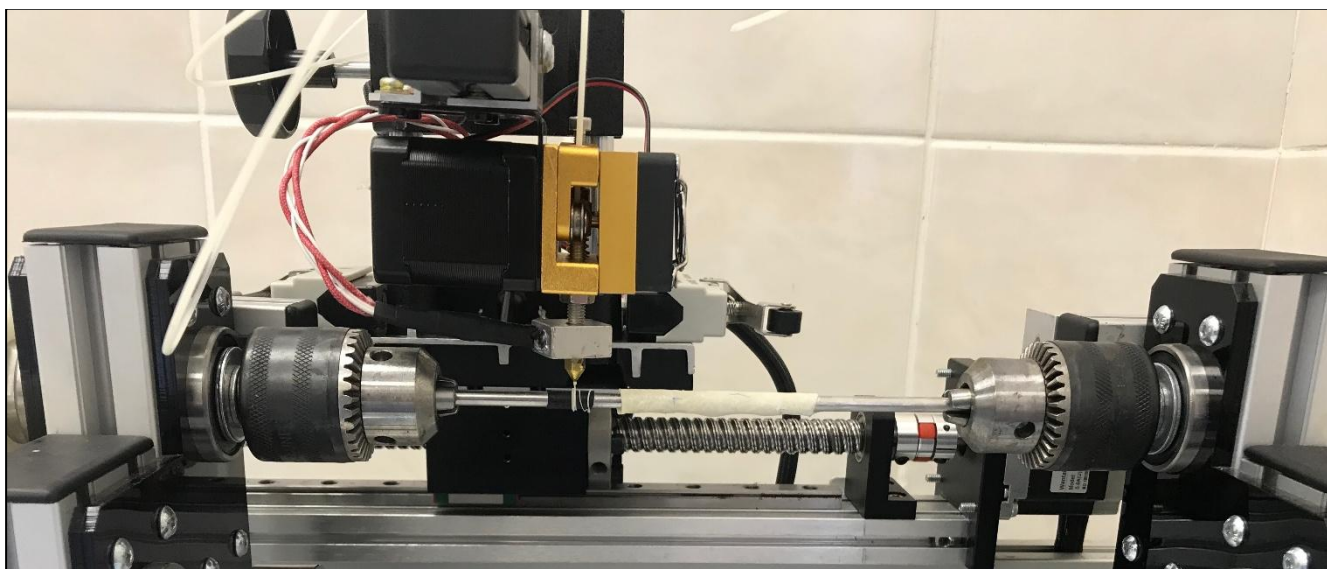


Рисунок 1 – Оригинальная установка, содержащая экструдер и вращающийся вал

2.2 Формирование лекарственного покрытия

2.2.1 Присоединение лекарственных препаратов к поверхности биodeградируемых матриц методом комплексообразования

Модифицирование лекарственными препаратами поверхности биodeградируемых матриц, в дальнейшем предназначенных в качестве опытной группы, проводили посредством комплексообразования с водорастворимым полимером – носителем поливинилпирролидоном (ПВП; К 90, PanReac AppliChem,

Германия) противомикробного препарата – 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид (А) (Нано Тех-С, Россия) без дополнительных реакционноспособных групп, обладающего активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (Рисунок 2).

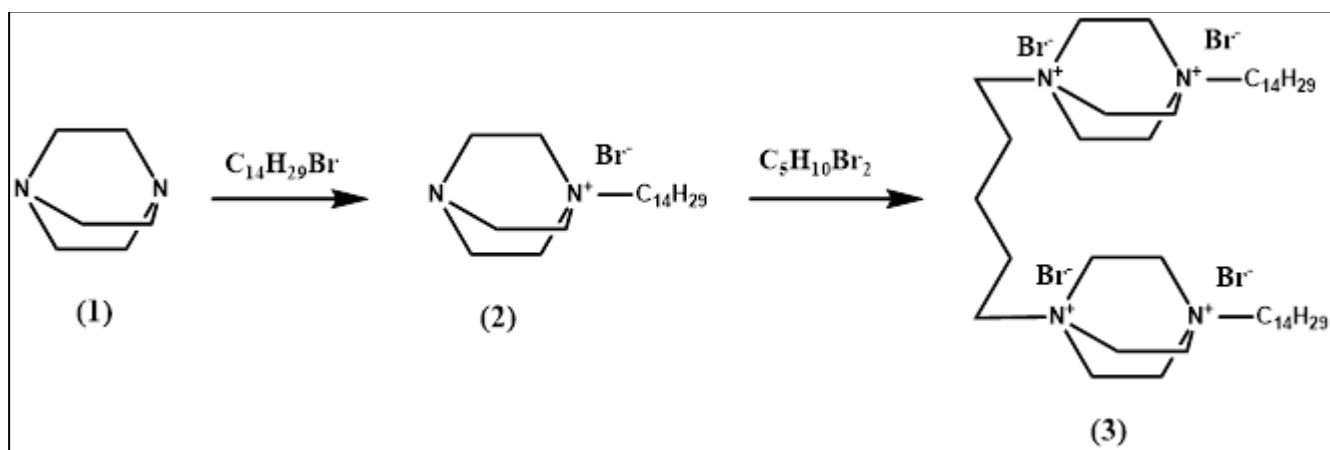


Рисунок 2 – Схема синтеза катионного амфифила 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид

Также через ПВП к поверхности матрицсов одновременно с катионным амфифилом присоединялся илопрост (Иломедин; Bayer, Германия) – атромбогенный лекарственный препарат, являющийся синтетическим аналогом простациклина и обладающий антиагрегантными свойствами.

Методика полимеризации поверхности биodeградируемых матрицсов с ПВП и последующего присоединения лекарственных препаратов заключалась в следующем: готовые полимерные матриксы 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 матриксы изымали и высушивали на воздухе в течение 12 часов, помещали в стеклянные пробирки, наполняли пробирки инертным газом аргоном и запаковывали парафильмом. Полимеризацию ПВП к поверхности матрицсов проводили посредством ионизирующего излучения с помощью ускорителя ИЛУ-

10 (ИЯФ СО РАН, Новосибирск) с общей поглощенной дозой 10 и 15 кГр в следующих режимах:

- Режим радиационной обработки 15 кГр: энергия электронов – 5 МэВ, импульсный ток – 350 мА, скорость конвейера 3,8 см/с, частота – 25 Гц, одностороннее облучение.

- Режим радиационной обработки 10 кГр: энергия электронов – 5 МэВ, импульсный ток – 350 мА, скорость конвейера 3,8 см/с, частота – 17 Гц, одностороннее облучение. Данные режимы, помимо качественной полимеризации, приводили к надежной стерилизации изделий.

После завершения облучения матриксы отмывали в стерильных условиях от остатков неполимеризовавшегося ПВП стерильной деионизированной водой 3-кратно по 15 минут.

Далее методом комплексообразования проводили присоединение илопроста и амфифила 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид к свободным реакционным группам ПВП, полимеризованного к поверхности биodeградируемых матриксов посредством ионизирующего излучения. 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-покрытию отмытые матриксы выдерживали в приготовленном модифицирующем растворе в течение 30 минут в условиях постоянного покачивания. По истечении времени экспозиции матриксы и трубчатые каркасы ПКЛ/ПВП/Ил/А высушивали на воздухе в стерильных условиях в течение 12 часов, и затем размещали в стерильные емкости для хранения.

2.2.2 Присоединение катионного амфифила к поверхности биodeградируемых матриц методом ковалентной сшивки

Связывание лекарственного покрытия с поверхностью биodeградируемых матриц и трубчатых каркасов посредством ковалентной сшивки проводили с предварительным синтезом амфифила, содержащего в своей структуре аминогруппу вследствие отсутствия у самого 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид функциональных групп для ковалентного присоединения к полимерной поверхности. В ранее опубликованной работе других авторов было показано, что введение функциональных групп в структуру при сохранении длины мостика, соединяющего 2 остатка диазabiциклооктана в 4-5 атомов углерода, слабо влияет на антибактериальную активность амфифилов [181]. Поэтому амфифил с аминогруппой был получен путем каталитического восстановления азидогруппы в соединении с водородом. Проведено ковалентное присоединение амфифила к поверхности матрикса из поликапролактона. В качестве линкерной группы был выбран гексаметилендиамин, так как его использование позволяет вводить на полимерную поверхность сосудистых протезов несколько большее количество аминогрупп (до $8,9 \times 10^{-9}$ Моль/см²) [10]. В нашем исследовании исходное содержание аминогрупп составило $8,7 \times 10^{-9}$ Моль/см², а степень конечной модификации для катионного амфифила, содержащего алифатическую аминогруппу, составила $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см².

Таким образом, для проведения комплексного тестирования *in vitro* и *in vivo* изготовлены биodeградируемые матриксы, отличающиеся дозой облучения, концентрацией компонентов лекарственного покрытия и типом модифицирования. В качестве контрольной группы выступили немодифицированные ПКЛ-матриксы.

2.3 Стереомикроскопия биodeградируемых трубчатых каркасов до и после формирования внешней армирующей спирали

Структура поверхности трубчатых каркасов до и после формирования внешней армирующей спирали, а также толщина армирующей нити, шаг спирали и степень ее впекания в стенку трубчатого каркаса оценены с помощью стереомикроскопа SZ2-IL-ST (Olympus, Япония) с окуляр-микрометром на увеличении $\times 10$.

2.4 Сканирующая электронная микроскопия

2.4.1 Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых матриц до имплантации

Для проведения сканирующей электронной микроскопии образцы плоских биodeградируемых матриц и трубчатых каркасов размером $0,5 \times 0,5$ см закрепляли на алюминиевой заглушке с помощью двусторонней клейкой углеродной ленты и подвергали золото-палладиевому напылению с получением покрытия толщиной 15 нм при использовании системы для напыления ЕМ ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия) и изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ. Диаметр волокон, площадь пор и пористость оценивали при помощи программы ImageJ (National Institutes of Health). Средний диаметр волокон и среднюю площадь пор рассчитывали после как минимум 100 измерений на образец.

2.4.2 Сканирующая электронная микроскопия поверхности эксплантированных биodeградируемых матриц

Образцы эксплантированных биodeградируемых матриц с прилежащими участками ткани крысы и биodeградируемых сосудистых протезов с прилежащими участками сонных артерий овец фиксировали в забуференном (pH 7,4) 10% водном растворе формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 часов каждая) биоматериал постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в 0,1М фосфатно-солевом буфере (ФСБ, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 12 часов, затем окрашивали 2% тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50%, 60%, 70%, 80% и 95% этанол, все по две смены, каждая смена по 15 минут), окрашивали 2% уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95% этаноле (5 часов), обезвоживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном (Реахим, Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 часов). После этого образцы переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60°C. Затем образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Далее проводили контрастирование образцов цитратом свинца по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. После этого проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200; Leica, США). Визуализацию структуры поверхности образцов выполняли в процессе сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах на электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 кВ.

2.5 Физико-механические испытания

Оценку механических свойств биodeградируемых матриц с различными вариантами поверхностного лекарственного модифицирования, а также биodeградируемых трубчатых каркасов до и после формирования антианевризматической спирали и модифицирования лекарственными препаратами проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75. Вырубку образцов осуществляли в продольном и поперечном направлениях с использованием ножа специальной формы (ISO 37 тип 4).

В качестве контроля использовали интактную сонную артерию овцы. Испытания проводились 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.

2.6 Определение краевых углов смачивания

Для контроля изменения свойств поверхности биodeградируемых матриц до и после модификации выполнен анализ краевых углов смачивания (θ), заключающийся в измерении углов контакта дистиллированной воды с исследуемой поверхностью. 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. Объём 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 [102].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, определяя стандартное отклонение (σ) измеряемой величины для каждого конкретного образца (по результатам не менее чем 8 измерений). Точность определения величины краевого угла $\pm 1^\circ$; все измерения выполнены при 20°C .

2.7 Оценка гемосовместимости полимерных образцов

2.7.1 Оценка степени гемолиза эритроцитов

Исследование гемолиза эритроцитов после контакта с поверхностью полимерных образцов проводили согласно стандарту ISO 10993.4. Использовали свежую донорскую кровь, в которую добавляли цитрата натрия 3,8% в соотношении 1:9 (цитрат:кровь). Полимерные образцы размером $2,5\text{ см}^2$ в количестве 5 шт. для каждого вида материала помещали в бюксы, содержащие 10 мл физиологического раствора. Бюксы выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 120 мин. В качестве положительного и

отрицательного контролей использовали физиологический раствор и дистиллированную воду, соответственно. Через два часа после инкубации в каждый бюкс добавляли по 200 мкл цитратной крови и снова помещали в термостат на 60 минут при 37°C. После инкубации полимерные образцы изымали из бюксов в соответствующие пробирки и центрифугировали в течение 10 минут 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 (Н) в % определяли по формуле (1) [95, 105]:

$$H(\%) = \frac{D_t - D_{ne}}{D_{pe} - D_{ne}} \times 100\%, \quad (1)$$

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 при измерении 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.

2.7.2 Оценка адгезии и индекс деформации тромбоцитов

Образцы полимерных матриц размером 0,5 см² инкубировали в течение 2 часов при 37°C в 300 мкл обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), полученной из свежей цитратной донорской крови при ее центрифугировании в течение 10 мин при 1200 об/мин. Далее исследуемые образцы промывали фосфатно-солевым буферным раствором (рН-7,4) с целью удаления неадгезированных компонентов плазмы. После чего образцы фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида в

течение 24 часов, промывали фосфатно-солевым буфером и дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации от 30% до 100% в течение 15 минут в каждом с последующим досушиванием при комнатной температуре. Затем образцы монтировали на специальные столики с помощью углеродного скотча и на их поверхности формировали токопроводящее (Au/Pd) покрытие при помощи вакуумной установки EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия). Для анализа использовали 8 наиболее характерных полей, выбранных случайным образом. Адгезивную способность поверхности материалов оценивали по количеству тромбоцитов на 1 мм², по преобладанию типа тромбоцита на поверхности и по индексу их деформации, который рассчитывали по формуле (2) [95, 105, 113]:

$$\text{ИД} = \frac{\text{КТI} \times 1 + \text{КТII} \times 2 + \text{КТIII} \times 3 + \text{КТIV} \times 4 + \text{КТV} \times 5}{\text{ОКТ}}, \quad (2)$$

где ИД – индекс деформации тромбоцитов; КТI – количество тромбоцитов типа I; КТII – количество тромбоцитов типа II; КТIII – количество тромбоцитов типа III; КТIV – количество тромбоцитов типа IV; КТВ – количество тромбоцитов типа V; ОКТ – общее количество тромбоцитов.

Типы тромбоцитов в зависимости от активации:

- I Тромбоцит дискообразной формы, без деформации;
- II Тромбоцит увеличен в размере с зачатками псевдоподий в виде выпячиваний;
- III Тромбоцит значительно увеличен в размере, неправильной формы, с ярко-выраженными псевдоподиями, тромбоциты имеют тенденцию скапливаться в более крупные конгломераты;
- IV Распластанный тромбоцит, цитоплазма распространяется между псевдоподиями;
- V Тромбоцит в виде пятна с гранулами, за счет распространения цитоплазмы псевдоподии не могут быть идентифицированы, [95, 105, 113].

2.7.3 Оценка агрегации тромбоцитов

Исследование проводили согласно стандарту ISO 10993.4. Использовали свежую донорскую кровь, в которую добавляли цитрат натрия 3,8%, в соотношении 1:9 (цитрат:кровь). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали при помощи повторного центрифугирования ОТП в течение 20 минут при 4000 об/мин. БТП использовали для калибровки прибора. В качестве положительного контроля выступила интактная обогащенная тромбоцитами плазма. Измерения осуществляли в спонтанном режиме без индукторов агрегации. Для восстановления уровня ионов Ca^{+2} в цитратной крови использовали раствор CaCl_2 с молекулярной массой 0,025М, после чего производили измерения. Соотношение пробы и реагента составило 250 мкл ОТП + 25 мкл CaCl_2 . Время контакта исследуемых образцов с ОТП – 3 минуты. Измерение максимума агрегации тромбоцитов крови проводили на полуавтоматическом анализаторе агрегации тромбоцитов «АРАСТ 4004» (LABiТес, Германия).

2.8 Детекция и скорость высвобождения лекарственных препаратов из биodeградируемых матриксов

2.8.1 Качественная и количественная оценка наличия илопроста на поверхности биodeградируемых матриксов и в аналитах

Для изучения скорости высвобождения илопроста с поверхности модифицированных полимерных матриксов был применен метод инфракрасной спектроскопии. ИК-спектры исследуемых образцов регистрировали на ИК-Фурье спектрометре «Инфралюм-ФТ-08» (Люмекс, Россия). Для анализа применялась приставка МНПВО фирмы «Pike Technologies» и плоская пластина. Стерильный кусочек матрикса размером 1 см² помещался на поверхность пластины, и плотно

прижимался зажимом к поверхности пластины. Спектр регистрировался в спектральном диапазоне $620\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ при разрешении 4 см^{-1} , число сканов – 64.

Были исследованы образцы матриксов, изъятых спустя 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 и 90 суток инкубирования в стерильном фосфатно-солевом буфере при 37°C .

Для определения наличия илопроста в анализах применялась приставка МНПВО фирмы «Pike Technologies» и пластина с углублением и кристаллом из селенида цинка. Жидкие образцы отбирались из эппендорфа шприцем объемом 1 мл, после чего равномерно распределялись по поверхности кристалла. ИК-спектр регистрировался в спектральном диапазоне $500\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ с разрешением 4 см^{-1} и числом сканов – 64. Для качественной оценки функционального состава использовали ИК-спектр в режиме пропускания.

Для количественной оценки полученные спектры отражения (R) были преобразованы с использованием функции Кубелки-Мунка (F) по формуле (3):

$$F = \frac{(1-R)^2}{2R}, \quad (3)$$

Спектры в функции Кубелки-Мунка удобно использовать при проведении количественного анализа исследуемых образцов, так как величина F для характерных полос многих веществ пропорциональна их концентрации.

2.8.2 Качественная и количественная оценка наличия катионного амфифила на поверхности биodeградируемых матриксов

Для определения присутствия амфифила на поверхности модифицированных протезов применяли метод электронно-зондового микроанализа, по наличию брома. Бром – элемент, появляющийся в полимерном сосудистом протезе именно при присоединении тетрабромида 1,5-бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентана.

Наличие брома определяли методом энергодисперсионной X-лучевой спектроскопии сразу после изготовления матриксов и после их хранения при 4°C в течение 1 суток, при -20°C в течение 1 суток или 6 месяцев, а также после 6-часовой инкубации в фосфатно-солевом буфере с 0,05% Твин 20 (neoFroxx GmbH, Германия) при 37°C. Для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии высушенные образцы закрепляли на специальном столике с помощью двусторонней клейкой углеродной ленты и напыляли углерод (толщина 60 нм) с помощью напылительного устройства EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия). Подбор режимов для анализа произведен в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22309-2015. Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония) в сочетании с кремниевым дрейфовым детектором высокого разрешения (XFlash 4010; Bruker, Германия) в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ и высоком вакууме. Элементный анализ производили с поправкой на углерод.

Кинетику выхода катионного амфифила с поверхности полимерных матриксов определяли методом хромато-масс-спектрометрии. Для этого стерильные кусочки модифицированных полимерных матриксов размером 1 см², помещали в эпендорфы со стерильным фосфатно-солевым буфером (1 мл), содержащим 0,05% Твин 20 (для предотвращения неспецифической адсорбции амфифила пластиком) и инкубировали при 37°C. Полимерные образцы извлекали через установленные промежутки времени (1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 суток). Для уточнения результатов образцы полимерного материала, выдержанные в фосфатном буфере 90 суток были дополнительно выдержаны в 1 мл метилового спирта при 40°C в течение 6 часов. Полученный раствор был проанализирован методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-масс-спектрометрии), с использованием жидкостного хроматографа/масс-селективного детектора Agilent 1100 (Agilent Technologies, США).

2.9 Оценка антибактериальной активности катионного амфифила в составе биodeградируемых матриксов

Оценка антибактериальной активности катионного амфифила, использованного для поверхностной модификации биodeградируемых матриксов 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.mirabillis* ATCC 3177, *P.aeruginosa* ATCC 27853. Данные микроорганизмы выбраны для эксперимента ввиду их распространенности при инфекционных осложнениях в кардиохирургии. Определение чувствительности контрольных штаммов микроорганизмов к исследуемым полимерным матриксам проводили с помощью диско-диффузионного метода оценки чувствительности бактерий к катионному амфифилу. Для приготовления суспензии микроорганизмов использовали метод прямого суспендирования колоний в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Не позднее чем через 60 минут бактериальную суспензию наносили на чашки с агаром, штриховыми движениями в трех направлениях на всю поверхность агара таким образом, чтобы штрихи плотно прилегали друг к другу. Диски с полимерными матриксами раскладывали не позднее 15 минут после инокуляции чашек. Чашки инкубировали в термостате при температуре 35-36°C в течение 24-48 часов.

2.10 Оценка матриксных свойств биodeградируемых матриксов в зависимости от варианта поверхностной модификации лекарственными препаратами

2.10.1 Заселение полимерных матриксов эндотелиальными клетками

Из образцов матриксов выкраивали лоскуты, помещали их на дно лунок 24-луночного планшета (Corning, США). Образцы крепили на дно лунок с помощью

0,6% раствора агарозы (Helicon, США). Для оценки матричных свойств биodeградируемых матриц были проведены эксперименты с использованием гибридомы эндотелиальных клеток Ea.hy 926. Образцы матриц засеивали клетками гибридомы эндотелиальных клеток Ea.hy 926 в количестве 200 000 клеток на лунку, добавляя в каждую лунку 1 мл культуральной среды DMEM/F12 (Sigma, США), содержащей 1% HEPES буфера, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 1% L-глутамина, 100 МЕ пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,1 мг/мл амфотерицина В и гипоксантин, аминоптерин, тимидин (HAT) (Sigma, США). Замену питательной среды проводили ежедневно, культивируя образцы в условиях CO₂-инкубатора в эксперименте использовали образцы в двух (оценка пролиферативной активности клеток) и трех (оценка жизнеспособности клеток) повторях. Контрольную группу составили клетки, культивируемые на пластике в аналогичных условиях. Срок культивирования составил 4 суток.

2.10.2 Оценка клеточной жизнеспособности

Жизнеспособность клеток, культивированных на поверхности биodeградируемых матриц в течение 4 суток, оценивали посредством их окрашивания ядерными красителями Hoechst 33342 (14533; Sigma Aldrich, США) и этидиумом бромидом (46067; Sigma Aldrich, США), внося в лунки за 10 минут до микроскопии по 10 мкг/мл и 30 мкг/мл красителя, соответственно. Подсчёт клеток на образцах и культуральном пластике, культивирование клеток на котором выступило в качестве контроля, производили на инвертированном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) в 5 случайных полях зрения с каждого дубля. Затем был проведен пересчёт клеток на $S=1 \text{ мм}^2$.

Относительное количество мертвых клеток высчитывали по формуле (4):

$$\frac{\text{Абсолютное количество мертвых клеток}}{\text{Абсолютное количество всех адгезированных клеток}} \times 100\%, \quad (4)$$

Относительное количество живых клеток определяли путем вычитания доли мертвых клеток из 100% адгезированных клеток.

2.10.3 Оценка клеточной пролиферации

Пролиферативную активность клеток, культивированных на поверхности биodeградируемых матриц в течение 4 суток, оценивали с помощью набора Click-iT™ Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging (C10637; Thermo Fisher Scientific, США). Клетки, адгезированные на матрицах, в течение последних 16 часов эксперимента инкубировали с EdU-реагентом, далее окрашивали в соответствии с инструкцией производителя. После окончания процедуры клетки докрашивали ядерным красителем DAPI (10 мкг/мл, Sigma Aldrich, США) в течение 30 минут. Визуализацию проводили с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss, Германия), при увеличении $\times 200$ анализировали 10 случайно выбранных полей зрения с каждого образца, по 2 образца для каждого типа полимера. Количественный анализ изображений осуществляли в программе ImageJ (National Institutes of Health, США), оценивали общее количество клеток и количество пролиферирующих клеток в поле зрения. Результаты представляли как процент пролиферирующих клеток от общего числа клеток.

2.10.4 Оценка цитотоксичности матриц с различной лекарственной наполненностью

Для оценки цитотоксического влияния каждого примененного лекарственного препарата, использованного для поверхностной модификации биodeградируемых матриц, были изготовлены дополнительные группы полимерных матриц с изолированным присоединением илопроста и катионного амфифила. Наряду с данными группами изучена цитотоксичность матриц с сочетанным использованием илопроста и катионного амфифила для

поверхностной модификации. Оценку цитотоксичности определяли по изменению клеточного индекса (КИ), измеренного с помощью клеточного анализатора RTCA xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США) в режиме реального времени. КИ вычислялся программой прибора автоматически по формуле (5):

$$\frac{R_n - R_b}{t}, \quad (5)$$

где R_b – исходное значение импеданса в лунке, содержащей культуральную среду без клеток, R_n – значение импеданса в любое время t в лунке, содержащей тестируемые клетки.

Клетки расселяли в лунки E-Plate 16 (ACEA Biosciences, США) в количестве 20000 клеток/лунку. В планшет помещали вставки E-Plate Insert (ACEA Biosciences, США), в лунки которых вносили образцы матриксов, минимум 2 повтор на каждый образец. В качестве контроля использовали лунки планшета только с клетками. Лунки, заполненные культуральной средой, использовали как базовое значение сопротивления культуральной среды.

Клетки инкубировали в стандартной среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением НАТ (Sigma, США), антибиотиков и антимикотиков, в условиях CO₂-инкубатора при 37°C и 5% CO₂. КИ регистрировали в следующем режиме: каждые 15 минут – первые 2 часа после внесения клеток; каждые 30 секунд – в течение 2 часов после внесения тестируемых образцов, далее каждые 15 минут до окончания эксперимента. Общее время эксперимента составило 74 часа. Расчет клеточного индекса и времени удвоения культуры рассчитывали на приборе автоматически, числовые данные представлены в формате $M \pm SD$.

2.11 Имплантация полимерных матриксов

2.11.1 Моделирование внутримышечной инфицированной раны на модели крыс

Для моделирования инфицированной раны проводили наркотизацию животных: внутримышечное введение Золетила 100 (0,5 мл/кг) и Ксилазина (0,15 мл/гол). Подкожно и внутрикожно вводили 0,5% раствора Лидокаина в область раны (до 1 мл/гол). Для подготовки операционного поля проводили выбривание области 3×4 см на холке крысы, затем обрабатывали поле спиртовыми салфетками.

Моделирование самой инфицированной раны проводили на холке, для этого скальпелем наносилась линейная кожная рана длиной 1,0-1,5 см путем послойного рассечения тканей (кожи, подкожно-жировой клетчатки, поверхностной фасции мышц и мышечной ткани) на требуемую глубину.

Проводили внутримышечную инъекцию бактериальной культуры в подготовленную открытую рану – взвесь культуры *S.aureus* в концентрации 10^5 - 10^{12} КОЕ/мл, и проводили дополнительное орошение 1 мл/гол. Затем проводили ушивание раны прерывистым швом с использованием шовного материала «Лавсан» 3.0 (Рисунок 3). На развитие инфекции в ране было отведено 7 суток.

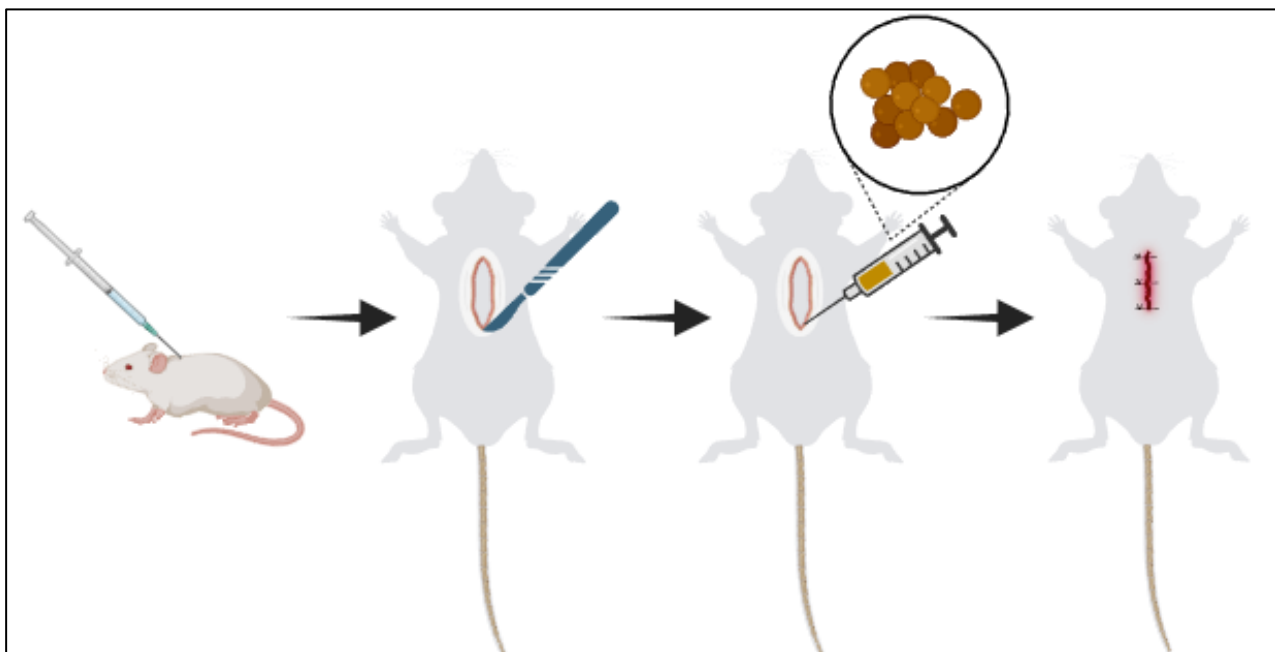


Рисунок 3 – Схема моделирования инфицированной раны и введения культуры *Staphylococcus aureus* у крыс линии Wistar

2.11.2 Имплантация матриксов в инфицированную рану крыс

Для подтверждения антибактериальной активности амфифила *in vivo* использовали матриксы ПКЛ/ПВП/Ил/А, содержащие илопрост в концентрации 0,2 мкг/мл и катионный амфифил в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенные к поверхности матриксов методом комплексообразования; доза стерилизующего облучения 15 кГр (n=10). В качестве группы контроля выступили немодифицированные матриксы ПКЛ (n=10).

Перед имплантацией матриксов с инфицированной раны снимали швы, раздвигали ткани тупым предметом. Механическое очищение раны от гнойных масс не производили. Полимерный матрикс помещали в просвет инфицированной раны по центру, после чего края раны сводили и ушивали прерывистым швом с использованием шовного материала «Лавсан» 3.0. Полимерные образцы имплантированы на 7 суток для контрольной группы, на 7 и 14 суток – для опытной группы.

2.11.3 Имплантация сосудистых протезов в сонную артерию овец

Исследование по имплантации одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ № 12 от 10.06.2020г. Работа с животными соответствовала требованиям приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983, №267 МЗ РФ от 19.06.2003, «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986), Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и международным правилам (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals – публикация US National Institutes of Health: NIH Publication No 85–23, ред. 1996).

Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А с армирующей спиралью (опытная группа, n = 12) и ПКЛ-протезы с армирующей спиралью (контрольная группа, n = 6) были имплантированы в сонную артерию овец эдильбаевской породы методом «конец-в-конец» по схеме: 1 животное – 1 протез. Диаметр протезов составил 4 мм, длина – 40 мм.

Срок имплантации составил 6 месяцев. Имплантация протезов и анестезиологическое сопровождение осуществлялись согласно общепринятой методике по следующей схеме: премедикация крупных лабораторных животных производили Ксилазином (Ксиланит, Нита-Фарм, Россия) 0,05-0,25 мл с расчетом на 10 кг массы животного и внутримышечным введением 1 мг атропина. Вводный наркоз производился 5-7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд, затем внутривенно вводили атракурия безилат (Риделат, Сотекс, Россия), в дозировке 0,5-0,6 мг на 1 кг массы животного. Интубация трахеи овцы – эндотрахеальной трубкой диаметром 9.0. В процессе проведения манипуляций по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы, поддержание наркоза осуществляли севораном 2-4 об. % и Риделате – путем непрерывной инфузии со скоростью 0,3-0,6 мг/кг/ч. Параллельно проводился мониторинг жизненных показателей животного: артериального давления, частоты сердечных сокращений,

уровня кислорода в крови (SpO_2). Фиксировались показатели при искусственной вентиляции легких: частота дыхания – 12-15/мин, конечно-экспираторное давление (РЕЕР) 7-9 мбар, дыхательный объем 6-8 мл/кг, фракция кислорода во вдыхаемой смеси (FiO_2) – 40%-60%.

Для осуществления доступа к сонной артерии овцы проводилась внутривенная системная гепаринизация – 5000 ЕД, с пережатием сонной артерии, резекция выделенного сегмента под углом 45° . Сосудистый протез имплантировали по типу «конец в конец» отдельными узловыми швами проксимально, затем – дистально с использованием нити Prolene 6.0 (Ethicon, США). После снятия зажимов с сонной артерии следовали стандартному протоколу профилактики воздушной эмболии с последующим запуском кровотока и ушиванием раны нитью Vicril 2.0 (Ethicon, США). В заключении операции проводили обработку шва клеем БФ-6, подкожное введение эноксапарина натрия в концентрации 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл и экстубацию животного.

2.12 Ультразвуковой мониторинг проходимости имплантированных сосудистых протезов

На протяжении эксперимента на крупных лабораторных животных с использованием портативной переносной системы цветной доплерографии премиум-класса М7 (Mindray, Китай) выполняли ультразвуковой мониторинг проходимости имплантированных сосудистых протезов в следующие временные точки: 1 и 5 сутки после имплантации; 1, 3 и 6 месяцев.

2.13 Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы полимерных матриксов с прилежащими тканями, имплантированные крысам внутримышечно в область холки (плоские матриксы) и овцам в сонные артерии (сосудистые протезы диаметром 4 мм длиной 4 см), фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum, Россия) в течение суток, затем для удаления излишков фиксирующего раствора промывали в проточной воде, обезвоживали в 6 порциях IsoPrep (BioVitrum, Россия) по 30 минут в каждой порции, оставляя на ночь в последней. Затем пропитывали образцы парафином (3 порции) при 56°C в течение 60 минут в каждой порции. Пропитанные образцы заливали в тугоплавкий парафин ГИСТОМИКС (BioVitrum, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы НМ 325 (Thermo Scientific, США) и помещали их на предметные стекла. Изготовленные образцы подсушивали в термостате в течение ночи при 37°C. Затем образцы депарафинизировали в 3 порциях о-ксилола в течение 1-2 минуты в каждой и дегидратировали в 3 порциях 96% спирта по 1-2 минуты.

Для окрашивания гематоксилином-эозином предварительно депарафинизированные и дегидратированные срезы промывали дистиллированной водой, затем помещали в раствор гематоксилина Гарриса (BioVitrum, Россия) на 3 минуты с последующим промыванием проточной водой в течение 3-5 минут для подсинения. Промытые срезы погружали в водно-спиртовой раствор эозина (BioVitrum, Россия) на 2 минуты, затем промывали в дистиллированной воде в течение 1 мин и дегидратировали в серии спиртов от 70% до 95% по 10-20 секунд в каждой порции и просветляли в о-ксилоле в течение 3 минут.

Для проведения окрашивания по Ван-Гизону депарафинизированные и дегидратированные срезы помещали в гематоксилин Вейгерта (BioVitrum, Россия) на 10 минут, затем промывали в проточной воде в течение 3 минут. Далее срезы окрашивали пикрофуксином (BioVitrum, Россия) в течение 2,5 минут и промывали дистиллированной водой 10 секунд, дегидратировали в серии спиртов восходящей

концентрации от 70% до 95 % в пределах 1-2 минут и просветляли в о-ксилоле в течение 3 минут.

Присутствие аморфного кальция или его кристаллических фракций определяли при помощи окрашивания образцов ализариновым красным С (Химсервис, Россия) с окрашиванием флуоресцентным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). Стекла со срезами эксплантированных образцов погружали в 2% водный раствор ализаринового красного С на 70 секунд, промывали в 3 порциях дистиллированной воды, затем проводили докрасивание DAPI 10 мкг/мл ядер клеток в течение 30 минут в темном месте.

После образцы отмывали от излишка красителя в 3 порциях дистиллированной воды и тщательно высушивали. Срезы образцов на предметных стеклах заключали монтирующей средой (BioVitrum, Россия) и накрывали покровным стеклом.

Для дифференциации присутствия бактерий в тканях, окружающих эксплантированные плоские матриксы, проведена окраска плоских матриксов по Граму. Перед началом окрашивания стекла с образцами промывали в порции дистиллированной воды. Окрашивание проводили посредством готового набора Gram Stain Kit (Microorganism Stain) (ab150672) (Abcam Inc, Великобритания). Отмытые срезы инкубировали в растворе Gentian Violet Solution (горечавка фиолетовая) в течение 1 минуты. Затем отмывали в порции дистиллированной воды и инкубировали в растворе Lugol's Iodine Solution (р-р Люголя) в течение 1 минуты, отмывали в проточной воде, затем наносили Gram's Decolorizer (обесцвечиватель Грама) до исчезновения окраски (около 5 секунд). Отмывали в порции дистиллированной воды, инкубировали в растворе Carbol Fuchsin (Карбол Фуксин) примерно 1-2 минуты. Отмывали в дистиллированной воде, затем наносили раствор Tartrazine (Тартразин) и инкубировали в течение 15 секунд. Затем проводили отмывку в 95% этаноле, обезвоживали в трех порциях 95% этанола, просветляли в о-ксилоле и заключали под покровное стекло с монтирующей средой (BioVitrum, Россия).

Окрашенные препараты срезов эксплантированных образцов исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива $\times 50$, $\times 100$ и $\times 200$.

2.14 Иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных сосудистых протезов

Эксплантированные сосудистые протезы замораживали и с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific, США) изготавливали серийные криосрезы толщиной 8 мкм с интервалом 100 мкм. Препараты фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин. Перед окраской на внутриклеточные маркеры проводили пермеабелизацию срезов обработкой раствором Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее срезы окрашивали первичными антителами в следующих сочетаниях: кроличьи антитела к CD31 (ab28364; Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -SMA, ab7817; Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда vWF (ab6994; Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену IV типа (ab6586; Abcam, Великобритания) и мышинные антитела к коллагену I типа (ab23446; Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену III типа (NB600-594; Novus Biologicals, США). Срезы инкубировали с антителами в течение ночи при 4°C. Затем срезы инкубировали со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488-conjugated (A11034; Thermo Fisher Scientific, США) и антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 555-conjugated (A31570; Thermo Fisher Scientific, США) в течение 1 часа при комнатной температуре. На всех этапах окрашивания для промежуточной отмывки срезов использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,1% Твин 20 (Sigma-Aldrich, США). Для удаления автофлуоресценции срезы обрабатывали Autofluorescence Eliminator Reagent (2160; Millipore, США) по методике производителя. Ядра контрастировали при помощи окраски DAPI (10 мг/мл, D9542; Sigma-Aldrich, США)

в течение 30 минут. Окрашенные препараты заключали под покровное стекло с использованием монтирующей среды ProLong (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM700 (Carl Zeiss, Германия) при увеличениях $\times 200$, $\times 630$.

2.15 Сравнительный протеомный анализ

Для полноценного понимания механизмов регенерации новообразованной сосудистой ткани на основе биodeградируемых полимерных каркасов был выполнен сравнительный протеомный анализ.

Дистальные сегменты эксплантированных сосудистых протезов и интактные контралатеральные сонные артерии овец промывали физиологическим раствором (Гематек, Россия) и гомогенизировали (FastPrep-24 5G; MP Biomedicals, США; Lysing Matrix S Tubes, 116925050-CF, MP Biomedicals, США) в буфере T-PER (78510; Thermo Fisher Scientific, США), поставляемом с набором ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt (78444; Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. После первоначального центрифугирования при $14\,000\times g$ (Microfuge 20R; Beckman Coulter, США) в течение 10 мин супернатант дополнительно центрифугировали при $200\,000\times g$ (Optima MAX-XR; Beckman Coulter, США) в течение 1 часа для осаждения нерастворимых белков ECM. Количественное определение общего белка проводили с использованием набора для анализа белка BCA (23227; Thermo Fisher Scientific, США) и микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

После удаления буфера RIPA путем осаждения ледяным ацетоном (650501; Sigma-Aldrich, США), белковый осадок ресуспендировали в 8 моль/л мочевины (U5128; Sigma-Aldrich, США), разведенной в 50 ммоль/л бикарбоната аммония (09830; Sigma-Aldrich, США). Концентрацию белка измеряли с помощью флуорометра Qubit 4 (Q33238; Thermo Fisher Scientific, США) с набором для

количественного определения белка QuDye (25102; Lumiprobe, Cockeysville, MD, США) в соответствии с протоколом производителя. Затем образцы белка (15 мкг) инкубировали в 5 ммоль/л дитиотреитола (D0632; Sigma-Aldrich, США) в течение 1 часа при 37°C с последующей инкубацией в 15 ммоль/л йодацетамида в течение 30 мин в темном месте при комнатной температуре (I1149; Sigma-Aldrich, США). Затем образцы разбавляли 7 объемами бикарбоната аммония с концентрацией 50 ммоль/л и инкубировали в течение 16 часов при 37°C с 200 нг трипсина (соотношение трипсин:белок 1:50; VA9000, Promega, США). Затем пептиды замораживали при -80°C в течение 1 часа и обессоливали с использованием колонок Pierce C18 Spin Tips (Tips-RPS-M.T2.200.96; Affiniseq, Le Houlme, Франция) в соответствии с протоколом производителя с использованием метанола (1880092500; Sigma-Aldrich, США), ацетонитрила (1000291000; Sigma-Aldrich, США) и 0,1% муравьиной кислоты (33015; Sigma-Aldrich, США). Обессоленные пептиды сушили в центрифуге-концентраторе (Concentrator plus, Германия) в течение 3 часов и, наконец, растворяли в 20 мкл 0,1% муравьиной кислоты для дальнейшего протеомного анализа.

Примерно 500 нг пептидов использовали для одного протеомного анализа с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (УВЭЖХ-МС/МС) с подвижностью ионов в масс-спектрометре TimsToF Pro (Bruker, США) с системой УВЭЖХ nanoElute (Bruker, США). УВЭЖХ выполняли в режиме двухколоночного разделения с использованием картриджа-ловушки Acclaim PepMap 5 мм (Thermo Fisher Scientific, США) и разделительной колонки Bruker Fifteen (C18 ReproSil AQ, 150 мм × 0,75 мм, 1,9 мкм, 120 Å; Bruker, Billerica, США) в градиентном режиме со скоростью потока 400 нл/мин и температурой 40°C. Фаза А представляла собой воду и 0,1% муравьиной кислоты, фаза Б представляла собой ацетонитрил и 0,1% муравьиной кислоты (1000291000; Sigma-Aldrich, США). Градиент составлял от 2% до 30% фазы Б в течение 42 мин, затем до 95% фазы Б в течение 6 мин с последующей промывкой 95% фазой Б в течение 6 мин. Перед каждой пробой ловушку и разделительную колонку

уравновешивали 10 и 4 объемами колонки соответственно. Источник ионов CaptiveSpray использовался для ионизации электрораспылением при капиллярном напряжении 1600 В, потоке N₂ 3 л/мин и температуре источника 180°C. Масс-спектрометрическую съемку проводили в режиме DDA-PASEF с циклом 0,5 с в положительной полярности с фрагментацией ионов не менее чем с двумя зарядами в диапазоне m/z от 100 до 1700 и подвижности ионов от 0,85 до 1,30 1/K0.

Идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения PEAKS Studio Xpro (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) с использованием эталонного протеома овцы (*Ovis aries*) UP000002356 и базы данных белковых примесей CRAP. Параметрами для поиска были: допуск ошибки родительской массы 10 м.д. и допуск ошибки массы фрагмента 0,05 м.д., FDR белков и пептидов <1,0% и 0,1% соответственно, два возможных пропущенных сайта расщепления, белки с ≥ 2 уникальными пептидами. Карбамидометилирование цистеина считалось фиксированной модификацией. В качестве переменных модификаций рассматривались окисление метионина, N-концевое ацетилирование, дезамидирование аспарагина и глутамина.

Масс-спектрометрические данные были переданы в Консорциум ProteomeXchange через партнерский репозиторий PRIDE с идентификатором набора данных PXD036520. Для дальнейшего анализа в R (версия 3.6.1; R Core Team, 2019) использовалась количественная оценка без меток по площади пика под кривой и спектральным подсчетам. Все белки, представленные в ≥ 9 из 12 биологических повторов, были идентифицированы, и группы сравнивались с помощью пакета «VennDiagram» и построения диаграммы Венна. Белки с NA в >3 образцах в обеих группах были удалены, а вменение пропущенных значений по k -ближайшим соседям было выполнено с помощью пакета «impute». Затем было проведено лог-преобразование и квантильная нормализация с дальнейшим анализом дифференциальной экспрессии с помощью пакета «limma». Затем была проведена кластеризация выборок с помощью разреженного дискриминантного анализа

частичных наименьших квадратов в пакете «MixOmics». Для визуализации использовали пакеты «ggplot2» и «EnhancedVolcano».

Для биоинформатического анализа уникальные белки определялись как те, которые представлены в ≥ 9 образцах в каждой группе (полимерные протезы или контралатеральные сонные артерии овец) и ≤ 3 образцах другой группы. Дифференциально экспрессируемые белки определялись как белки со средней площадью пика в ≥ 4 раза выше или ниже по сравнению с другой экспериментальной группой, а также белки с логарифмическим кратным изменением ≥ 1 и значением $p \leq 0,05$ с поправкой на частоту ложных открытий. Биоинформатический анализ проводился с использованием баз данных Gene Ontology, COMPARTMENTS, UniProtKB. Ключевые слова, Reactome и Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG).

2.16 Статистические методы

Полученные данные обработаны пакетом программ «Graph Pad Prism 7.04». Нормальность распределения величин в полученных выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы и квартильного размаха (Me (Q1-Q3)). Различия между группами оценивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни, при условии малой выборки – с поправкой Бонферрони. При сравнении трех и более независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, для попарного сравнения групп применяли критерий Данна. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ И ТЕСТИРОВАНИЯ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ МАТРИКСОВ *IN VITRO*

3.1 Оценка качества поверхностного модифицирования биodeградируемых матриксos лекарственными препаратами

3.1.1 Определение ИК-спектров основных составляющих матриксos до и после модифицирования

В процессе инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье были изучены ИК-спектры, свойственные каждой составляющей, присутствующей в конечном варианте модифицированного матрикса на основе поликапролактона: поликапролактону, поливинилпирролидону, катионному амфифилу, илопросту и фосфатно-солевому буферу. Химические формулы вышеназванных соединений представлены на рисунке 4.

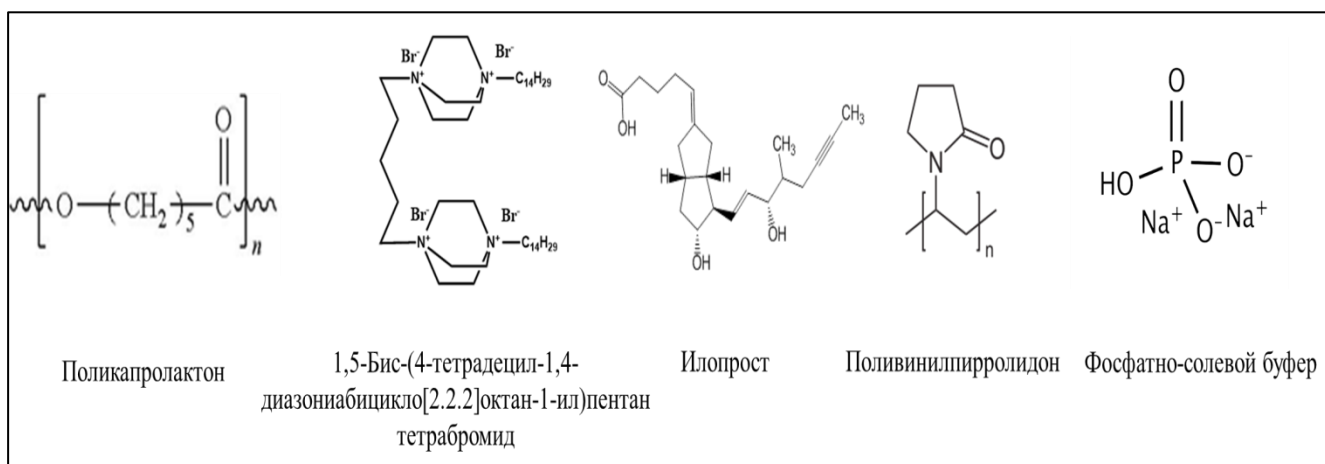
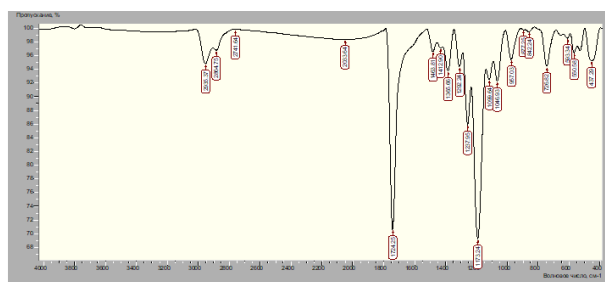
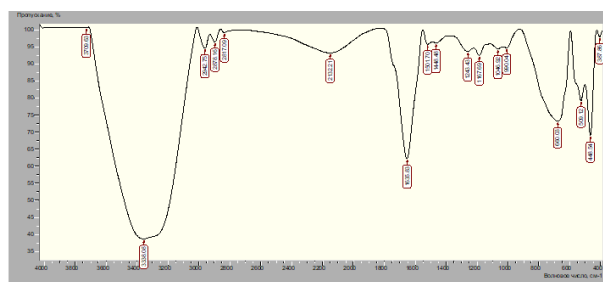


Рисунок 4 – Химические формулы исходных соединений

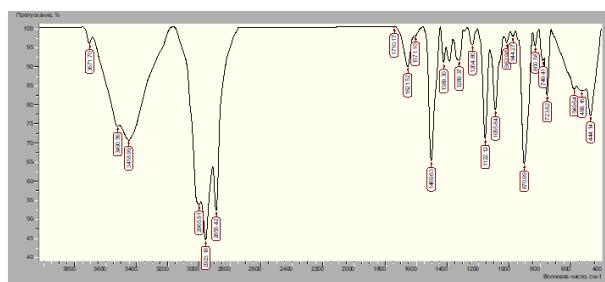
Соответственно, в ИК-спектре поликапролактона выявлены полосы, соответствующие колебаниям алифатических С-Н-групп, С=О, С-С и С-О-С-групп (Рисунок 5). Отнесение полос характеристических колебаний в исследуемых образцах приведено в таблице 1.



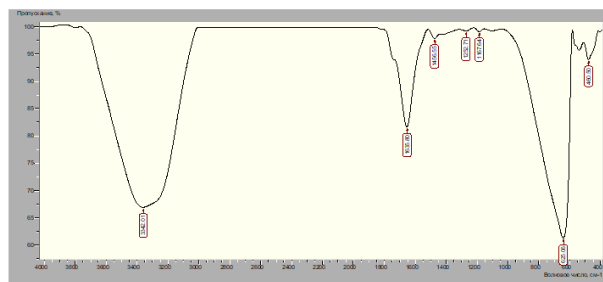
А



Б



В



Г

Рисунок 5 – Исходные ИК-спектры поликапролактона, лекарственных веществ, буфера: А – поликапролактон, Б – 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло [2.2.2]октан-1-ил) пентан тетрабромид, В – илопрост, Г – фосфатно-солевой буфер

Таблица 1 – Отнесение полос характеристичных колебаний в исследуемых образцах

Частота, см ⁻¹	Отнесение полос
Матрикс на основе поликапролактона (ПКЛ)	
2920	Валентные асимметричные колебания алифатических CH ₂ -групп
2860	Валентные симметричные колебания алифатических CH ₃ -групп
1724	C=O валентные колебания
1463	Деформационные колебания алифатических CH ₂ , CH ₃ -групп
1237	C-O валентные колебания
1173	C-O валентные колебания в C-O-C
700-900	C-C валентные колебания
Катионный амфифил – 1,5-бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабцикло [2.2.2]октан-1-ил) пентан тетрабромид	
3671	Свободные OH – валентные колебания
3490	NH – валентные колебания

Продолжение таблицы 1 – Отнесение полос характеристичных колебаний в исследуемых образцах

Частота, см ⁻¹	Отнесение полос
3419	ОН связанные водородной связью
3200	NH – валентные колебания
2920	Валентные асимметричные колебания алифатических CH ₂ -групп
2860	Валентные симметричные колебания алифатических CH ₃ -групп
1621	ОН (поглощение воды)
1571	CN – валентные колебания
1460	деформационные колебания алифатических CH ₂ -групп
1389	CH ₃ – деформационные колебания;
1237	Скелетные колебания связи C-C
1122	Колебание связи N-H
870-723	(CH ₂) _x – маятниковое колебание
549	Валентные колебания связи C-Br
Илопрост	
3370	ОН – валентные колебания
2920	Валентные асимметричные колебания алифатических CH ₂ -групп
2860	Валентные симметричные колебания алифатических CH ₃ -групп
2100-2140	C≡C в алкинах
1638	C=O валентные колебания
1460	Деформационные колебания алифатических CH ₂ , CH ₃ -групп
1237	C-O валентные колебания
1172	C-O валентные колебания в C-O-C
700-900	C-S валентные колебания
720	CH ₂ – маятниковые колебания
630-660	Деформационные колебания -C≡C-групп
Фосфатно-солевой буфер	
3342	O-H валентные колебания
1635	O-H валентные колебания
1250	P-O асиметричные валентные колебания
625	O-H валентные колебания
460	Na-O колебание

В соответствии с химической формулой (Рисунок 4), ИК-спектр катионного амфифила (1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид) соответствовал колебаниям водородной связи N-H, валентным и

деформационным колебаниям CH_x -групп, C-N -связей, колебаниям связи C-C , N-H , C-N и C-Br (Рисунок 5, Таблица 1).

ИК-спектру илопроста свойственны полосы, соответствующие валентным и деформационным колебаниям OH -групп, CH_x , C=O и C-C -группам (Рисунок 4, 5). Помимо этих групп имеются колебания, отсутствующие в спектрах, рассмотренных выше образцов: в интервале $2100\text{--}2140\text{ см}^{-1}$ – валентное колебание $\text{C}\equiv\text{C}$ в алкинах и при 660 см^{-1} – деформационное колебание связи $\text{C}\equiv\text{C}$ - (Таблица 1).

Фосфатно-солевой буфер представлял собой водный раствор на основе соли, содержащей вторичный кислый фосфат натрия, хлорид натрия и в некоторых составах, хлорид калия и дигидрофосфат калия (NaCl , KCl Na_2HPO_4 , KH_2PO_4). В спектре фосфатно-солевого буфера обнаружены полосы, относящиеся к колебаниям групп O-H , P-O (асимметричные валентные колебания) и колебания групп Na-O (Рисунок 5, Таблица 1).

В ИК-спектрах немодифицированных и модифицированных ПВП ПКЛ-матрикс присутствовали полосы валентных колебаний C=O (эфирный карбонил) при 1724 см^{-1} , валентные полосы C-O были отмечены при 1278 и 1054 см^{-1} (Рисунок 6), [11].

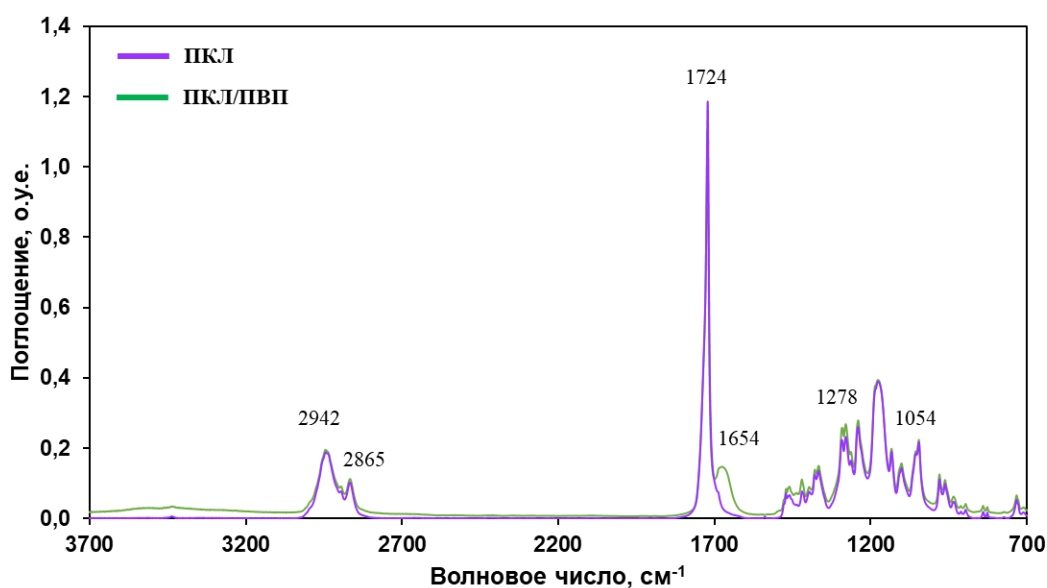


Рисунок 6 – ИК-спектры матрикса из поликапролактона до и после полимеризации с поливинилпирролидоном, [11]

В спектрах всех исследуемых образцов также наблюдали полосы небольшой интенсивности при 2942 см^{-1} и 2865 см^{-1} , соответствующие асимметричным колебаниям метилен-кислородной группы ($\text{CH}_2\text{-O}$) и симметричным колебаниям метиленовой группы ($\text{CH}_2\text{-}$) соответственно (Рисунок 6). В отличие от немодифицированных образцов в спектрах ПКЛ-матрикс с ПВП присутствовала полоса при 1654 см^{-1} , относящаяся к карбонилу амидной группы пирролидинового кольца, что свидетельствует о прививке полимера к поверхности сосудистого протеза (Рисунок 6). Отсутствие изменений положения и интенсивности характеристических полос в ИК-спектре свидетельствовало о незначительном влиянии условий полимеризации (ионизирующего излучения) на структуру материала [11].

3.1.2 Количественная оценка высвобождения илопроста, присоединенного к поверхности матрикс методом комплексообразования

ИК-спектры матрикс ПКЛ/ПВП/Ил/А, содержащих илопрост и катионный амфифил, присоединенные к поверхности матрикс через ПВП методом комплексообразования и инкубированные от 1 до 90 суток в фосфатно-солевом буфере при 37°C , имели схожий вид и содержали набор полос, характерных для индивидуальных компонентов, входящих в состав матрикс (Таблица 2).

Таблица 2 – Отнесение полос характеристичных колебаний в образцах матриц с атромбогенным и противомикробным покрытием, инкубированных в фосфатно-солевом буфере

Частота, см⁻¹	Отнесение полос
3779	ОН – валентные колебания
3424	ОН – связанные водородной связью
2920	Валентные асимметричные колебания алифатических CH ₂ -групп
2860	Валентные симметричные колебания алифатических CH ₃ -групп
2100-2140	C≡C в алкинах
1724	C=O валентные колебания
1654	Карбонил амидной группы пирролидонового кольца
1571	CN – валентные колебания
1457	Деформационные колебания алифатических CH ₂ -групп
1366	CH ₃ – деформационные колебания
1237	Скелетные колебания связи C-C
1171	Колебание связи N-H
1047	C-O валентные колебания
830-725	(CH ₂) _x – маятниковое колебание
571	Валентные колебания связи C-Br

Для идентификации илопроста на поверхности матриц и в анализах, была выбрана характеристическая полоса в диапазоне 2100-2140 см⁻¹, соответствующая колебаниям связи C≡C в алкинах с максимумом при 2135 см⁻¹. Для сравнительной количественной оценки содержания илопроста на поверхности матриц в зависимости от периода их инкубации выполнен расчет площадей пика с максимумом при 2135 см⁻¹. Далее построена зависимость содержания илопроста на поверхности матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А и в фосфатно-солевом буфере от времени инкубации матриц в буфере (Рисунок 7).

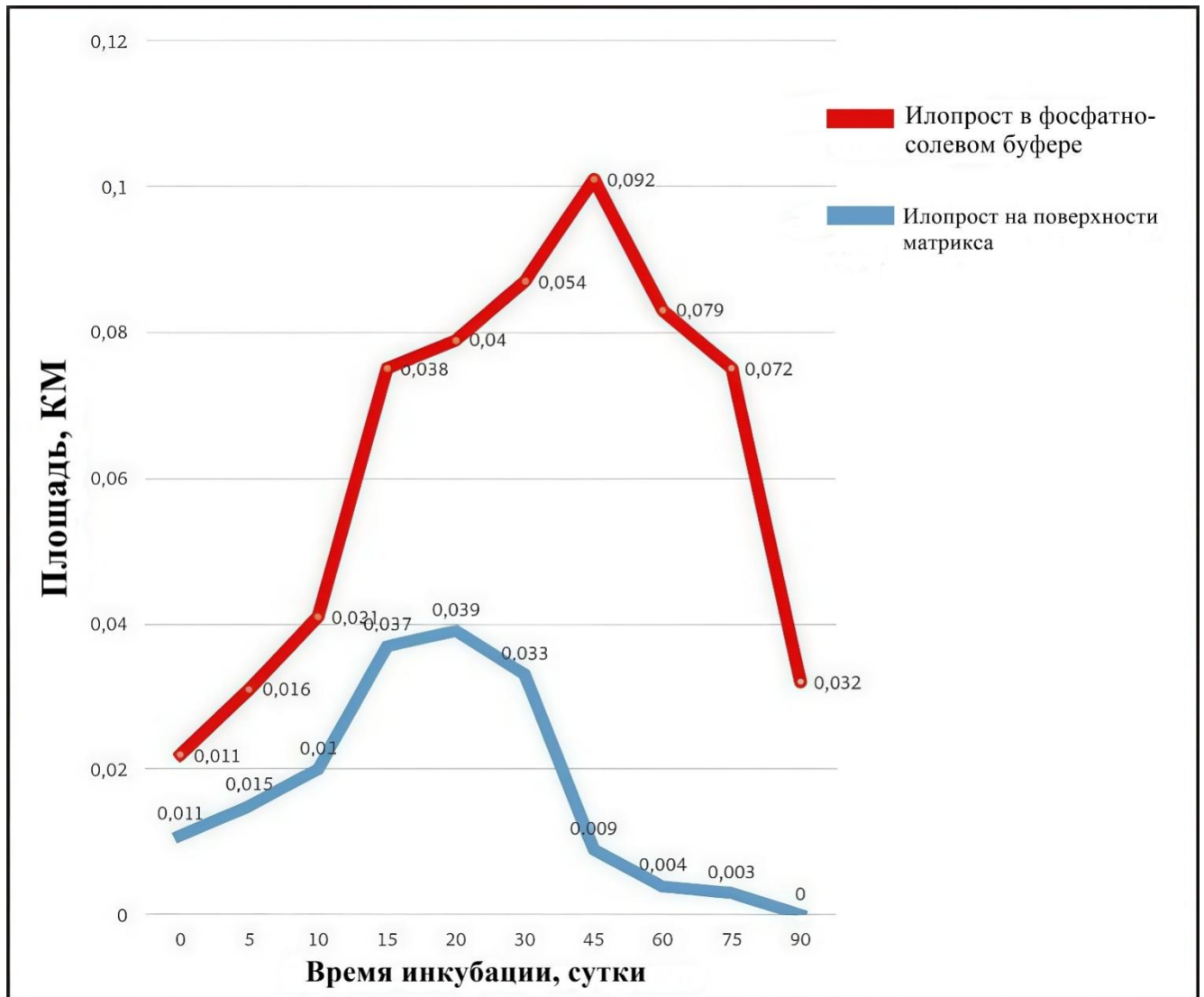


Рисунок 7 – Содержание илопроста на поверхности матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А и в фосфатно-солевом буфере в зависимости от срока инкубирования матриксов в буфере

Выявлено, что при увеличении времени инкубирования от 1 до 20 суток происходило плавное увеличение содержания илопроста на поверхности матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А, после чего наблюдался плавный спад и полное исчезновение сигнала к 90 суткам (Рисунок 7). Приблизительно такая же динамика имела место при определении высвободившегося илопроста в фосфатно-солевом буфере (Рисунок 7).

Для оценки количества высвобождаемого из биodeградируемого матрикса илопроста была рассчитана калибровочная кривая, основой которой стали различные концентрации раствора илопроста (Таблица 3).

Таблица 3 – Данные для построения калибровочной кривой для определения концентрации илопроста

№	Концентрация, мкг/мл	Площадь, КМ
1	0,10	0,010716
2	0,05	0,007415
3	0,03	0,005637
4	0,011	0,011957
5	0,02	0,021739
6	0,039	0,042391
7	0,06	0,065217
8	0,092	0,1
9	0,1	0,108695

Примечание: КМ – функция/единицы Кубелки-Мунка

В соответствии с калибровочной кривой (Таблица 3), пик выхода илопроста (0,092), обозначенный на рисунке 7, соответствует 0,1 мкг/мл.

3.1.3 Оценка присутствия катионного амфифила на поверхности биodeградируемых матриксов и интенсивности его высвобождения

Детекцию катионного амфифила на поверхности матриксов проводили с помощью электронно-зондового микроанализа и масс-спектрометрии.

Аморфный катионный амфифил, не присоединенный к поверхности матриксов, имел характерный пик Вг на 1,5 кэВ и менее выраженный на 12 кэВ (С norm. [wt.%] – 89,15) (Рисунок 8).

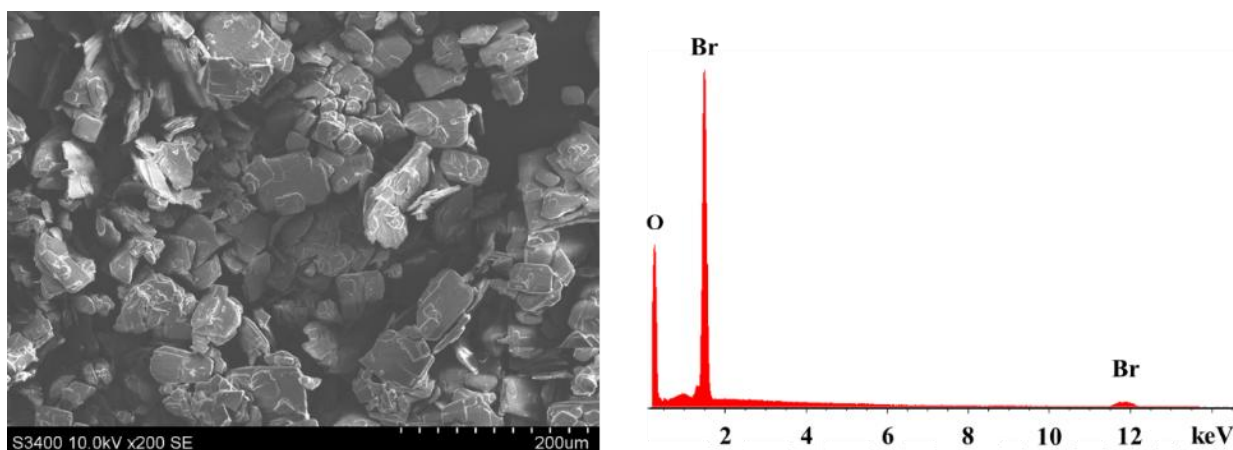


Рисунок 8 – Характерный спектр аморфного катионного амфифила, полученный методом электронно-зондового микроанализа

По результатам электронно-зондового микроанализа образцов ПКЛ/А (ковалентная сшивка) наличие брома (Br) на поверхности матриксов подтвердило присутствие катионного амфифила (Рисунок 9, Таблица 4).

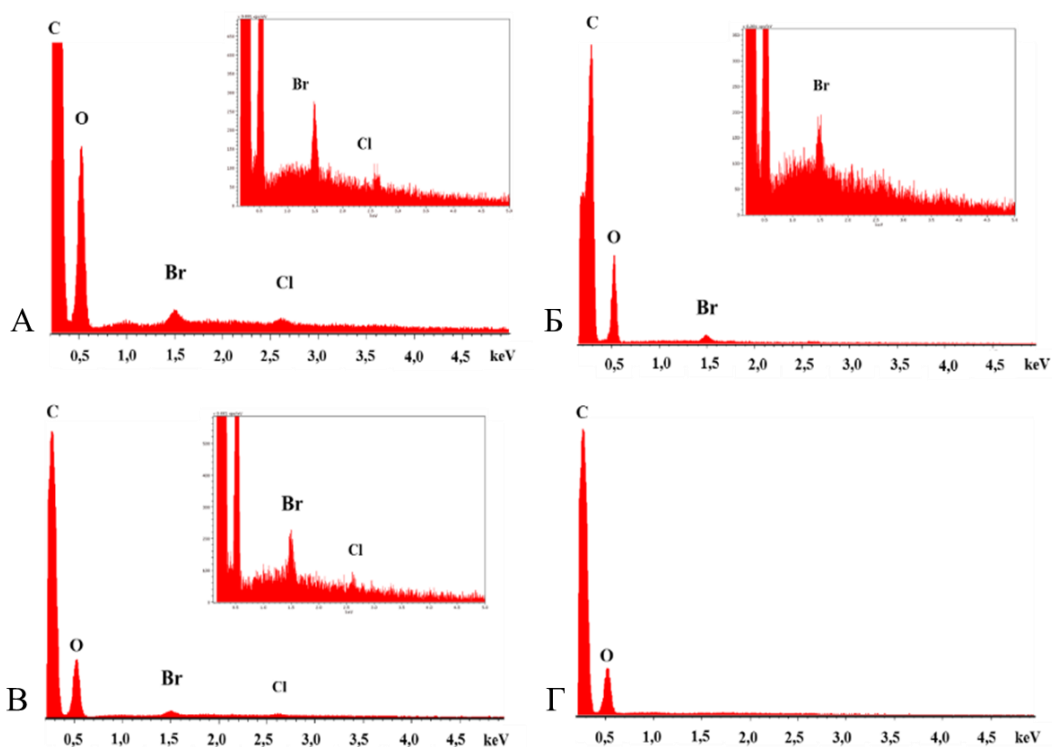


Рисунок 9 – Спектры матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка): А – после суток хранения при 5°C без раствора; В – после суток хранения при -20°C без раствора; С – после 6 месяцев хранения при -20°C без раствора; Д – через 6 часов инкубирования в фосфатно-солевом буфере + 0,05% Твин 20 при 37°C

Присутствие амфифила, основанное на наличии брома, доказано при условии сухого хранения матриксов: при -20°C и 5°C в течение суток, спустя 6 месяцев при -20°C (Рисунок 9, Таблица 4). Однако уже после 6 часов экспозиции данных матриксов в растворе фосфатно-солевого буфера + 0,05% Твин 20 при 37°C бром не определялся (Рисунок 9, Таблица 4).

Таблица 4 – Элементный состав матриксов из поликапролактона с катионным амфифилом (ковалентная сшивка)

Срок экспозиции	T, °C	Условия эксперимента	Br [wt.%]	O [wt.%]	Na [wt.%]	Cl [wt.%]
1 сутки	5	без раствора	11,31	85,54	0,0	3,15
1 сутки	-20	без раствора	8,2	91,8	0,0	0,0
6 месяцев	-20	без раствора	6,75	88,36	2,79	2,1
6 часов	37	в растворе ФСБ + 0,05% Твин 20	0,08	93,68	4,43	1,81
1 сутки	37	в растворе ФСБ + 0,05% Твин 20	0,0	94,23	4,77	1,0

По результатам элементного анализа можно предположить, что практически все ионы брома переходят в раствор в течение первых нескольких часов. Данный эффект можно связать с образованием фосфатной формы амфифила за счет высокого сродства фосфат-иона к бис-четвертичной соли 1,4-диазабициклооктана, обусловленного их геометрией [185].

Хромато-масс-спектрометрический анализ образцов фосфатно-солевого буфера, в котором проводили экспозицию матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка) в течение 1 суток, не выявил наличия катионного амфифила. В масс-спектрах образцов фосфатно-солевого буфера, которые были получены непосредственно без применения хроматографического разделения, также отсутствовали пики, которые можно было бы отнести как к молекулярному иону $\text{C}_{41}\text{H}_{84}\text{Br}_3\text{N}_4^+$ (m/z : 871,42256), так и молекулярному иону амфифила с фосфатом в качестве противоиона (Рисунок 10).

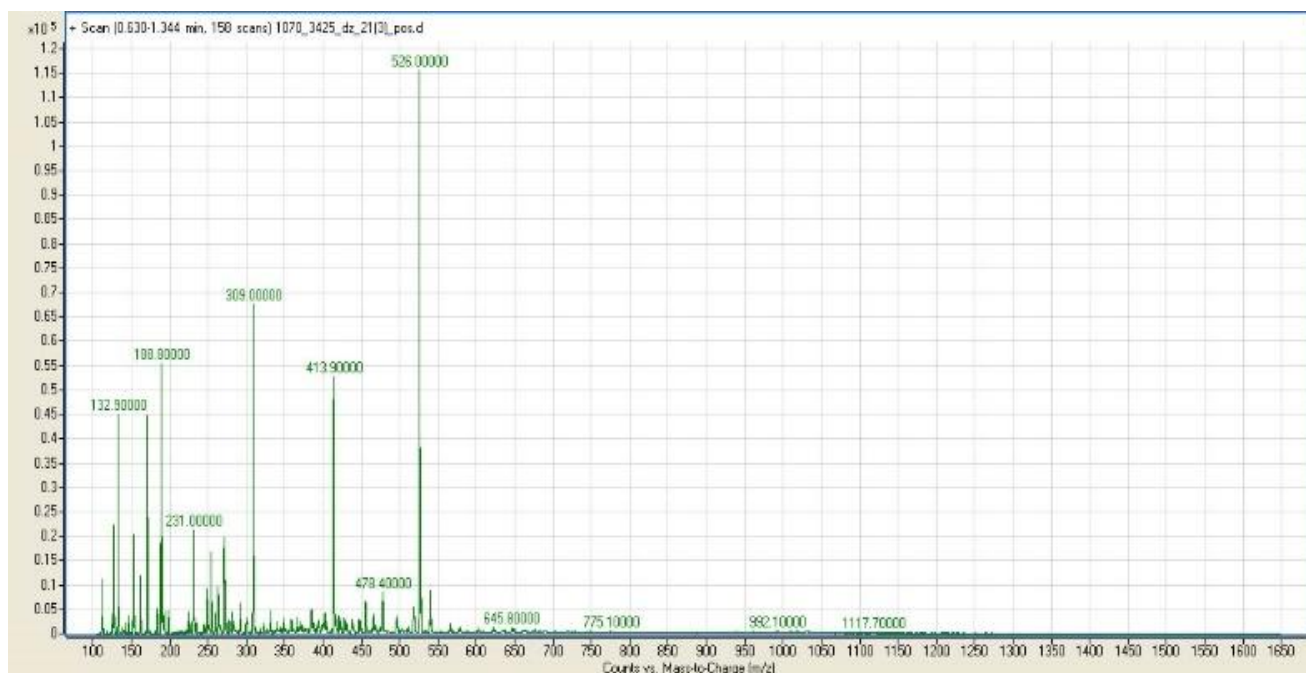


Рисунок 10 – Масс-спектры фосфатно-солевого буфера после 1 суток инкубации в нем матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка)

С учетом низкой растворимости катионного амфифила в воде, можно предположить, что амфифил не переходит в фосфатный буфер.

Для подтверждения данного предположения образец полимерного материала, выдержанный в фосфатном буфере в течение 1 суток, затем был выдержан в 1 мл метилового спирта при 40°C в течение 6 часов, после чего полученный раствор проанализирован с помощью масс-спектрометрии. В анализе пик, соответствующий молекулярному иону $C_{41}H_{84}Br_3N_4^+$ m/z : 871,42256, также отсутствовал, однако выявлены пики, соответствовавшие его фосфатным солям (Рисунок 11), образовавшимся в результате ионного обмена в присутствии фосфатного буфера (Рисунок 12).

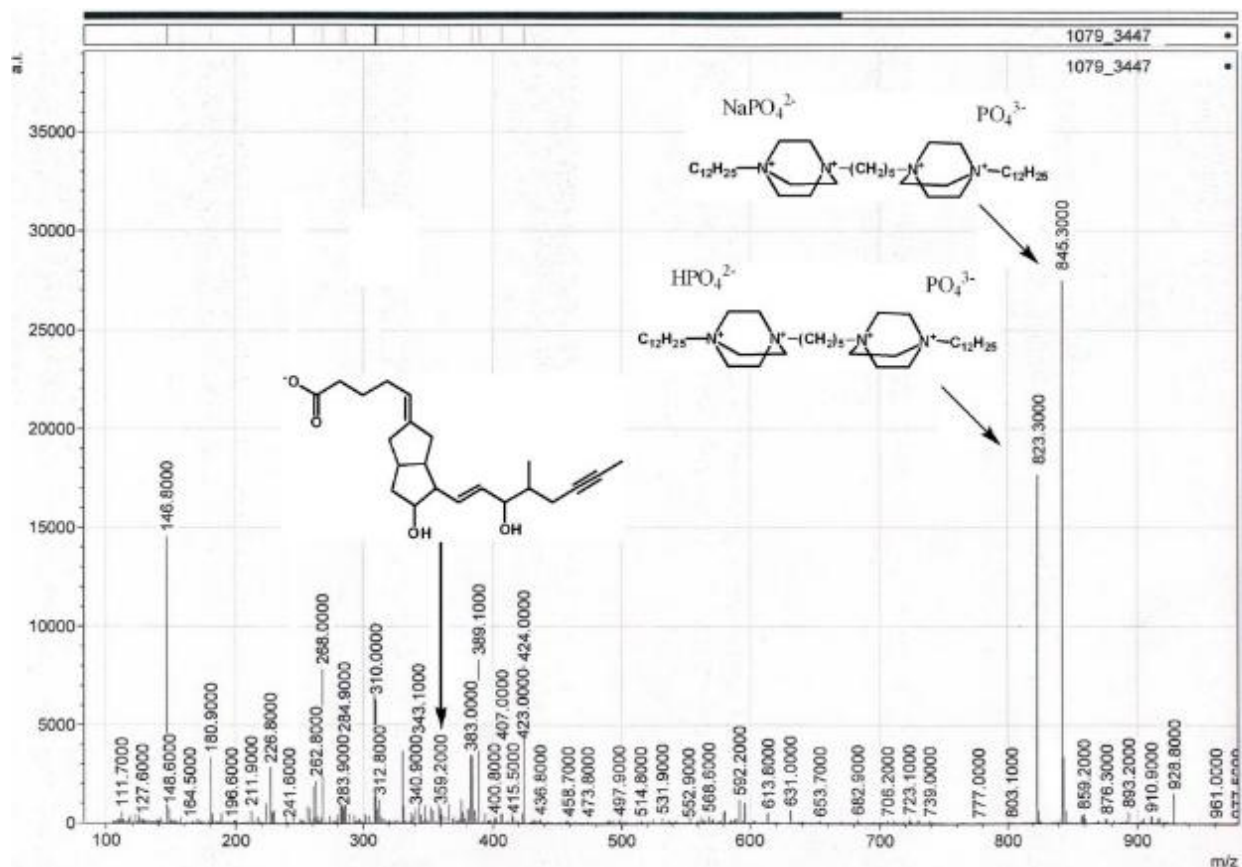


Рисунок 11 – Масс-спектр аналита, полученного путем обработки матрикса ПКЛ/А (ковалентная сшивка) метиловым спиртом

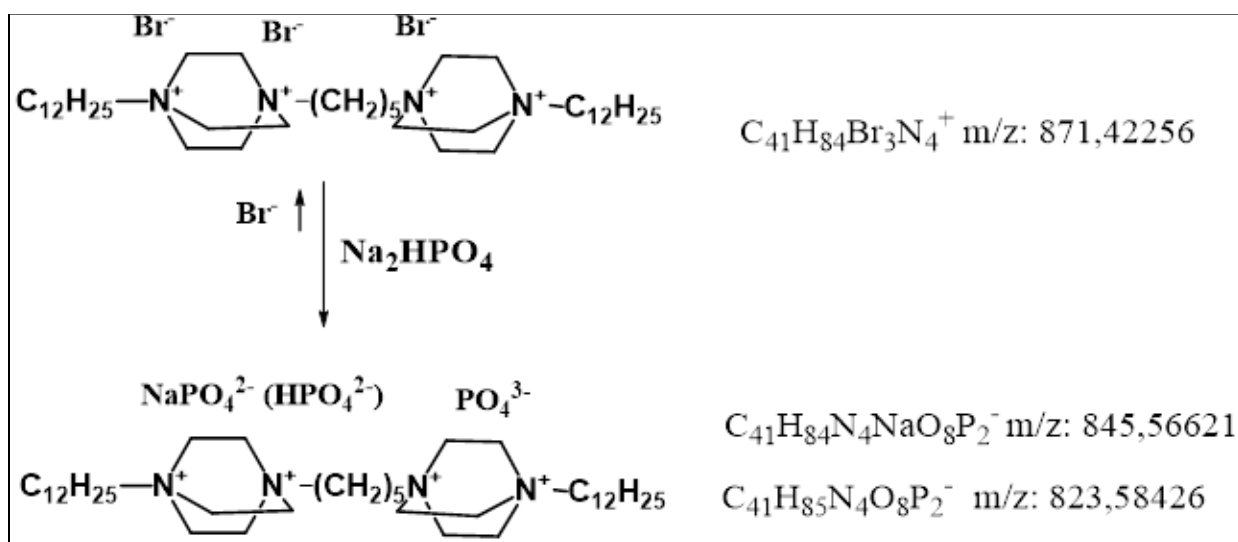


Рисунок 12 – Химические формулы катионного амфифила в результате ионного обмена, произошедшего после инкубации матриксов с амфифилом в фосфатно-солевом буфере

Таким образом, доказано, что в жидкой среде катионный амфифил остается на поверхности полимерного матрикса ПКЛ/А (ковалентная сшивка). Поскольку в соответствии с предполагаемым механизмом действия (разрушение бактериальных мембран, разрушение бактериальной РНК), антибактериальная активность не зависит от строения катиона, можно предположить, что и антибактериальные свойства полимерного матрикса ПКЛ/А (ковалентная сшивка) будут сохраняться на протяжении всего периода его существования.

Аналогичным образом был изучен спектр образцов ПКЛ/ПВП/Ил/А, модифицированных илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл и катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл методом комплексообразования с использованием ионизирующего излучения для сшивки ПВП дозой 10 кГр. Отмечено присутствие в составе образцов Na и Cl, которые входили в состав отмывочного раствора. Количество Br на поверхности матриксов меньше, чем при ковалентной сшивке: пики менее выраженные вне зависимости от способа хранения (Рисунок 13, Таблица 5). После 6 часов отмывки данных матриксов в растворе фосфатно-солевого буфера + 0,05% Твин 20 при 37°C Br также не определялся в силу ионного обмена и формирования фосфатных солей амфифила.

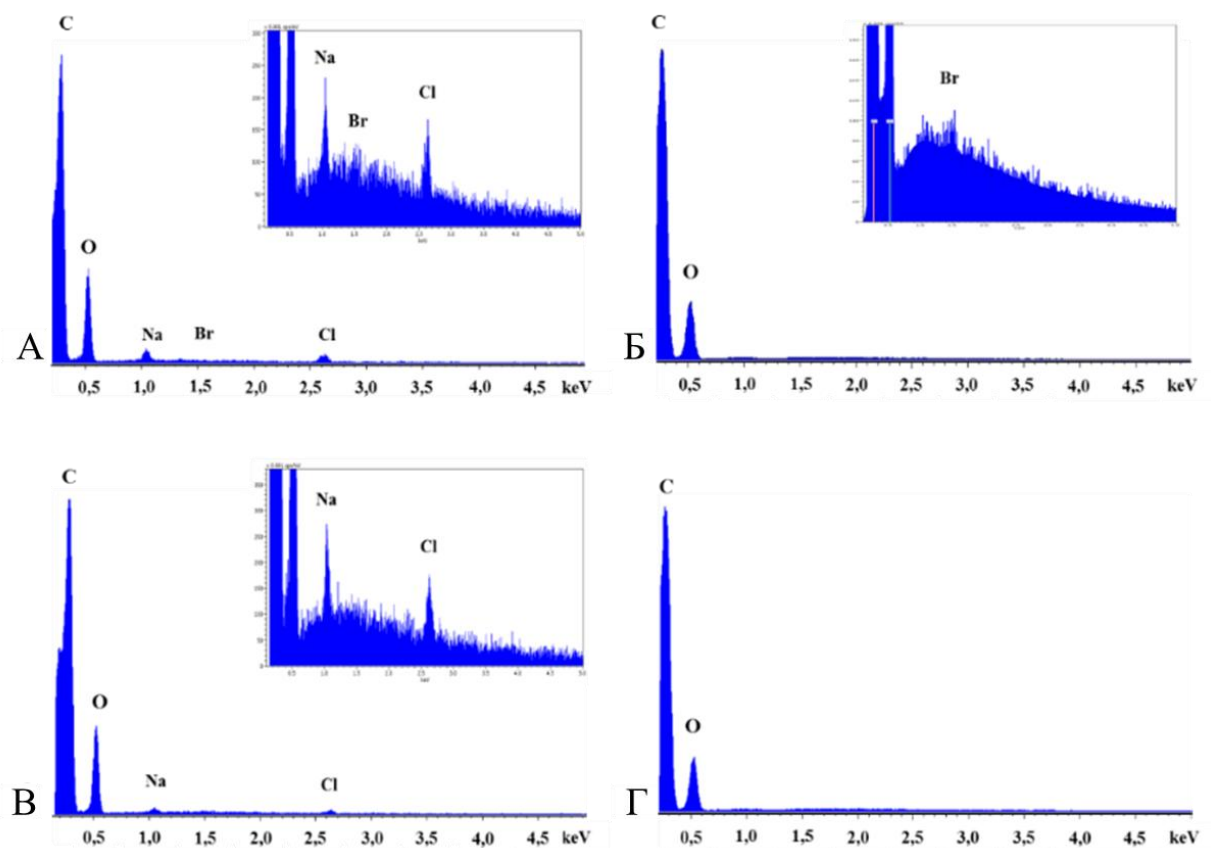


Рисунок 13 – Спектры матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10кГр): А – после суток хранения при 5°C без раствора; Б – после суток хранения при -20°C без раствора; В – после 6 месяцев хранения при -20°C без раствора; Г – через 6 часов инкубирования в фосфатно-солевом буфере + 0,05% Твин 20 при 37°C

Таблица 5 – Элементный состав матриц с атромбогенным и противомикробным покрытием (концентрация катионного амфифила – 0,25 мг/мл; доза облучения матриц (10 кГр)

Срок экспозиции	Т, °С	Условия эксперимента	Br [wt.%]	O [wt.%]	Na [wt.%]	Cl [wt.%]
1 сутки	5	без раствора	2,84	97,16	0,0	0,0
1 сутки	-20	без раствора	2,75	97,25	0,0	0,0
6 месяцев	-20	без раствора	1,39	93,62	3,82	1,17
6 часов	37	в растворе ФСБ + 0,05% Твин 20	0,09	92,99	4,43	2,49
1 сутки	37	в растворе ФСБ + 0,05% Твин 20	0,0	100,0	0,0	0,0

3.2 Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых матриц в зависимости от варианта поверхностного модифицирования

При проведении сканирующей электронной микроскопии ПКЛ-матриц до и после присоединения лекарственных препаратов методом комплексообразования и ковалентной сшивки выявлено, что внутренняя поверхность матриц до формирования лекарственного покрытия состояла из полимерных волокон толщиной от 296 до 615 нм (Рисунок 14). Размер пор колебался от 5,69 до 7,02 мкм (Рисунок 14). Таким образом, размер пор и толщина нитей полимерного волокна, полученные в процессе электроспиннинга, достаточны для сиддинга клеток на поверхности изготовленных полимерных матриц.

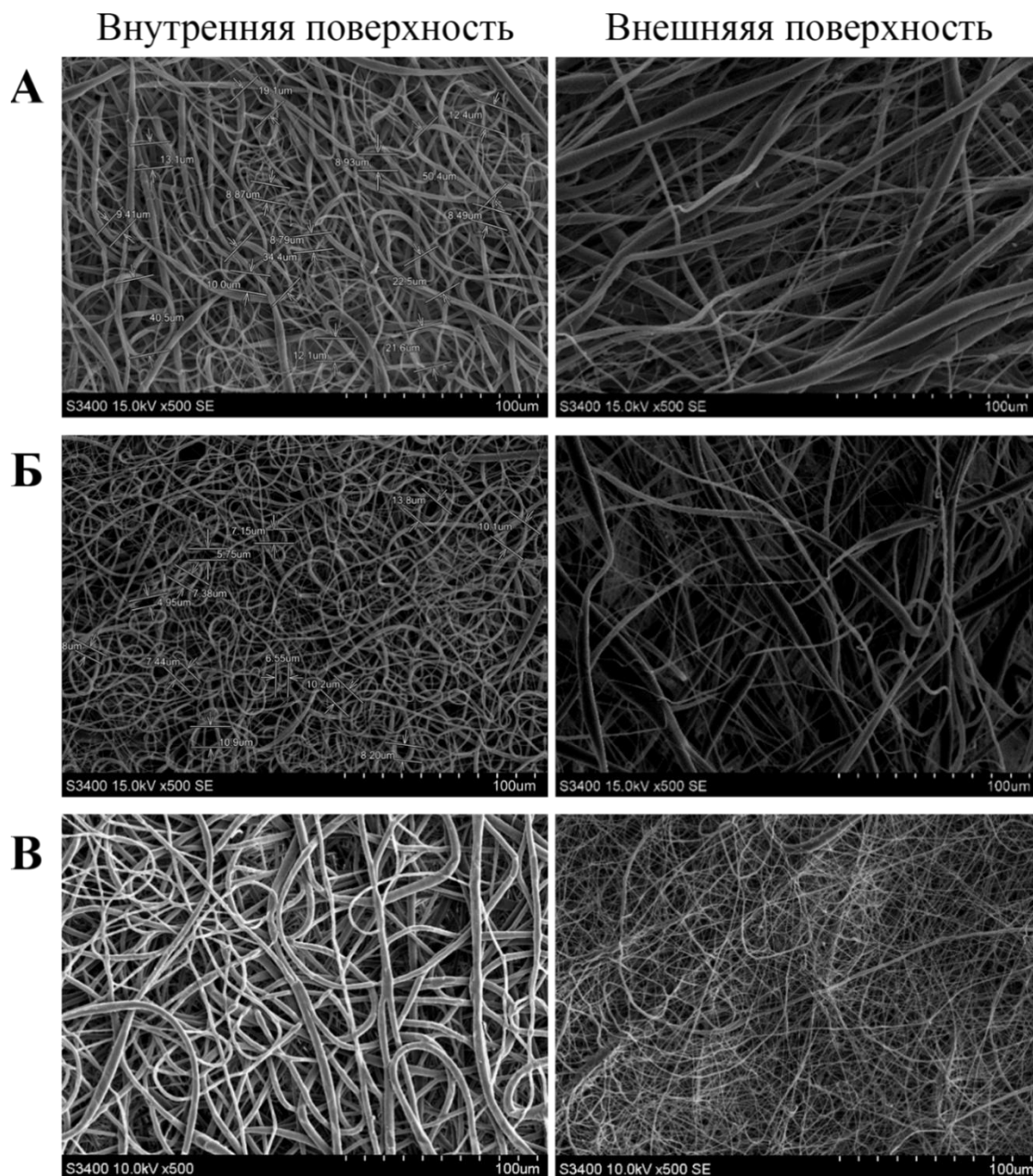


Рисунок 14 – Сканирующая электронная микроскопия поверхности ПКЛ-матриков: А – до формирования лекарственного покрытия, ув. $\times 500$; Б – после комплексообразования, ув. $\times 500$; В – после ковалентной сшивки, ув. $\times 500$

Внешняя поверхность матриков до формирования лекарственного покрытия представлена хаотично переплетенными полимерными волокнами толщиной от 284 нм до 1,10 мкм, переплетение, которых формировало поры – от 2,7 до 8,47 мкм (Рисунок 14 А).

После формирования гидрогелевого ПВП-покрытия, выполнения полимеризации посредством ионизирующего излучения, отмывки остатков неполимеризованного ПВП и присоединения илопроста и катионного амфифила методом комплексообразования изменения структуры поверхности матриксов не выявлено (Рисунок 14 Б). Таким образом, гидрогелевое покрытие покрывает лишь поверхность полимерных нитей и не закупоривает поры стенки матриксов, что сохранит в дальнейшем возможность клеточной миграции в толщу матриксов и сиддинга.

При присоединении катионного амфифила к поверхности биodeградируемых матриксов методом ковалентной сшивки также не было отмечено изменений в структуре поверхности, изменений в структуре волокон и величине пор (Рисунок 14 В). Таким образом, вне зависимости от метода присоединения лекарственного покрытия, изначальная архетиктоника матриксов не претерпела кардинальных структурных изменений, способных повлиять на дальнейшее взаимодействие с клетками организма.

3.3 Физико-механические характеристики биodeградируемых матриксов в зависимости от вариантов поверхностного модифицирования

Физико-механические характеристики биodeградируемых матриксов изучены на всех этапах приведения к окончательному варианту поверхностного модифицирования. В качестве контроля выбрана сонная артерия овцы в связи с последующим выполнением преклинических испытаний сосудистых протезов на модели овцы.

Выявлено, что модификация поверхности ПКЛ-матриксов катионным амфифилом методом ковалентной сшивки снизила предел прочности в 1,5 раза, при этом сохранив превосходство по данному показателю относительно сонной артерии овцы ($p < 0,05$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Физико-механические свойства биodeградируемых матриц

Вид образца	n	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
		Me (Q1-Q3)		
Сонная артерия овцы	14	1,2 (1,06-1,9)	158,5 (126,0-169,5)	0,49 (0,39-0,66)
ПКЛ	14	5,84 ^{***} (5,56-6,13)	1391,0 ^{***} (1350,0-1413,0)	9,33 ^{***} (9,23-9,55)
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	7	3,91 ^{*/**} (3,72-4,05)	1273,0 ^{*/**} (1192,0-1376,0)	9,22 ^{**/#} (8,84-9,45)
ПКЛ/ПВП (10 кГр)	7	3,56 ^{*/**} (3,51-3,7)	1297,0 ^{*/**} (1258,0-1342,0)	10,66 ^{*/**/α} (10,37-11,01)
ПКЛ/ПВП (15 кГр)	7	3,75 ^{*/**} (3,48-4,01)	1183,0 ^{*/**} (1157,0-1215,0)	12,86 ^{*/**/α} (11,86-14,06)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	7	3,77 ^{*/**} (3,66-3,87)	1421,0 ^{**/#/α} (1380,0-1467,0)	9,54 ^{**/#} (9,43-9,76)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр)	7	3,75 ^{*/**} (3,61-4,0)	1427,0 ^{**/#/α} (1381,0-1440,0)	9,7 ^{**/#} (9,53-10,36)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр)	7	3,72 ^{*/**} (3,54-3,91)	1408,0 ^{**/#/α} (1344,0-1458,0)	9,83 ^{**/#} (8,99-10,22)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	7	4,02 ^{*/**} (3,8-4,18)	1454,0 ^{*/**/#/α} (1433,0-1458,0)	10,15 ^{*/**/#/α} (9,82-10,57)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр)	7	3,79 ^{*/**} (3,44-3,97)	1433,0 ^{**/#/α} (1368,0-1449,0)	9,87 ^{**/#} (9,16-9,99)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр)	7	3,93 ^{*/**} (3,88-3,96)	1437,0 ^{*/**/#/α} (1427,0-1443,0)	10,18 ^{*/**/#/α} (9,6-10,81)

Примечание: *-p<0,05 относительно ПКЛ; **-p<0,05 относительно сонной артерии овцы; #-p<0,05 относительно ПКЛ/ПВП облучение 15 кГр; α-p<0,05 относительно ПКЛ/А (ПКЛ – поликапролактон; ПВП – поливинилпирролидон; Ил – илопрост; А – катионный амфифил)

Полимеризация поверхности протезов с ПВП посредством ионизирующего излучения общей поглощенной дозой 10 и 15 кГр привела к аналогичному

эффекту, как и ковалентная сшивка с амфифилом – показатель прочности снизился более чем в 1,5 раза ($p < 0,05$). Последующая модификация методом комплексообразования с присоединением амфифила в разных концентрациях и илопроста не повлияла на показатель прочности матриксов [11]. Модуль Юнга, несколько повысившись на этапе полимеризации ПВП, снизился до исходного уровня, свойственного немодифицированным трубчатым каркасам. Также отсутствовали достоверные отличия между матриксами, модифицированными посредством ковалентной сшивки и комплексообразования, что подтвердило отсутствие пагубного влияния выбранных технологий поверхностного модифицирования на физико-механические свойства матриксов (Таблица 6). Относительное удлинение матриксов вне зависимости от вида модификации более чем в 7,5 раз превышало данный показатель интактной сонной артерии овцы, что указывает на принципиальное отличие искусственного полимерного материала от нативного ($p < 0,05$, Таблица 6). При этом основной процент удлинения полимерных матриксов происходил в области пластической (необратимой) деформации, и достигалась данная деформация при нагрузке, превышающей естественные нагрузки, которые может испытывать материал при функционировании в организме. Дополнительные модификации не отразились на способности матриксов к удлинению.

3.4 Краевые углы смачиваемости

Процесс полимеризации ПВП к поверхности ПКЛ с последующим присоединением илопроста и амфифила методом комплексообразования не приводил к достоверному увеличению гидрофилизации данных матриксов (Таблица 7).

Модифицирование поверхности ПКЛ-матриксов катионным амфифилом методом ковалентной сшивки приводило к незначительной гидрофилизации – 7% (Таблица 7).

Таблица 7 – Влияние модифицирования поверхностей биodeградируемых матриц на их смачиваемость водой

Вид матрикса	$\theta \pm \sigma, ^\circ$
ПКЛ	36 $\pm$ 2
ПКЛ/ПВП (10 кГр)	40 $\pm$ 3
ПКЛ/ПВП (15 кГр)	33 $\pm$ 3
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр)	31 $\pm$ 2
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр)	36 $\pm$ 1
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр)	33 $\pm$ 2
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр)	37 $\pm$ 2
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	35 $\pm$ 2
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	30 $\pm$ 2
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	41 $\pm$ 1

Примечание: ПКЛ – поликапролактон; ПВП – поливинилпирролидон; Ил – илопрост; А – катионный амфифил

Таким образом, поверхность всех исследованных матриц вне зависимости от наличия, отсутствия и вида поверхностной модификации была гидрофильной – краевые углы смачиваемости не имели достоверных различий.

3.5 Результаты оценки гемосовместимости биodeградируемых матриц

3.5.1 Гемолиз эритроцитов

При изучении гемолиза эритроцитов после контакта с поверхностью модифицированных и немодифицированных ПКЛ-матриц ориентировались на допустимый уровень гемолиза эритроцитов – 2,0% [11]. Выявлено, что в 100,0% случаев эритроциты подвергались гемолизу после контакта с поверхностью матриц ПКЛ/А (ковалентная сшивка), в 32,82% – после контакта с поверхностью матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр), 35,35% случаев – после контакта с матрицами ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр) (Таблица 8). Гемолиз эритроцитов при контакте с матрицами ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр) и ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр) также превысил допустимые 2,0% (Таблица 8). Гемолиз эритроцитов при контакте со всеми остальными разновидностями матриц не превышал 0,704% (Таблица 8).

Таблица 8 – Гемолиз эритроцитов при контакте с поверхностью матриксов из поликапролактона до и после поверхностного модифицирования

Вид образца	Степень гемолиза эритроцитов, % Me (Q1-Q3)
ПКЛ	0,504 (0,0-1,01)
ПКЛ/ПВП (10 кГр)	0,2 (0,0-0,5)
ПКЛ/ПВП (15 кГр)	0,704 (0,5-1,01)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	0,504 (0,0-1,01)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр)	2,5* (1,8-3,2)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр)	32,82* (25,25-40,4)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	0,404 (0,0-1,01)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр)	2,8* (2,0-4,2)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр)	35,35* (26,8-44,4)
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	100,0* (100,0-100,0)

Примечание: * $p < 0,05$ относительно показателей матрикса ПКЛ (ПКЛ – поликапролактон; ПВП – поливинилпирролидон; Ил – илопрост; А – катионный амфифил)

Способность катионных амфифилов вызывать гемолиз эритроцитов была описана ранее [12]. В данном исследовании использование катионных амфифилов в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл для поверхностного модифицирования ПКЛ-матриксов методом комплексообразования и в количестве $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см² для модифицирования ПКЛ-матриксов методом ковалентной сшивки спровоцировало гемолиз эритроцитов до уровня, превысившего допустимую норму 2,0%. Полученные результаты ставят под сомнение возможность использования данных концентраций амфифилов для модифицирования полимерных матриксов, предназначенных для контактирования с кровью в случае клинического использования.

3.5.2 Адгезия тромбоцитов

На поверхности немодифицированных ПКЛ-матриксов преобладали тромбоциты II и III типа (Таблица 9).

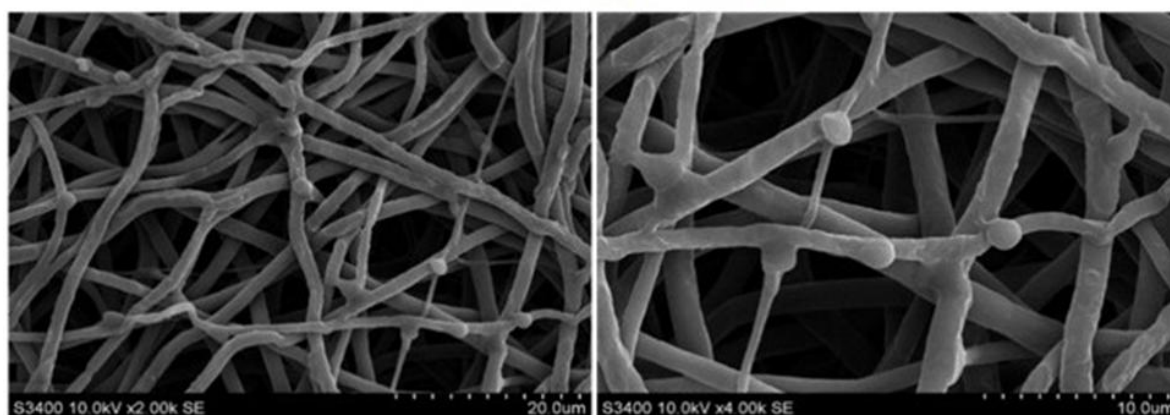
Таблица 9 – Показатели адгезии тромбоцитов после контакта с полимерными матриксами в зависимости от варианта поверхностного модифицирования

Вид образца	Тип деформации тромбоцита, %					Количество тромбоцитов на 1 мм ² Ме (Q1-Q3)	Индекс деформации Ме (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 (0-1445,0)	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)

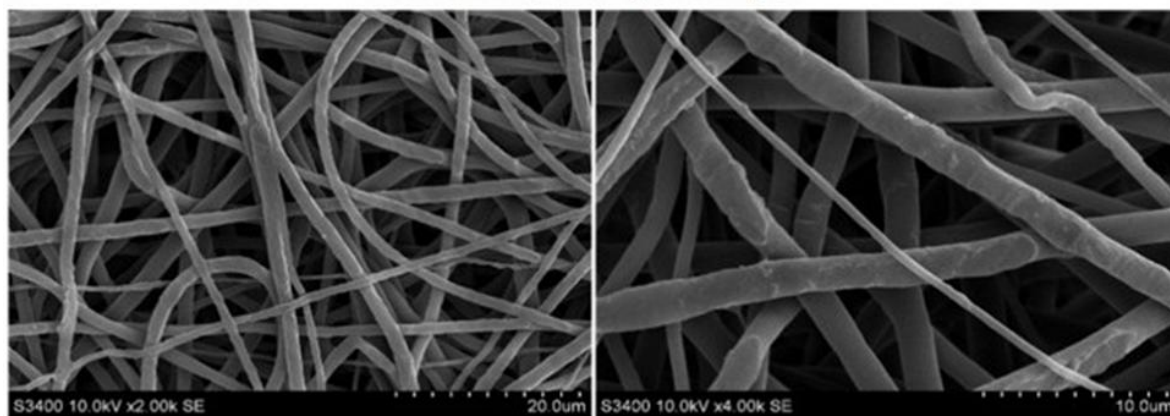
Примечание: *-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ; **-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ/ПВП (10 кГр); ***-p<0,05 относительно показателей матрикса ПКЛ/ПВП (15 кГр); #-p<0,05 относительно ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр), ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр) и ПКЛ/А ковалентная сшивка; α-p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

После полимеризации поверхности ПКЛ-матриков ПВП с применением облучения в дозе 10 кГр не отмечено изменений степени адгезии тромбоцитов относительно немодифицированных ПКЛ-матриков [11]. При использовании для полимеризации ПВП дозы облучения в 15 кГр выявлено снижение количества адгезированных на поверхности тромбоцитов относительно немодифицированных образцов. Однако преобладание тромбоцитов IV типа привело к отсутствию достоверных различий по индексу деформации между данными видами образцов (Таблица 9, Рисунок 15).

ПКЛ/ПВП (10 кГр)



ПКЛ/ПВП (15 кГр)



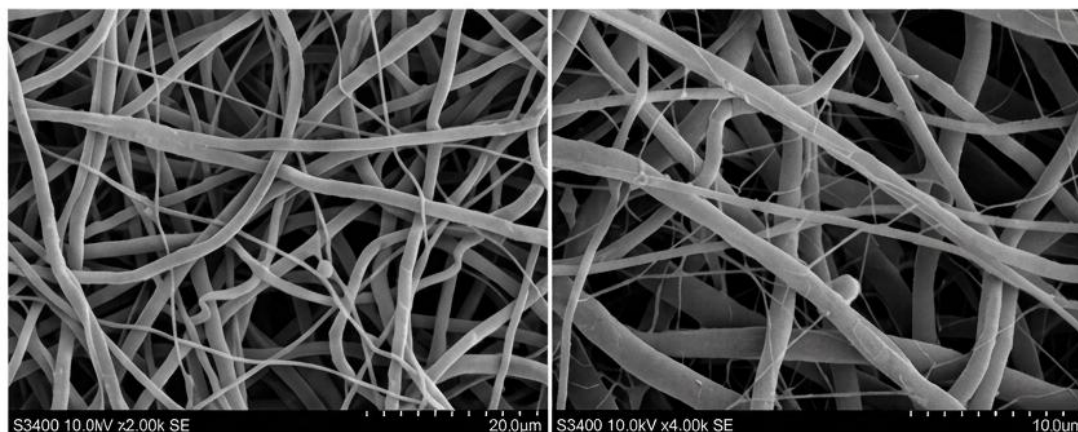
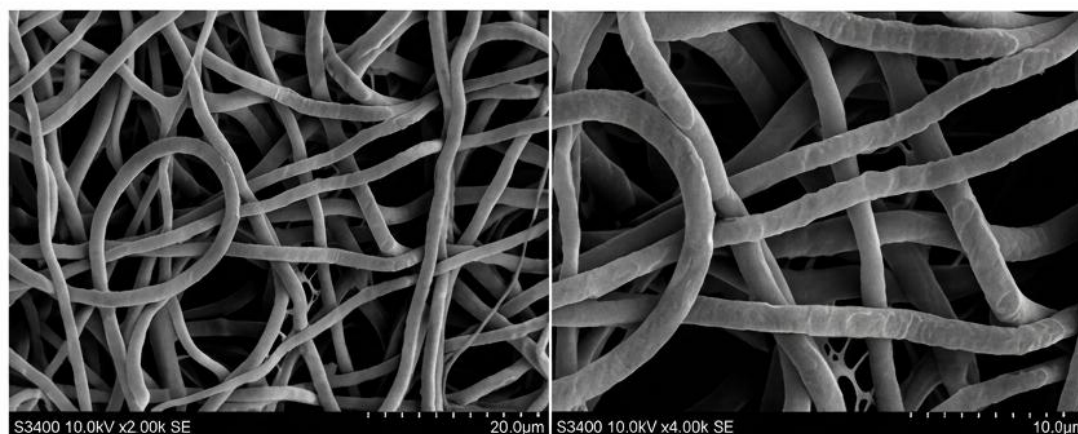
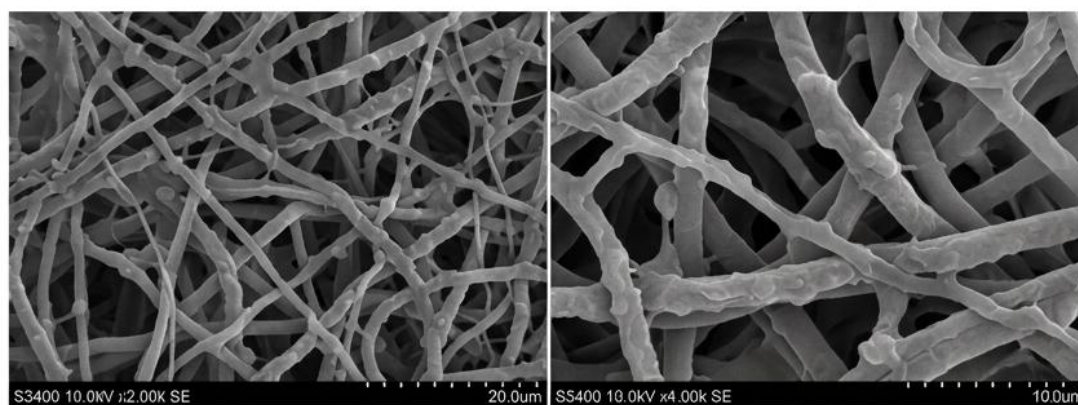
А

Б

Примечание: А – увеличение×2000; Б – увеличение×4000

Рисунок 15 – Поверхность матриков ПКЛ/ПВП (10 кГр) и ПКЛ/ПВП (15 кГр) после контакта с плазмой, богатой тромбоцитами

При анализе поверхности матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А выявлена прямая зависимость степени адгезии тромбоцитов от концентрации катионного амфифила. При этом доза облучения не оказывала достоверного влияния на адгезию тромбоцитов. С увеличением концентрации амфифила наблюдали повышение показателей степени адгезии тромбоцитов. Максимум данных проявлений зафиксирован при использовании катионного амфифила в концентрации 1,0 мг/мл, что с достоверным повышением уровня деформации до уровня III и IV типа (таблица 9, Рисунок 16).

ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл**ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл****ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл**

А

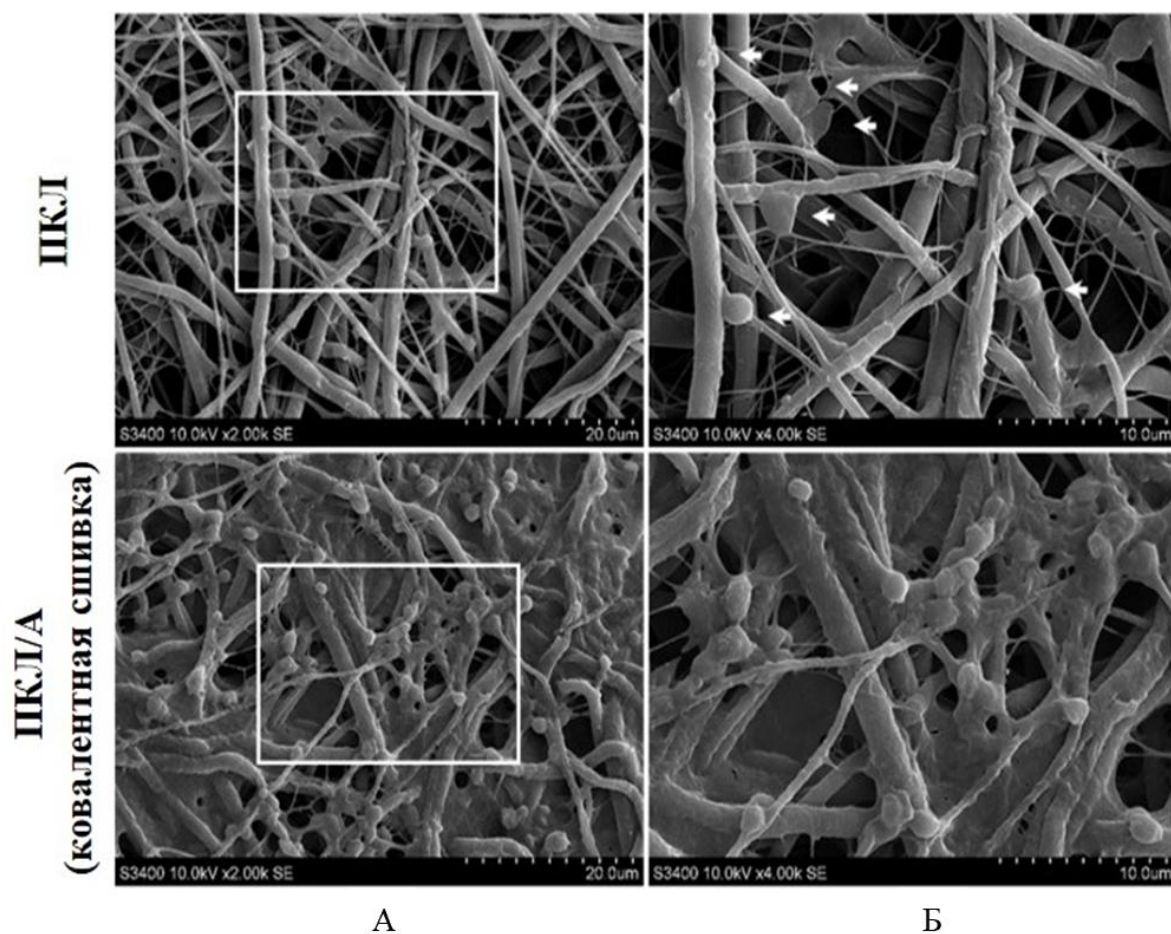
Б

Примечание: А – увеличение×2000; Б – увеличение×4000

Рисунок 16 – Типичная картина поверхности матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А с различными концентрациями катионного амфифила, присоединенного методом комплексообразования (вне зависимости от дозы облучения 10 и 15 кГр для полимеризации ПВП) после контакта с богатой тромбоцитами плазмой

Использование катионного амфифила в концентрации 0,5 мл/мл хоть и не приводило к значимому увеличению количества тромбоцитов на 1 мм^2 , но способствовало их деформации и превалированию тромбоцитов III и IV типа (Таблица 9). При концентрации амфифила 0,25 мг/мл тромбоциты на поверхности матриксов были преимущественно II типа (до 62,5% от общего количества). Режим облучения не оказывал влияния на изменение оцениваемых показателей.

Поверхностное модифицирование ПКЛ-матриксов катионным амфифилом посредством ковалентной сшивки оказало негативное воздействие на показатели адгезии тромбоцитов: отмечено повышение всех показателей: количество адгезированных тромбоцитов на 1 мм^2 увеличилось в 8,8 раз относительно немодифицированного ПКЛ-матрикса, индекс деформации увеличился в 1,3 раза за счет превалирования тромбоцитов III-V типа, на которые пришлось 95,6% (Таблица 9, Рисунок 17). Помимо тромбоцитов на поверхности матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка) отмечено присутствие белковой фракции, вероятнее всего участвующей в формировании тромба (фибрин).



Примечание: А – увеличение×2000; Б – увеличение×4000

Рисунок 17 – Поверхность матриц ПКЛ и ПКЛ/А (ковалентная сшивка) после контакта с богатой тромбоцитами плазмой

Таким образом, по количеству и соотношению типов тромбоцитов, выявленных на поверхности матриц, а также по индексу деформации тромбоцитов, матрицы ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл вне зависимости от использованного режима ионизирующего облучения были максимально устойчивы к адгезии тромбоцитов и не провоцировали их деформацию.

3.5.3 Агрегация тромбоцитов

Изучение агрегационной активности тромбоцитов выявило статистически значимые отличия между интактной ОТП и всеми исследуемыми группами матриц (Таблица 10), [11].

Так, максимум агрегации тромбоцитов при контакте тромбоцитов с поверхностью немодифицированного ПКЛ-матрикса в 1,2 раза превысил значения интактной ОТП ($p<0,05$) [11]. Полимеризация поверхности матриксов с ПВП под воздействием ионизирующего излучения в 10 и 15 кГр достоверно не влияла на агрегацию тромбоцитов (Таблица 10), [11].

Таблица 10 – Максимум агрегации тромбоцитов после контакта с поверхностью биodeградируемых матриксов

Вид образца	Максимум агрегации тромбоцитов, % Me (Q1-Q3)
ПКЛ	87,23* (83,27-89,35)
ПКЛ/ПВП (10 кГр)	83,51* (82,68-86,60)
ПКЛ/ПВП (15 кГр)	90,12* (82,57-90,60)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	10,86*/** (9,04-11,39)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (10 кГр)	8,89*/** (8,85-8,99)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (10 кГр)	15,24*/** (14,10-16,21)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	10,70*/** (10,38-17,23)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,5 мг/мл (15 кГр)	10,01*/** (9,69-10,42)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 1,0 мг/мл (15 кГр)	16,35*/** (14,00-18,08)
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	83,84* (80,01-84,23)
Интактная ОТП	74,65 (72,45-75,31)

Примечание: *- $p<0,05$ относительно интактной ОТП (ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма); **- $p<0,05$ относительно немодифицированных ПКЛ-матриксов

Не обнаружено достоверного влияния и дозы облучения на агрегацию тромбоцитов. Однако дальнейшая модификация илопростом и катионным амфифилом методом комплексообразования в 4,5-8 раз в зависимости от концентрации использованного амфифила снизила агрегацию тромбоцитов по сравнению с результатами интактной ОТП ($p<0,05$). Такое значимое снижение

агрегации тромбоцитов, по-видимому, связано с действием илопроста [11]. Об этом свидетельствует и тот факт, что показатели агрегации тромбоцитов к поверхности матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка) достоверно не отличались от показателей немодифицированных ПКЛ-матриксов. Таким образом, присутствие амфифила не снижает агрегацию тромбоцитов. Определение влияния концентрации амфифила (0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл) на агрегацию тромбоцитов также показало отсутствие закономерностей между концентрацией амфифила и агрегацией тромбоцитов, хотя при концентрации амфифила 1 мг/мл наблюдалась тенденция к повышению максимума агрегации тромбоцитов (Таблица 10).

3.6 Результаты изучения матриксных свойств полимерных образцов в зависимости от вариантов поверхностного модифицирования

3.6.1 Скрининг цитотоксичности матриксов в режиме реального времени

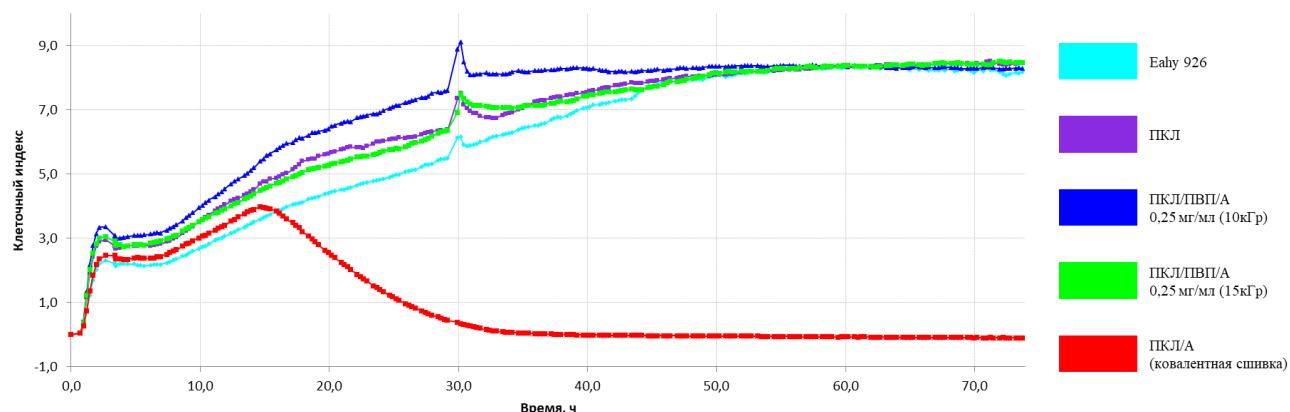
С учетом результатов гемосовместимости и в целях оценки цитотоксического влияния каждого отдельно взятого лекарственного компонента, входящего в состав конечного варианта биodeградируемых матриксов, были изготовлены дополнительные группы полимерных матриксов с отдельным содержанием илопроста и катионного амфифила, а также — их сочетанием (Таблица 11).

При этом матриксы, поверхность которых модифицирована методом комплексообразования с использованием катионного амфифила в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл, были исключены из эксперимента в силу высоких показателей гемолиза эритроцитов и деформации тромбоцитов.

Таблица 11 – Перечень полимерных матриц для определения цитотоксичности

Виды образцов	
ПКЛ	Немодифицированный матрикс
ПКЛ/ПВП/Ил (10 кГр)	Матрикс с илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенным методом комплексообразования (облучение 10 кГр)
ПКЛ/ПВП/Ил (15 кГр)	Матрикс с илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл, присоединенным методом комплексообразования (облучение 15 кГр)
ПКЛ/ПВП/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	Матрикс с амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенным методом комплексообразования (облучение 10 кГр)
ПКЛ/ПВП/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	Матрикс с амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенным методом комплексообразования (облучение 15 кГр)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр)	Матрикс с илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл и амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенными методом комплексообразования (облучение 10 кГр)
ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)	Матрикс с илопростом в концентрации 0,2 мкг/мл и амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл, присоединенными методом комплексообразования (облучение 15 кГр)
ПКЛ/А (ковалентная сшивка)	Матрикс с катионным амфифилом, присоединенным методом ковалентной сшивки

Цитотоксичность оценивалась в режиме реального времени в условиях клеточного анализатора RTCA xCELLigence DP (ACEA Biosciences, США). Выявлено, что в экспериментальных лунках, содержащих вставки с немодифицированными ПКЛ-матриксами, а также с матриксами, модифицированными катионным амфифилом в концентрации 0,25 мг/мл и присоединенным к поверхности ПКЛ-матриц посредством комплексообразования, спустя 72 часа клеточные индексы (КИ) совпадали с уровнем КИ в контроле (Рисунок 18). Таким образом, присутствие данных матриц не вызывало токсического влияния на эндотелиальные клетки.

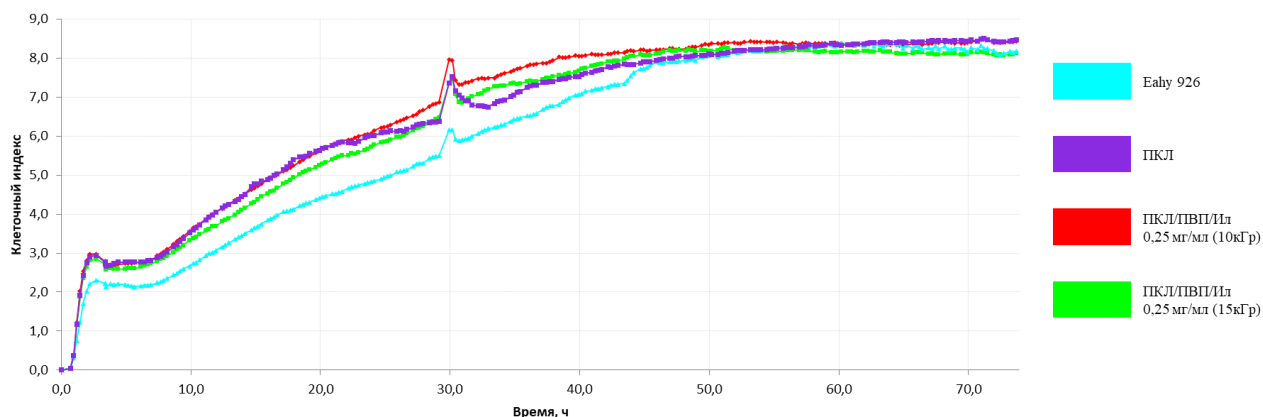


Примечание: за точку нормализации графика принята точка максимального осадения клеток после добавления их в лунки планшета

Рисунок 18 – Динамика клеточного индекса культуры Ea.hv 926 в контроле и при культивировании в присутствии биodeградируемых матриц, немодифицированных и модифицированных катионным амфифилом методом комплексообразования и ковалентной сшивки

Однако матрицы ПКЛ/А (ковалентная сшивка) с катионным амфифилом, присоединенным посредством ковалентной сшивки, оказывали мощный цитотоксический эффект на эндотелиальные клетки, что выразилось в гибели клеточной культуры уже спустя 30 часов инкубирования в присутствии данных матриц (Рисунок 18).

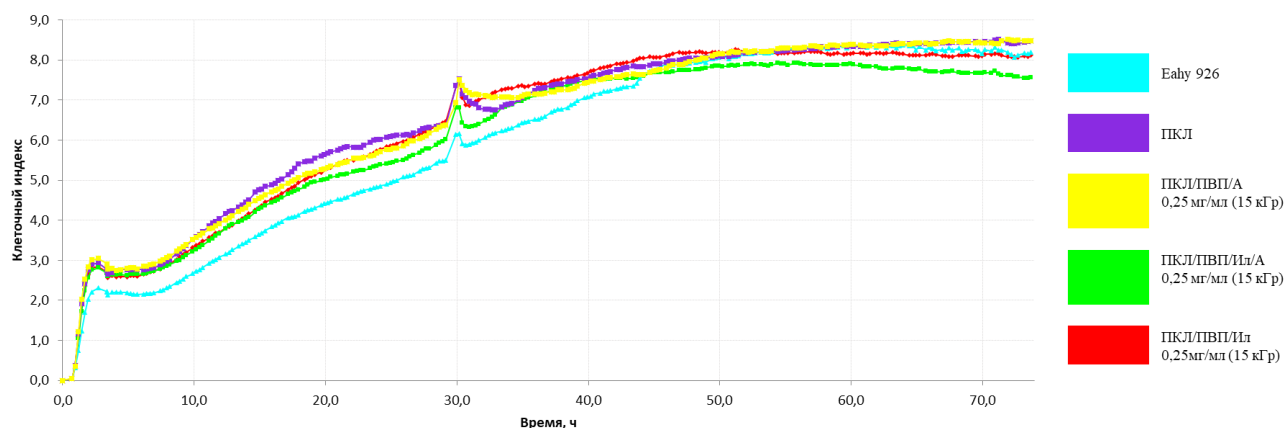
Сравнительная оценка цитотоксического эффекта в присутствии матриц, модифицированных илопростом посредством комплексообразования с использованием различных доз ионизирующего излучения (10 и 15 кГр) не выявила значимых отличий от контроля (Рисунок 19). Тем не менее, несмотря на отсутствие цитотоксического воздействия доз 10 и 15 кГр, для полимеризации ПВП к поверхности ПКЛ-матриц целесообразнее использовать дозу 15 кГр, так как она является стерилизующей.



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

Рисунок 19 – Динамика клеточного индекса культуры Ea.hv 926 в контроле и при культивировании в присутствии биodeградируемых матриц, немодифицированных и модифицированных илопростом методом комплексообразования с использованием различных доз ионизирующего излучения

Окончательная оценка цитотоксичности проведена в присутствии матриц с полным лекарственным покрытием (катионный амфифил 0,25 мг/мл и илопрост 0,2 мкг/мл), выполненным методом комплексообразования, в сравнении с немодифицированными ПКЛ-матриксами, а также матриксами с отдельным модифицированием илопростом или амфифилом, выполненным посредством комплексообразования с использованием общей поглощенной дозы ионизирующего излучения 15 кГр. На рисунке 20 видно, что сочетанное использование илопроста и катионного амфифила для модификации поверхности ПКЛ-матриц методом комплексообразования с применением ионизирующего излучения в общей поглощенной дозе 15 кГр не приводит к достоверному увеличению цитотоксичности матриц. КИ эндотелиальных клеток линии Ea.hv 926 спустя 72 часа культивирования в присутствии данных матриц не имел достоверных отличий от КИ клеток, культивируемых изолированно или в присутствии немодифицированных матриц и матриц с изолированным включением илопроста или катионного амфифила.



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

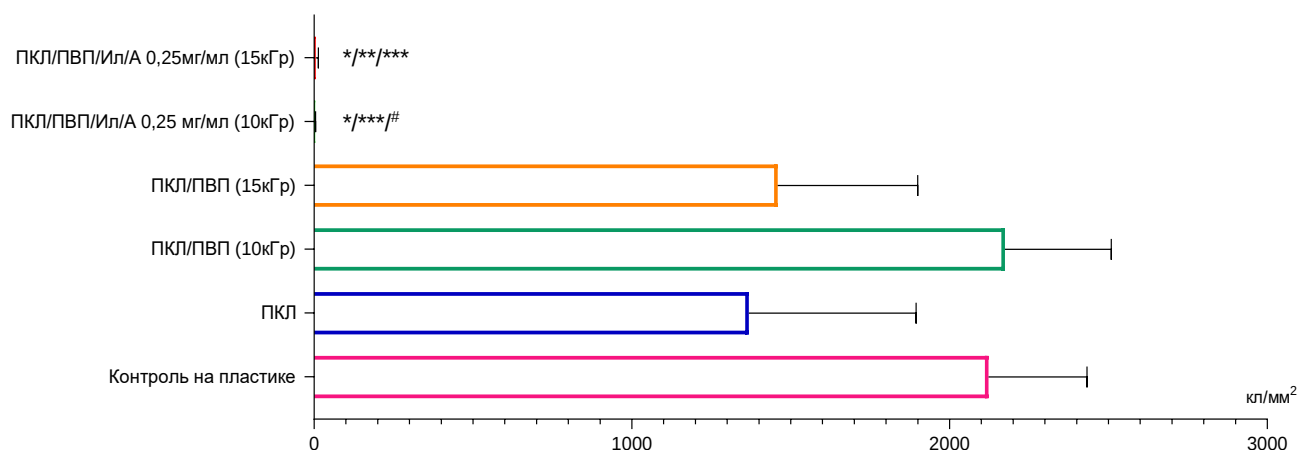
Рисунок 20 – Динамика клеточного индекса культуры Ea.hy 926 в контроле и при культивировании в присутствии биodeградируемых матриц, немодифицированных и модифицированных илопростом и катионным амфифилом методом комплексообразования с использованием дозы ионизирующего излучения 15 кГр

Таким образом, при оценке цитотоксичности матриц в режиме реального времени выявлена крайне низкая биосовместимость ПКЛ/А (ковалентная сшивка). Поэтому данные образцы не были включены в дальнейшие исследования.

3.6.2 Адгезия, жизнеспособность и пролиферативная активность эндотелиальных клеток при культивировании на поверхности матриц

При изучении адгезивных характеристик матриц выявлено, что применение ПВП в качестве модифицирующего компонента ПКЛ-матриц позволило на 80,2% повысить общее количество адгезированных клеток Ea.hy 926 на поверхности ПКЛ/ПВП (10 кГр) – до 2185,0 (1870,0-2523,0) кл/мм², в сравнении с чистыми ПКЛ-матриксами – 1212,4 (965,3-1702,3) кл/мм². Применение увеличенной общей поглощенной дозы ионизирующего излучения до 15 кГр на матрицах ПКЛ/ПВП (15 кГр) 1489,8 (1187,1-1799,9) кл/мм² дало незначительное повышение адгезии в 6,48% относительно немодифицированных матриц. Общее количество адгезированных эндотелиальных клеток линии

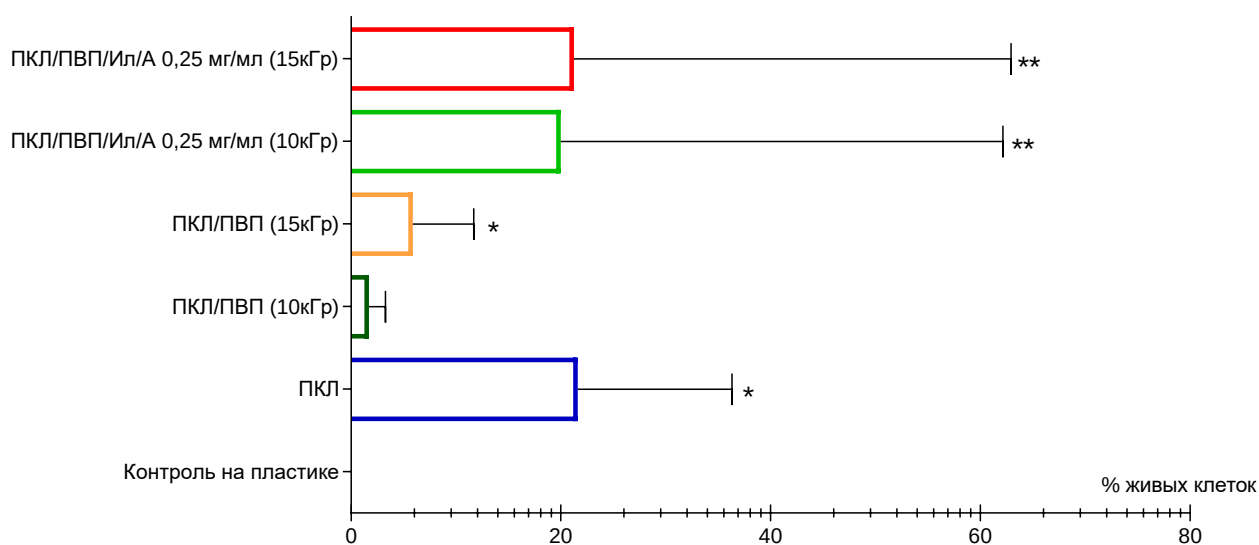
Ea.hu 926 на поверхности матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (10 кГр) 2,9 (2,9-3,6) кл/мм² и ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) 0,0 (0,0-12,2) кл/мм² в среднем составило 1,26 кл/мм², что оказалось достоверно ниже относительно остальных групп сравнения ($p<0,05$) (Рисунок 21).



Примечание: *- $p<0,05$ в сравнении с общим количеством адгезированных клеток на культуральном пластике; **- $p<0,05$ в сравнении с общим количеством адгезированных клеток на ПКЛ; ***- $p<0,05$ в сравнении с общим количеством адгезированных клеток на ПКЛ/ПВП (10 кГр); #- $p<0,05$ в сравнении с общим количеством адгезированных клеток на ПКЛ/ПВП (15 кГр)

Рисунок 21 – Адгезия клеток Ea.hu 926 на поверхности ПКЛ-матриксов с различными вариантами поверхностного модифицирования

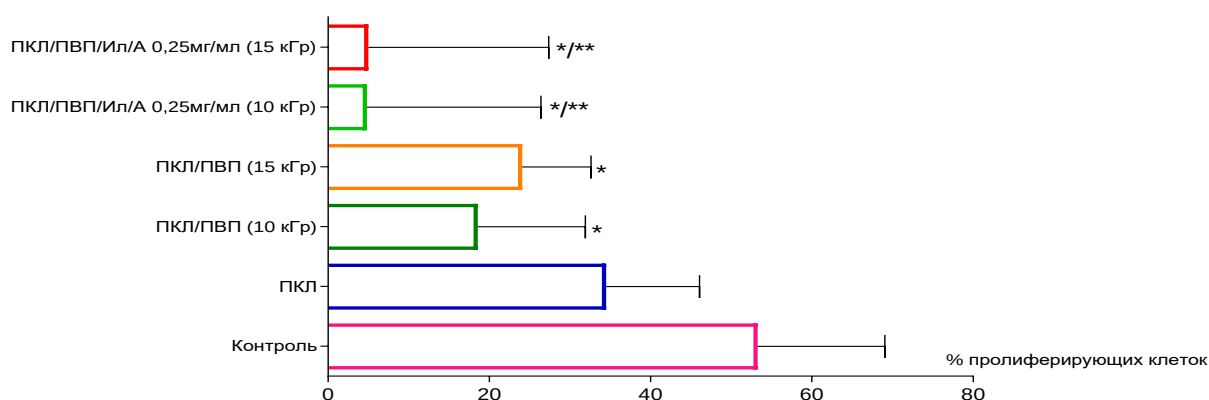
При этом возросла клеточная жизнеспособность: на поверхности ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25мг/мл (15 кГр) относительное количество живых клеток составило 98%, что на 20% выше, чем на немодифицированных ПКЛ-матриксах (Рисунок 22).



Примечание: *- $p < 0,05$ в сравнении с контролем; **- $p < 0,05$ в сравнении с ПКЛ

Рисунок 22 – Жизнеспособность клеток Ea.hy 926 на поверхности ПКЛ-матриков с различными вариантами поверхностного модифицирования

Наиболее высокая пролиферативная активность эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 выявлена в контрольных лунках – при культивировании клеток на культуральном пластике: 52,85 (40,13-66,35) %. На поверхности части матриков также отмечался монослой клеток с высокими значениями пролиферации, что характеризует хорошую адгезионную способность выбранных полимеров (Рисунок 23, 24). Процент пролиферирующих клеток на ПКЛ-матриках составил 34,4 (29,10-43,46) %. Добавление ПВП и облучение дозой 10 кГр уменьшило пролиферативную активность клеток до 14,98 (8,32-27,12) %, ($p < 0,05$). Дальнейшее увеличение облучения до 15 кГр, напротив, способствовало увеличению пролиферативной активности клеток на матриках до 26,04 (13,99-30,83) %. Предположительно, стимулирование пролиферации клеток может быть связано с уменьшением плотности клеточного слоя, которая наблюдалась после данной обработки.



Примечание: *- $p < 0,05$ в сравнении с контролем; **- $p < 0,05$ в сравнении с ПКЛ

Рисунок 23 – Пролиферативная активность эндотелиальных клеток линии Ea.hv 926 спустя 4 суток культивирования на поверхности полимерных матриц и культуральном пластике

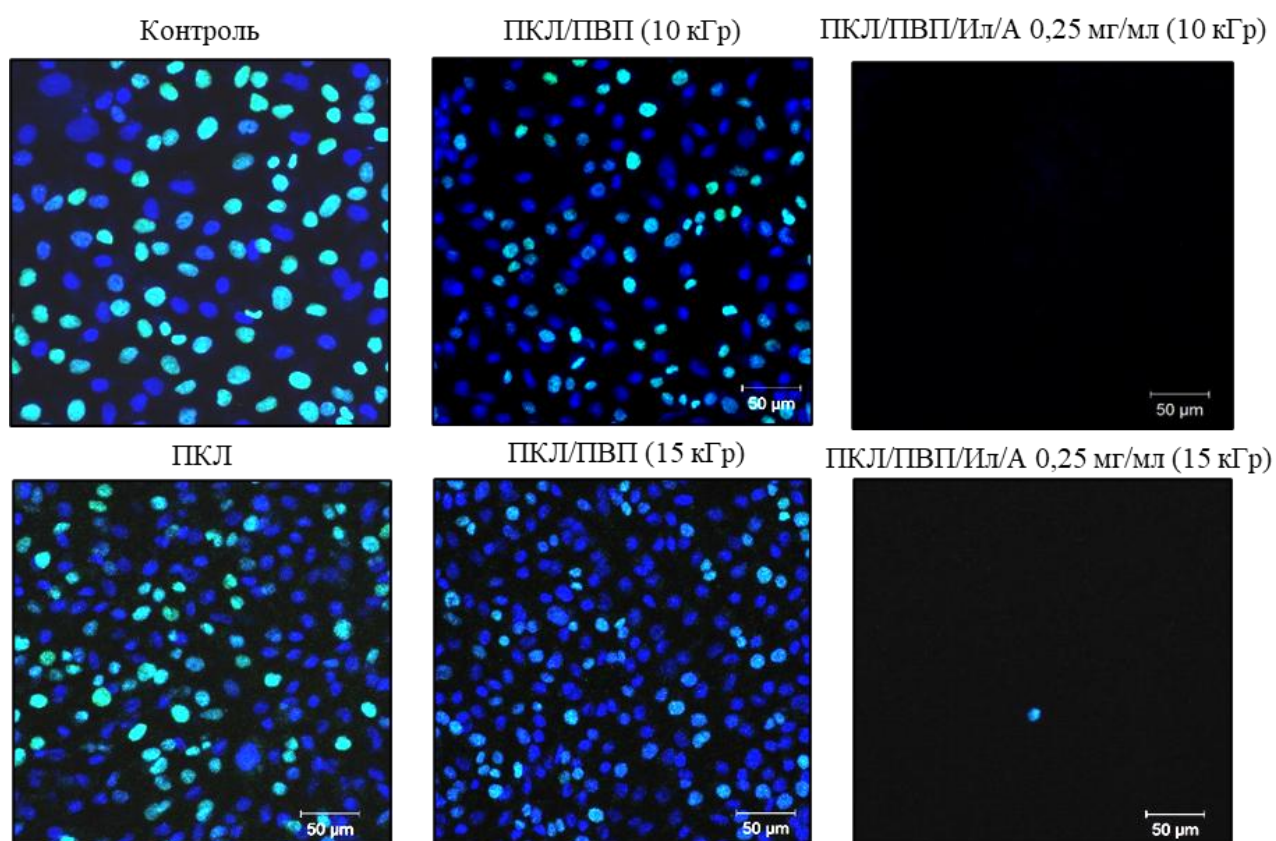


Рисунок 24 – Конфокальная микроскопия эндотелиальных клеток линии Ea.hv 926 спустя 4 суток культивирования на поверхности полимерных матриц и на культуральном пластике (контроль): ядра пролиферирующих клеток – зеленый цвет, все адгезированные клетки – синий цвет (ядерный краситель DAPI), ув. $\times 200$

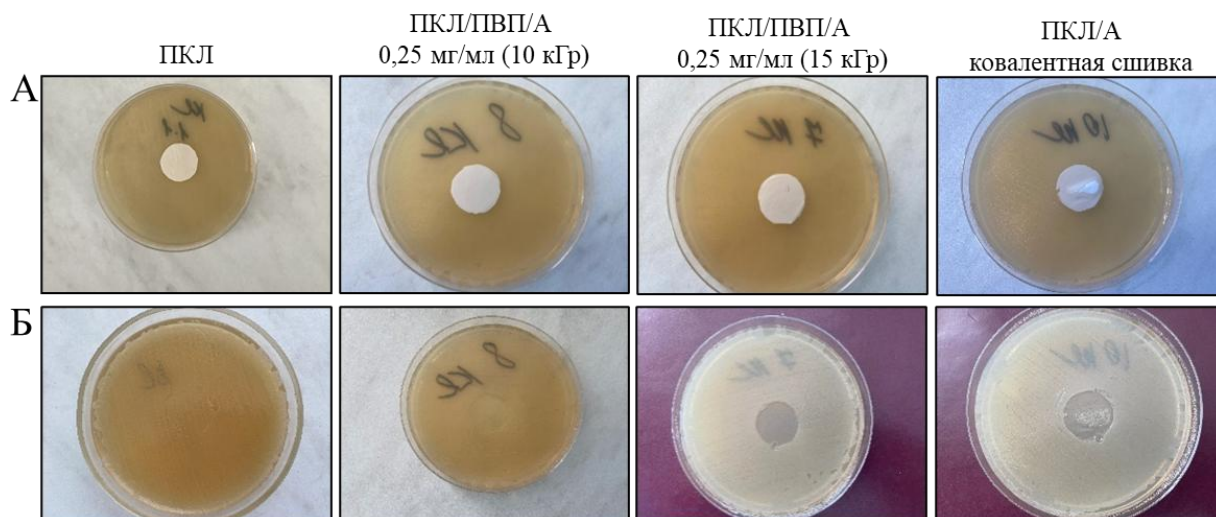
На поверхности матриксов, модифицированных илопростом и катионным амфифилом, наблюдались единичные клетки (Рисунок 29, 30). В подавляющем большинстве случаев эти клетки были пролиферирующими, что в целом дало очень высокие (до 100%) показатели пролиферации для данных матриксов, что статистически значимо отличало их от матриксов без лекарственных препаратов.

Включение илопроста в состав лекарственного покрытия предназначено для предотвращения тромбообразования матриксов в раннем послеоперационном периоде. После полного высвобождения из гидрогеля на основе ПВП лекарственных препаратов с атромбогенными свойствами имплантаты на основе созданных биodeградируемых матриксов будут максимально пригодны для формирования на их основе новообразованной сосудистой ткани.

3.7 Оценка антимикробной эффективности катионного амфифила в составе матриксов

Проведено сравнительное изучение бактериостатических свойств полимерных матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А с концентрацией амфифила 0,25 мг/мл и дозой облучения 10 кГр или 15 кГр, а также матриксов ПКЛ/А (ковалентная сшивка), [11]. В качестве контроля выступили ПКЛ-матриксы, не содержавшие лекарственные препараты [11].

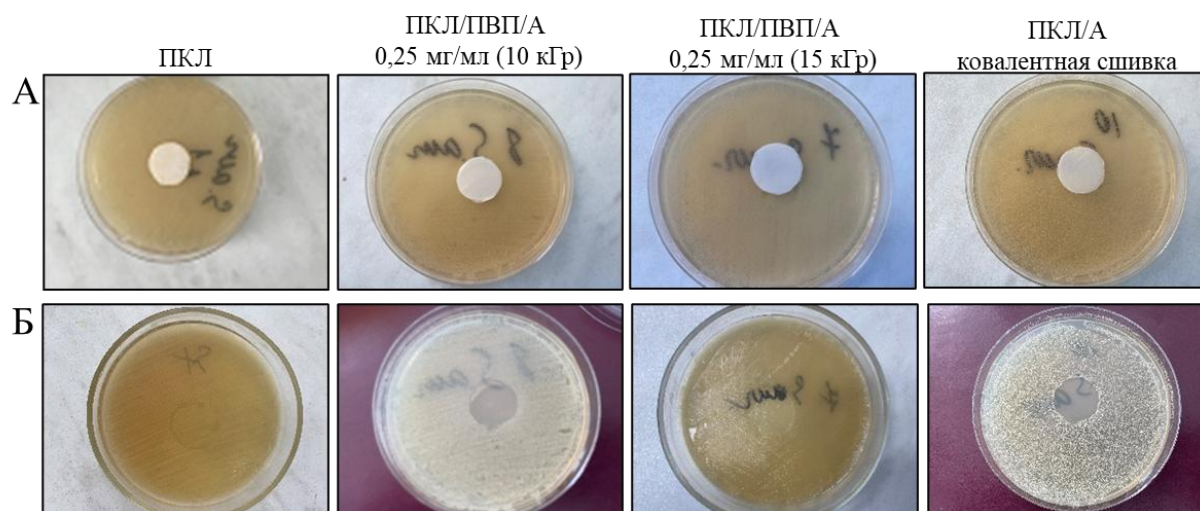
На рисунке 25 видно, что во всех образцах вне зависимости от способа присоединения катионного амфифила к поверхности полимерных матриксов, подавление роста *K.pneumonia* носило локальный характер (в зоне наложения матрикса на агар), [11].



Примечание: А – ряд чашек с матриксами; Б – ряд чашек без матриксов

Рисунок 25 – Бактериостатические свойства ПКЛ-матрикса с различной дозой облучения и различными способами присоединения катионного амфифила относительно *Klebsiella pneumoniae* № 5055, [11]

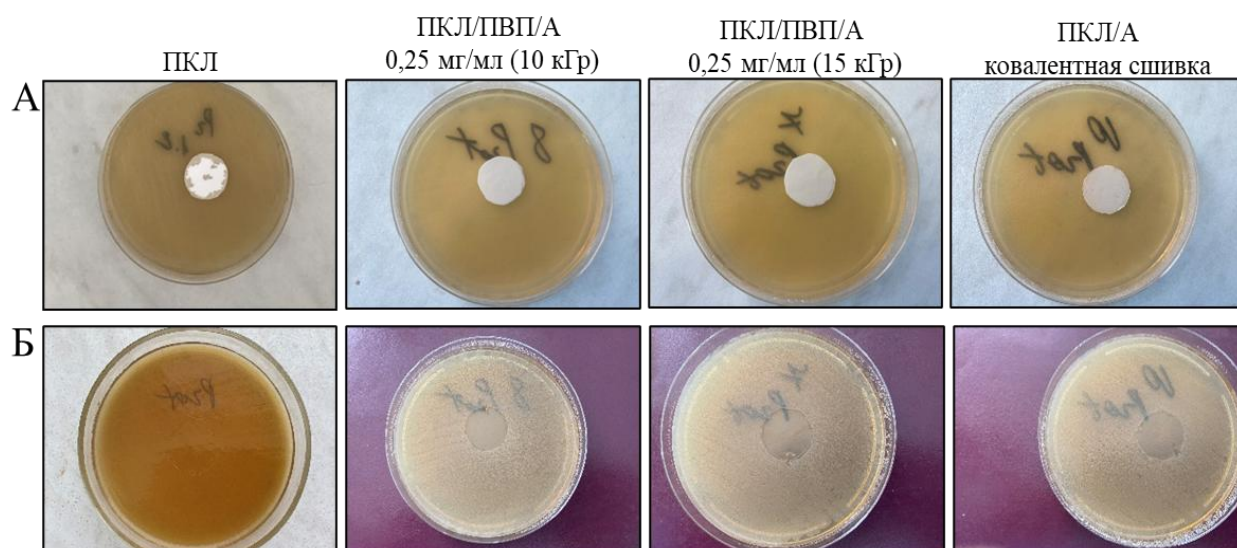
Изучение воздействия катионного амфифила на культуру *S.aureus* также показало отсутствие роста патогенных микроорганизмов в местах наложения изучаемых матриксов на агар. Положительные результаты были получены на всех матриксах, вне зависимости от облучения или способа присоединения катионного амфифила (Рисунок 26).



Примечание: А – ряд чашек с матриксами; Б – ряд чашек без матриксов

Рисунок 26 – Бактериостатические свойства ПКЛ-матрикса с различной дозой облучения и различными способами присоединения катионного амфифила относительно *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, [11]

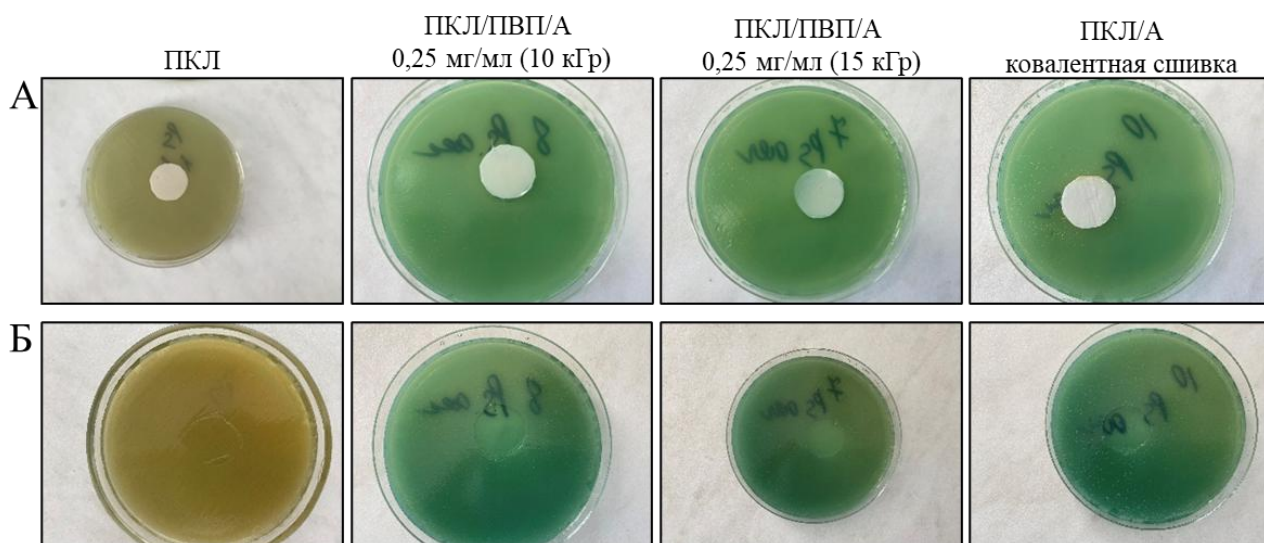
На агаре *P.mirrabilis* образует круглые полупрозрачные колонии с ровным или волнистым краем, имеющие вид «роения». Действие матриксов с различной концентрацией амфифила на *P.mirrabilis* сходно с действием этих же матриксов на другие микроорганизмы, действуя локально только в месте нанесения матриксов, без каких-либо особенностей (Рисунок 27), [11].



Примечание: А – ряд чашек с матриксами; Б – ряд чашек без матриксов

Рисунок 27 – Бактериостатические свойства ПКЛ-матриксов с различной дозой облучения и различными способами присоединения катионного амфифила относительно *Proteus mirabillis* ATCC3177, [11]

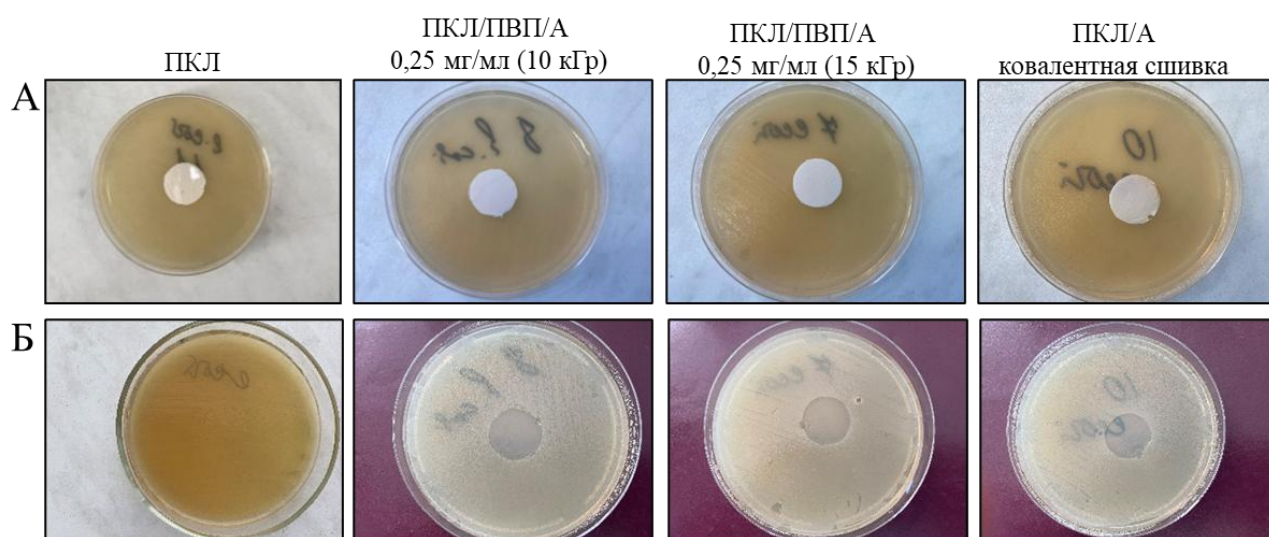
На агаре *P.aeruginosa* образует колонии средней величины круглые выпуклые, за счет пигмента пиоцианина среда окрашивается в зеленый цвет. Как и в случае с *K.pneumonia* отмечено локальное действие матриксов инкорпорированных амфифилом во всех исследуемых концентрациях (Рисунок 28). При этом зон задержки роста не выявлено [11].



Примечание: А – ряд чашек с матриксами; Б – ряд чашек без матриксов

Рисунок 28 – Бактериостатические свойства ПКЛ-матриксков с различной дозой облучения и различными способами присоединения катионного амфифила относительно *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, [11]

Исследуемые матриксы с различными способами присоединения амфифила оказывали и дозой облучения показали только местное ингибирующее действие на рост культуры *E.coli* без диффузии в агар и соответственно без зоны задержки роста вокруг диска (Рисунок 29).



Примечание: А – ряд чашек с матриксами; Б – ряд чашек без матриксов

Рисунок 29 – Бактериостатические свойства ПКЛ-матриксков с различной дозой облучения и различными способами присоединения катионного амфифила относительно *Escherichia coli* ATCC 25922, [11]

Для проверки возможности матриц с включенным катионным амфифилом вызывать гемолиз эритроцитов был использован агар Мюллера-Хинтона с кровью [11]. Поскольку *K.pneumonia* не обладает гемолитическими свойствами, для проверки был выбран именно этот микроорганизм. В результате наблюдения было зафиксировано отсутствие гемолиза как вокруг, так и в зоне локации матриц с присоединением катионного амфифила методом комплексообразования (Рисунок 30: 1, 2), [11]. Матрицы с катионным амфифилом, присоединенным методом ковалентной сшивки, провоцировали гемолиз при наложении на агар Мюллера-Хинтона с кровью (Рисунок 30: 3), [11].

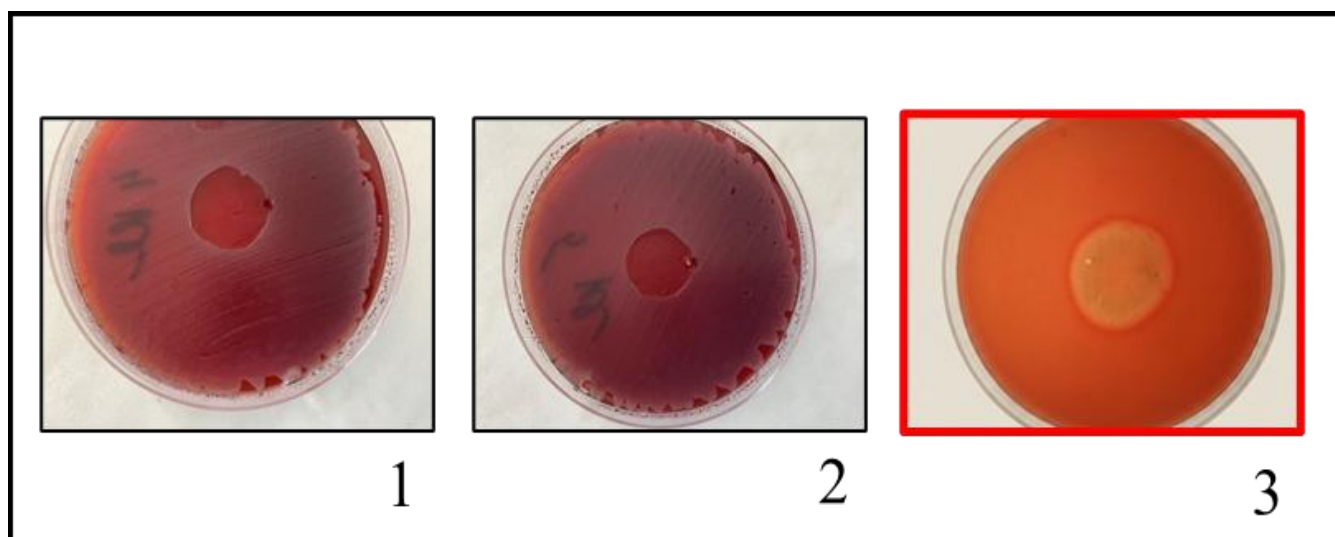


Рисунок 30 – задержка роста *Klebsiella pneumoniae* и признаки гемолиза в зоне наложения полимерных матриц: 1 – ПКЛ/ПВП/Ил/А-10 кГр; 2 – ПКЛ/ПВП/Ил/А-15 кГр. 3 – Гемолиз в месте локации полимерного матрикса ПКЛ/А (ковалентная сшивка), [11]

Таким образом, во всех образцах, содержащих катионный амфифил, подавление роста микроорганизмов носило местное ингибирующее действие в месте наложения матриц на агар (амфифил не диффундирует в агар, обладает только местным действием) [11]. Зон задержки роста не выявлено. Различные режимы ионизирующего излучения и способов присоединения амфифила не привели к разнице в бактериостатических свойствах матриц [11]. Методы присоединения амфифила (комплексообразование или

ковалентная сшивка) не влияют на его антибактериальные свойства в изучаемых матриксах [11]. Однако на агаре Мюллера-Хинтона с кровью матрикса ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл вне зависимости от варианта облучения не провоцировали гемолиз, тогда как матриксы ПКЛ/А (ковалентная сшивка) провоцировали гемолиз [11]. В свою очередь немодифицированные матриксы не обладали бактериостатическим эффектом: в месте наложения матриксов был продолжен рост колоний всех штаммов микроорганизмов [11].

Резюме

Доказано, что присоединение илопроста и катионного амфифила к поверхности ПКЛ-матрикса методом комплексообразования является более щадящим в сравнении с использованием метода ковалентной сшивки. Однако катионный амфифил в концентрации 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл, присоединенный к поверхности ПКЛ-матрикса методом комплексообразования, провоцировали гемолиз эритроцитов и деформацию тромбоцитов так же, как и катионный амфифил, присоединенный ковалентно. При этом матриксы ПКЛ/А (ковалентная сшивка) дополнительно обладали выраженной цитотоксичностью, при контакте с кровью провоцировали выраженный гемолиз эритроцитов, адгезию и агрегацию тромбоцитов.

Дозы ионизирующего облучения в 10 и 15 кГр, использованные для полимеризации ПВП к поверхности ПКЛ-матрикса, не оказывали пагубного влияния на физико-механические и биосовместимые свойства матрикса. Следовательно, в последующем выбор дозы облучения 15 кГр будет предпочтительнее, так как позволяет одновременно проводить полимеризацию поливинилпирролидона к поверхности биodeградируемых изделий и стерилизацию [11].

Полимерные матриксы ПКЛ/ПВП/Ил/А с катионным амфифилом, присоединенным в концентрации 0,25 мг/мл методом комплексообразования, продемонстрировали отличные бактериостатические свойства в месте

наложения матриксов на агар, не вызывая при этом гемолиза эритроцитов в агаре Мюллера-Хинтона, что будет гарантированно профилактировать микробное обсеменение стенок матриксов после их имплантации в сосудистое русло без пагубного влияния на клетки крови.

Однако ПКЛ-матрикс с ковалентным присоединением катионного амфифила провоцировали гемолиз при наложении на агар Мюллера-Хинтона с кровью.

Таким образом, по совокупности свойств, полученных при тестировании матриксов на этапе *in vitro*, оптимальным явился матрикс ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр).

ГЛАВА 4. АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МАТРИКСОВ С КАТИОННЫМ АМФИФИЛОМ В УСЛОВИЯХ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЫ

Моделирование инфицированной раны на холке крыс линии *Wistar* выполняли посредством внутримышечной инъекции в подготовленную резаную рану взвеси культуры *S.aureus* в концентрации 10^5 - 10^{12} КОЕ/мл. Спустя 7 суток с инфицированной раны снимали швы, раздвигали ткани тупым предметом и помещали полимерный матрикс ПКЛ/ПВП/Ил/А (15 кГр) с концентрацией катионного амфифила 0,25 мг/мл в просвет инфицированной раны по центру, после чего края раны сводили и ушивали (Рисунок 31).

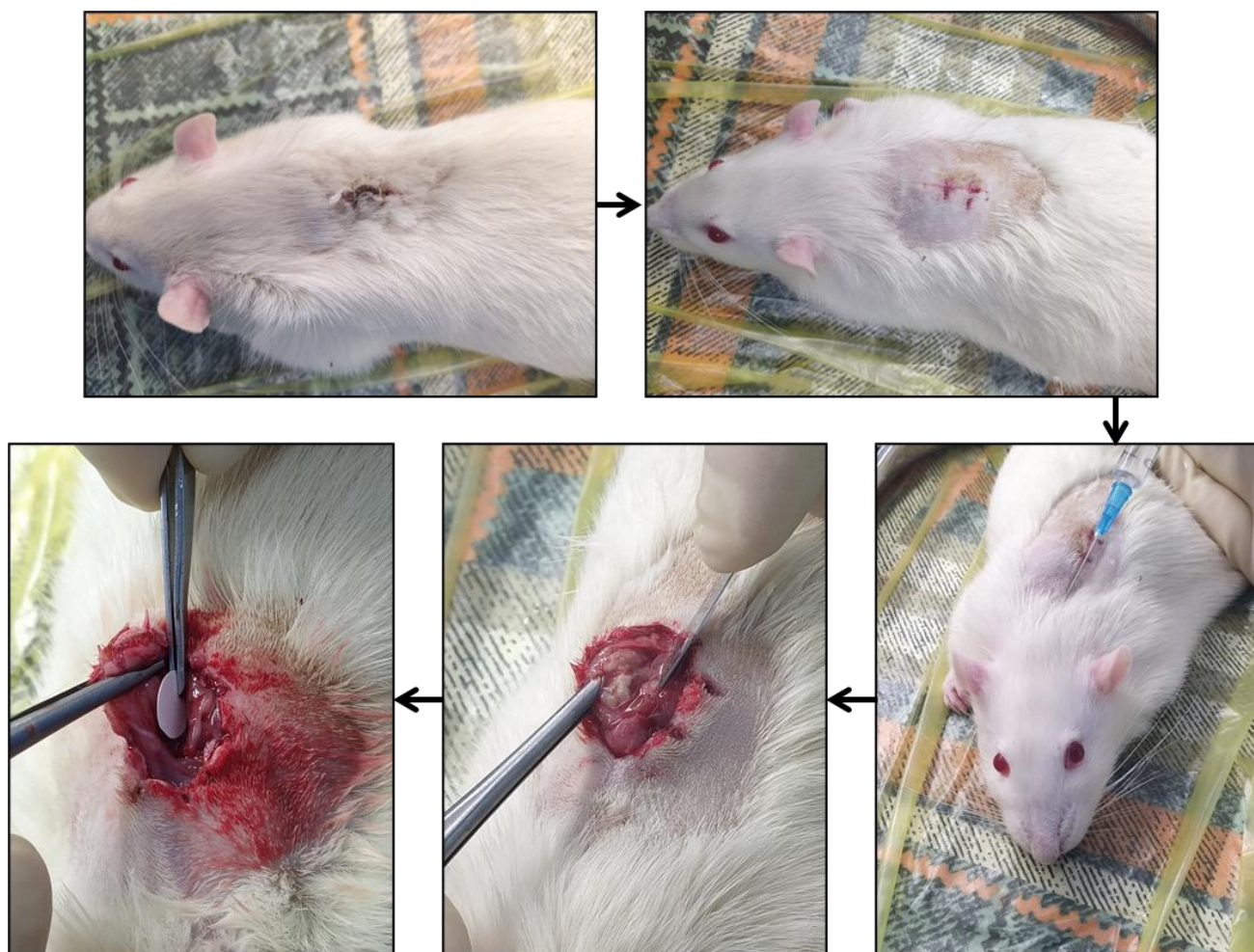


Рисунок 31 – Процесс имплантации матриксов в инфицированную рану крыс

Результаты оценивали через 7 суток для ПКЛ-матриков (контрольная группа), на 7 и 14 суток – для матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) (опытная группа).

Выявлено, что по истечении 7 суток имплантации для контрольной группы и 7 и 14 суток имплантации для опытной группы эксплантированные матриксы находились внутри капсулы с гнойным содержимым (Рисунок 32).



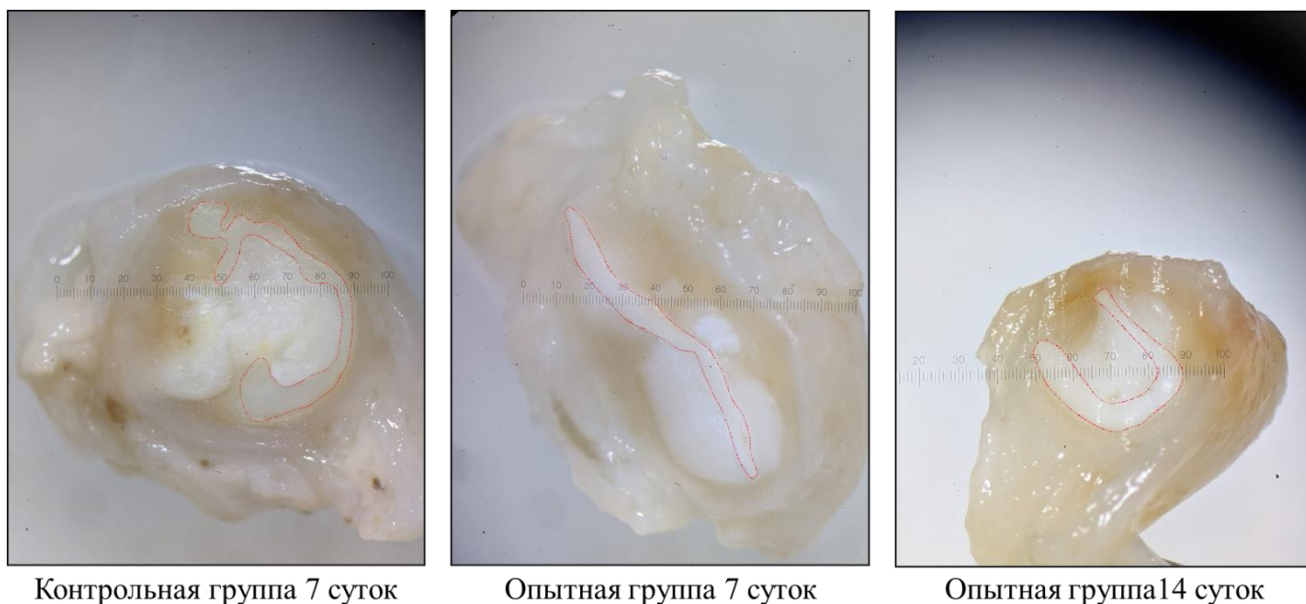
Рисунок 32 – Эксплантированный образец с матриксом

При сравнительной макроскопической оценке эксплантированных матриков с прилежащими окружающими тканями выявлено, что в контрольной группе инфицированные раны с контрольным ПКЛ-матриксом имели большие размеры, чем в опытной группе. В опытной группе по мере увеличения срока наблюдения отмечалось уменьшение гнойного содержимого в ранах с матриксами ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) (Рисунок 33).



Рисунок 33 – Сравнительная макроскопическая оценка эксплантированных капсул с матриксами на различных сроках имплантации

Уменьшение гнойного содержимого в ранах с матриксами также четко можно было определить в образцах, изученных на стереомикроскопе (Рисунок 34).



Примечание: Пунктирной линией отмечено расположение матриксов в гнойной капсуле

Рисунок 34 – Сравнительная оценка эксплантированных гнойных капсул на стереомикроскопе

4.1 Результаты гистологического исследования эксплантированных образцов матриксов

По результатам гистологического исследования выявлено, что в инфицированной ране контрольная группа матриксов, помещенная в центр раны при имплантации, спустя 7 суток была оттеснена к краю раны гнойными массами, что может быть обусловлено продолжающимся воспалительным процессом с увеличением объема гнойного содержимого (Рисунок 35, 36).

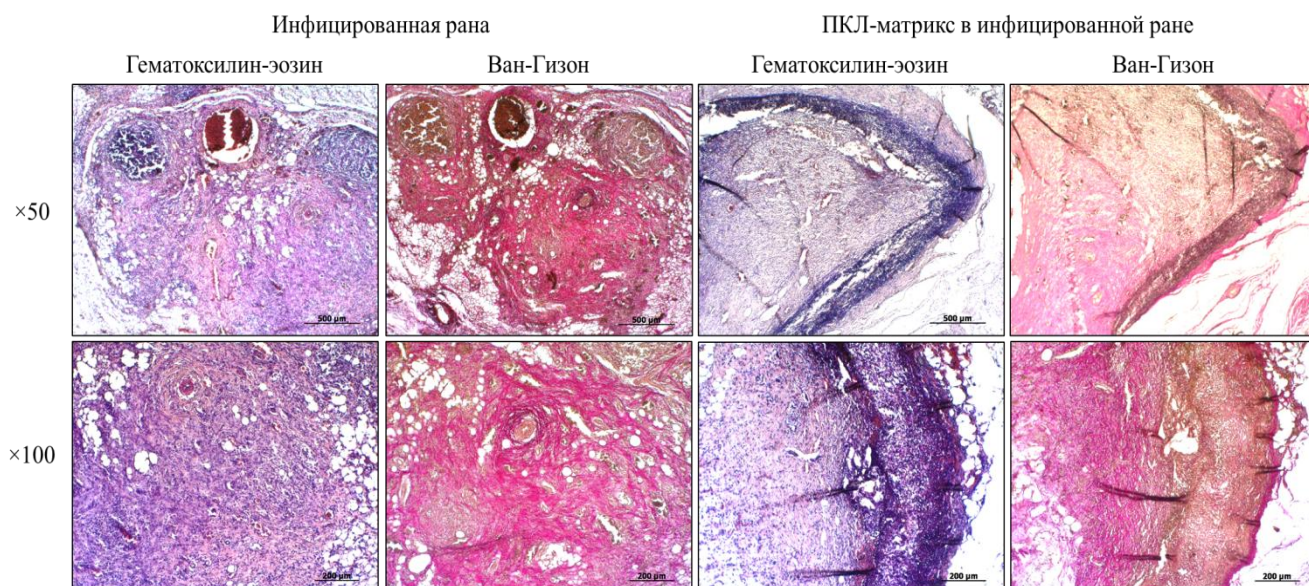


Рисунок 35 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации ПКЛ-матриксов – окраска гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону

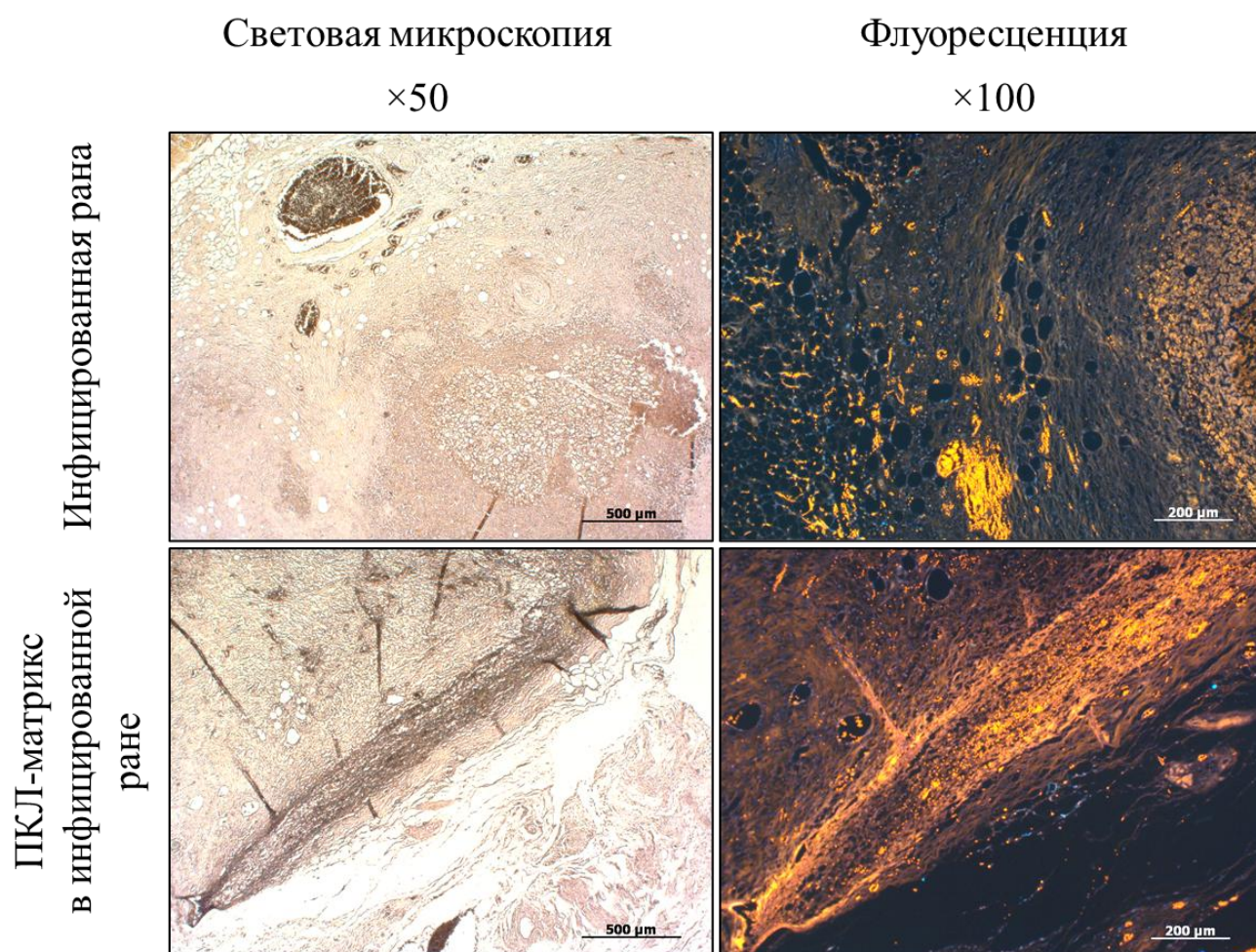


Рисунок 36 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации ПКЛ-матрикса – окраска ализариновым красным С

В опытной группе спустя 7 суток после имплантации матриксы ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) сохраняли свое центральное положение в гнойной капсуле за счет уменьшения воспалительного процесса. В центральной части инфицированной раны зафиксировано очищение раны от гнойных масс с образованием фиброзной ткани. Ближе к краям раны заметна активная грануляция, представленная макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородного тела. По краям инфицированной раны отмечено формирование фиброзной капсулы (Рисунок 37).

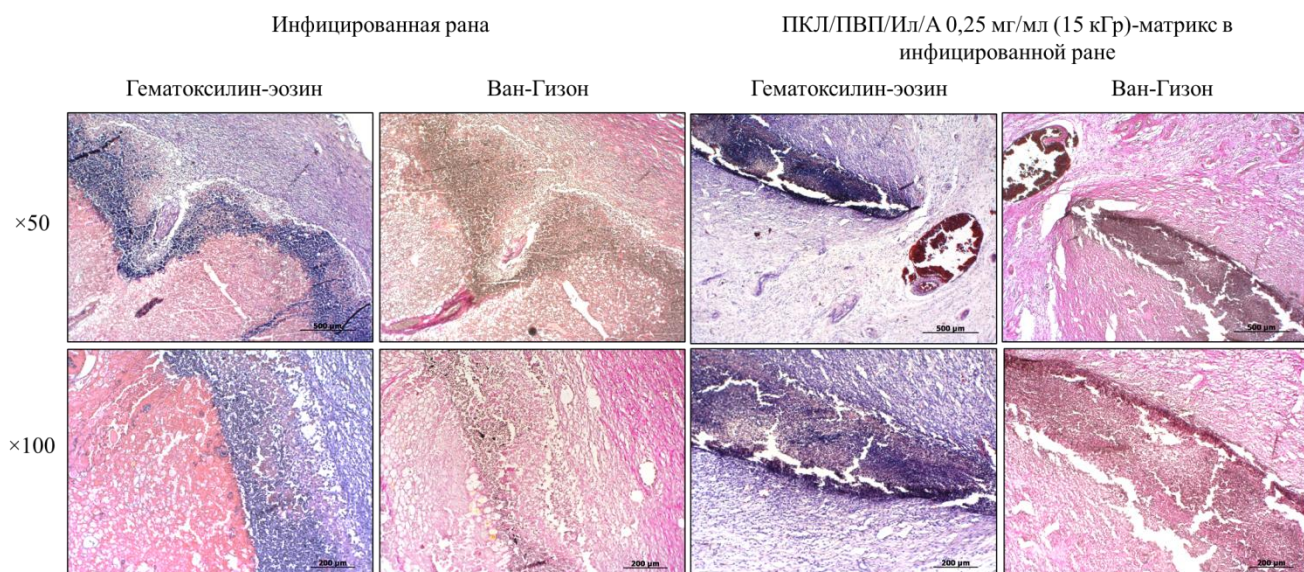


Рисунок 37 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр)

При окраске эксплантированных образцов ализариновым красным С отложения кальция не выявлено (Рисунок 38).

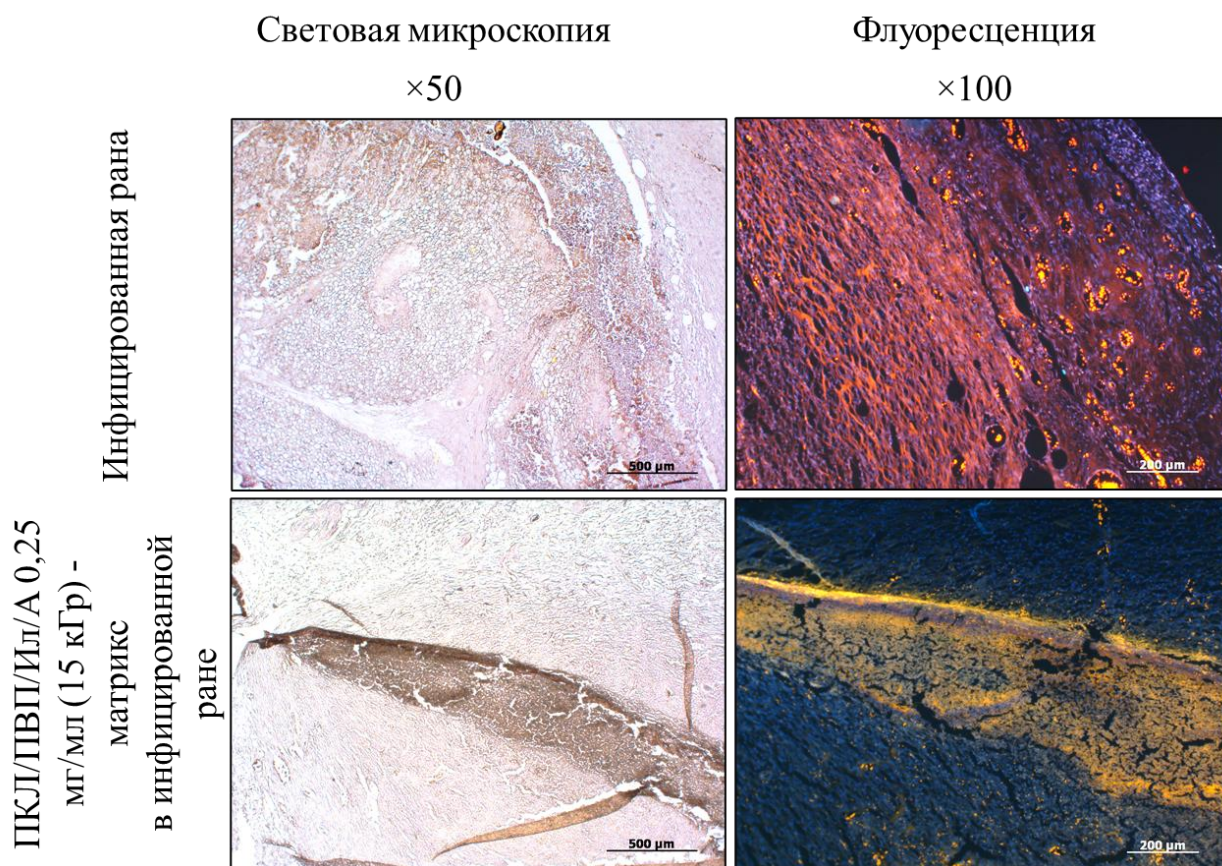


Рисунок 38 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) – окраска ализариновым красным С

Спустя 14 суток отмечено уплотнение тканей, окружающих матриксы ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр). В центральной части раны увеличивалось количество фиброзной ткани. В области расположения матриксов с катионным амфифилом гноя не выявлено (Рисунок 39).

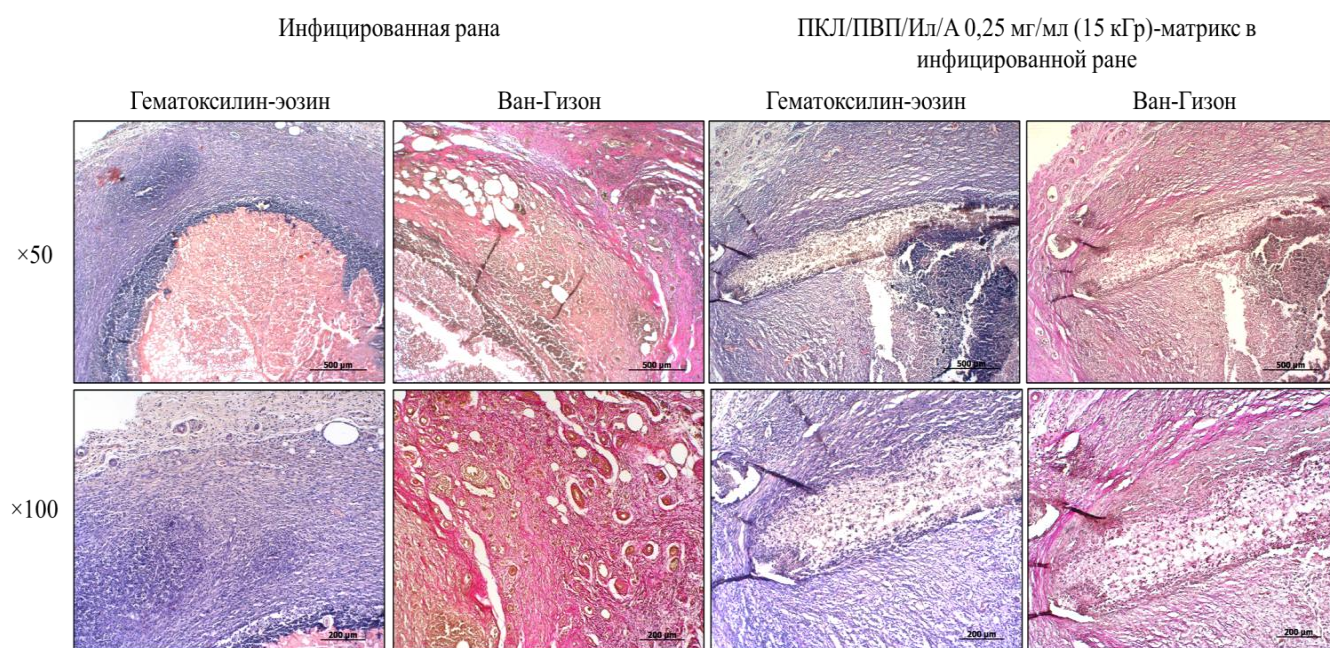


Рисунок 39 – Гистологическая картина спустя 14 суток имплантации матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А

Присутствие аморфного кальция или его фракций также не выявлено спустя 14 суток имплантации матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А (Рисунок 40).

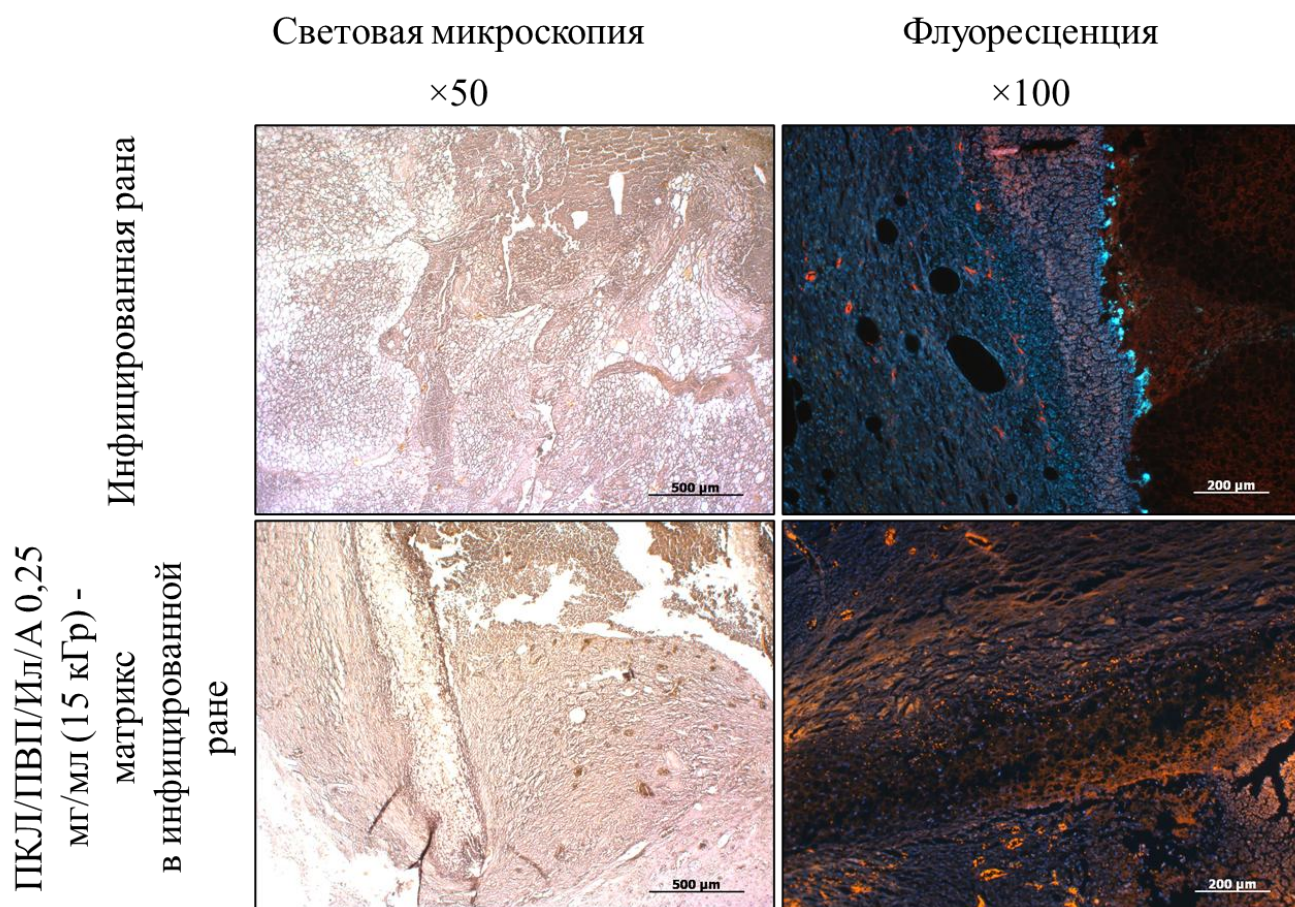
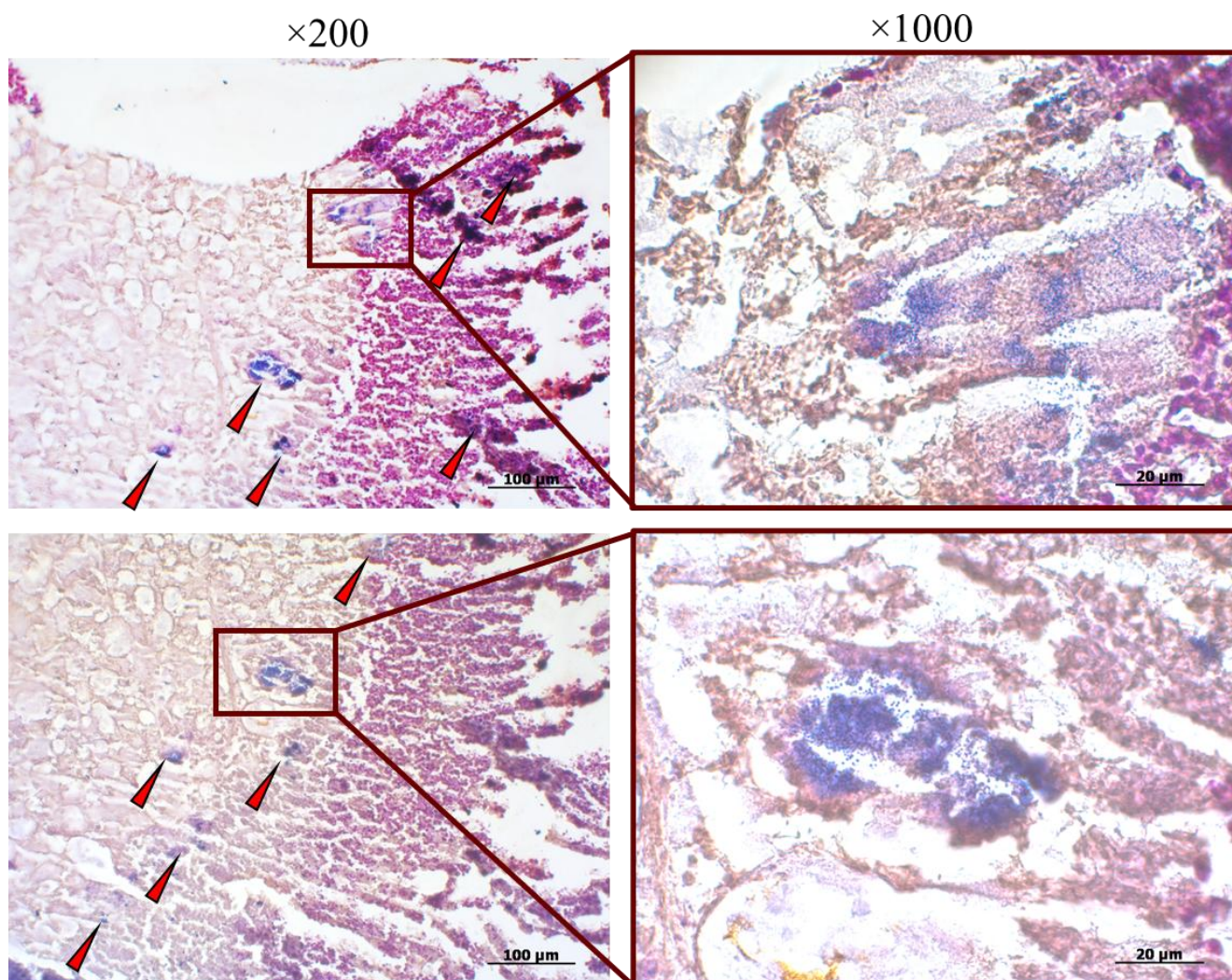


Рисунок 40 – Гистологическая картина спустя 7 суток имплантации ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) – окраска ализариновым красным С

4.2 Результаты окраски эксплантированных образцов по Граму

Дополнительно была проведена специфическая окраска образцов по Граму, позволяющая установить наличие бактерий и дифференцировать их.

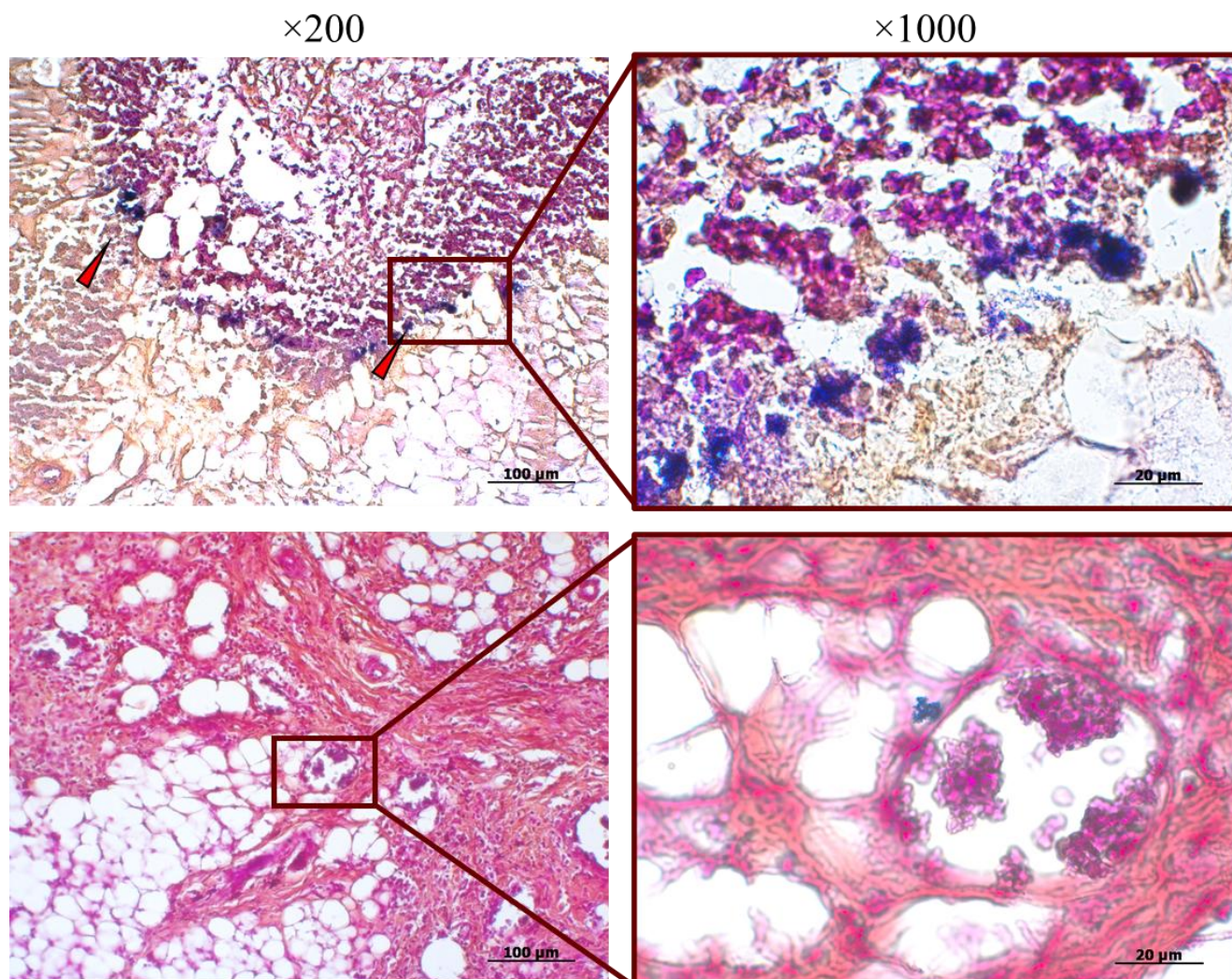
Золотистый стафилококк положительно окрашивается по Граму в синий цвет, позволяя достаточно легко определить наличие шарообразных бактерий. Спустя 7 суток имплантации выявлено наличие больших хаотично разбросанных скоплений шарообразных бактерий вокруг ПКЛ-матрикса (в 17 полях зрения из 20) (Рисунок 41).



Примечание: Стрелками отмечены очаги бактериальных скоплений

Рисунок 41 – Результаты окрашивания по Граму образцов контрольной группы ПКЛ-матрикс спустя 7 суток имплантации

Вокруг матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А небольшие бактериальные скопления в основном были обнаружены в периферической части инфицированной раны. При подсчете в 20 произвольных полях зрения бактериальные скопления были обнаружены в 5 из них. Сами скопления были меньше по объему, чем в контрольной группе. Также обнаружено несколько особо малых по площади скоплений в центральной части инфицированной раны, в фиброзной ткани (Рисунок 42).



Примечание: Стрелками отмечены очаги бактериальных скоплений

Рисунок 42 – Результаты окрашивания по Граму образцов опытной группы ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) спустя 7 суток имплантации

Спустя 14 суток вокруг матриксов 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 (Рисунок 43).

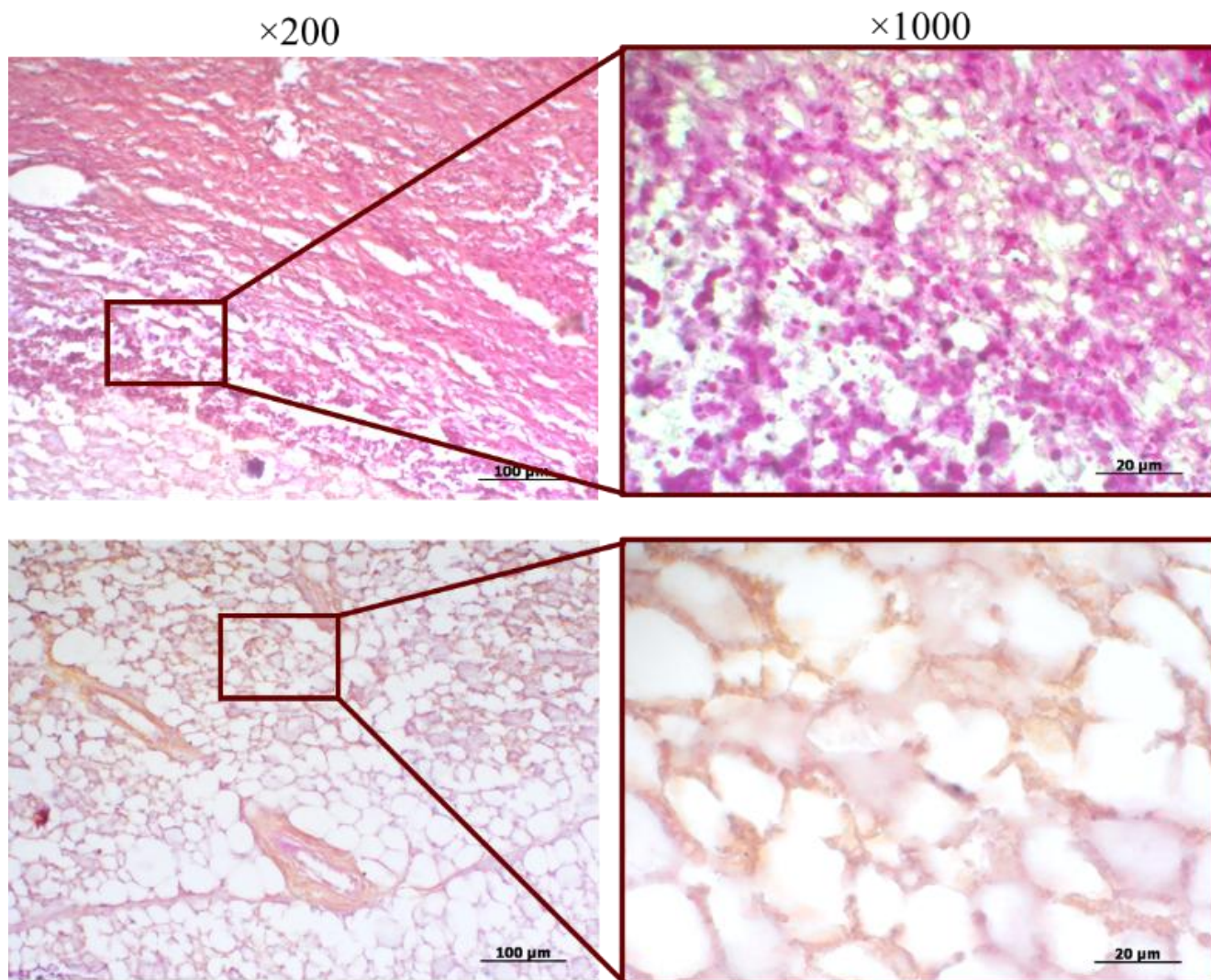


Рисунок 43 – Результаты окрашивания по Граму образцов опытной группы ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) спустя 14 суток имплантации

4.3 Результаты сканирующей электронной микроскопии эксплантированных матриц с окружающими тканями

При проведении сканирующей электронной микроскопии эксплантированных ПКЛ-матриц с окружающими тканями выявлено, что через 7 суток имплантации в толще инфицированной раны с матриксами преобладали скопления нейтрофилов, что подтверждает активный воспалительный процесс (Рисунок 44). В толще ПКЛ-матриц клеточная инфильтрация слабая, неравномерно усиливающаяся к краям (Рисунок 44).

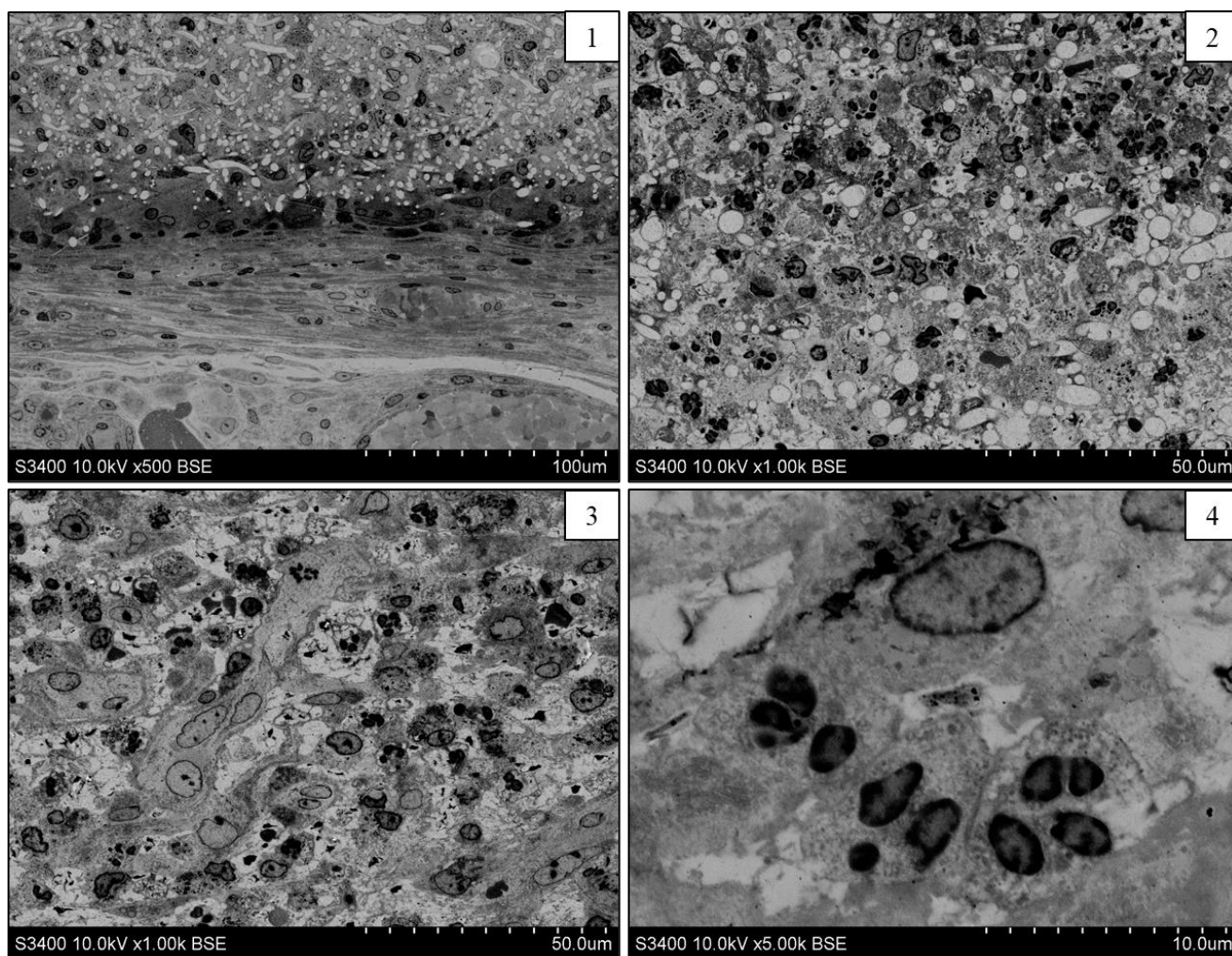


Рисунок 44 – Сканирующая электронная микроскопия эксплантированных ПКЛ-матриков (контрольная группа) – 7 суток имплантации: 1 – матрикс с клеточной инфильтрацией, ув. $\times 500$; 2 – толщина инфицированной раны, ув. $\times 500$; 3 – клеточное наполнение, ув. $\times 2500$; 4 – нейтрофил, ув. $\times 5000$

При проведении сканирующей электронной микроскопии эксплантированных матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А с окружающими тканями выявлено, что через 7 суток имплантации в толще инфицированной раны с матриксами преобладали макрофаги, более выраженная по сравнению с контрольной группой клеточная инфильтрация стенки полимерных матриков (Рисунок 45).

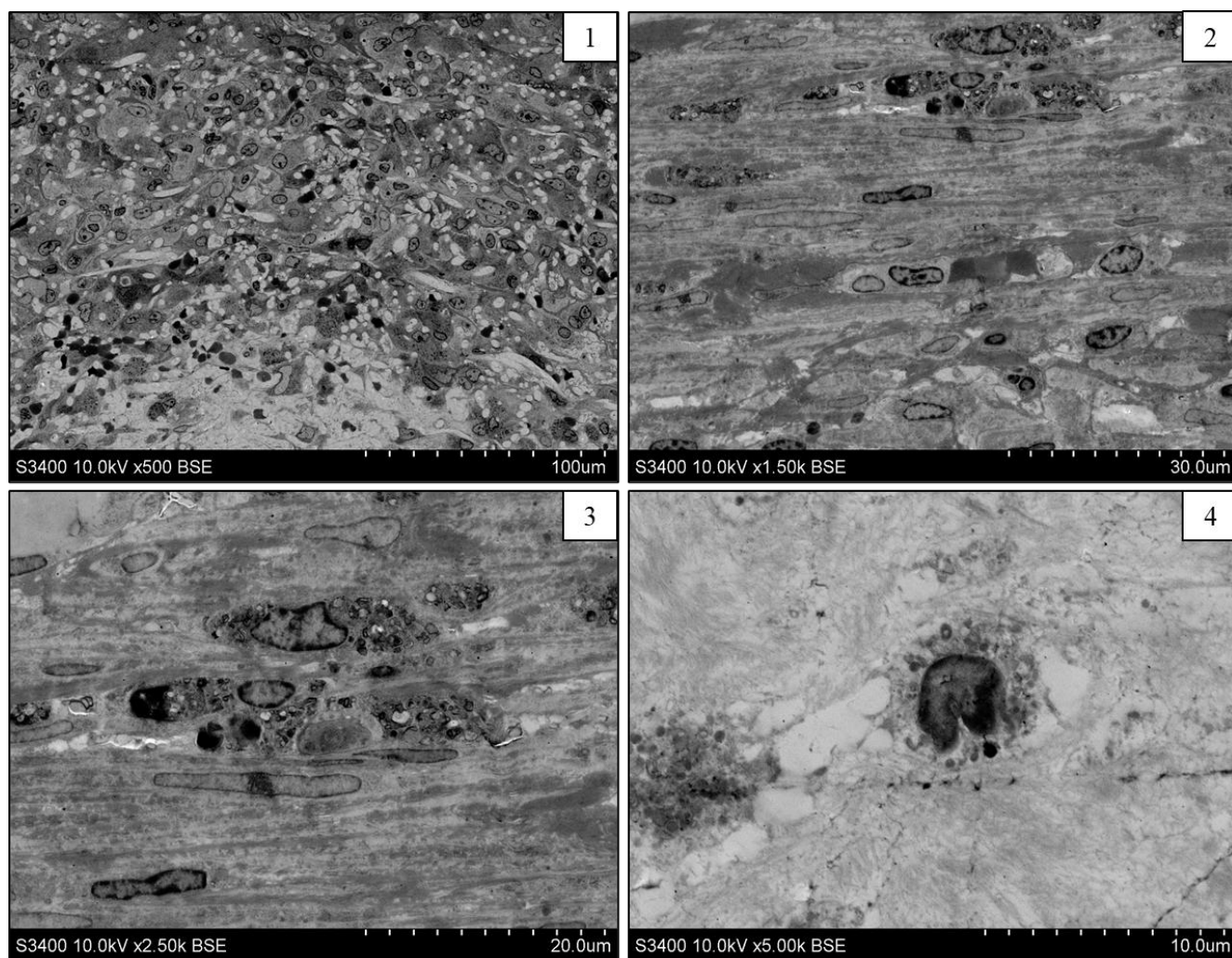


Рисунок 45 – Сканирующая электронная микроскопия эксплантированных матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) (опытная группа) – 7 суток имплантации: 1 – матрикс с клеточной инфильтрацией, ув.×500; 2 – толщина инфицированной раны, ув.×1000; 3 – клеточное наполнение ув.×1000; 4 – макрофаг, ув.×5000

По мере увеличения срока наблюдения в опытной группе матриц до 14 суток, результаты сканирующей электронной микроскопии показали значимое снижение количества воспалительных клеток в толще матрикса. Наблюдалось также усиление биodeградации самого полимерного матрикса (Рисунок 46).

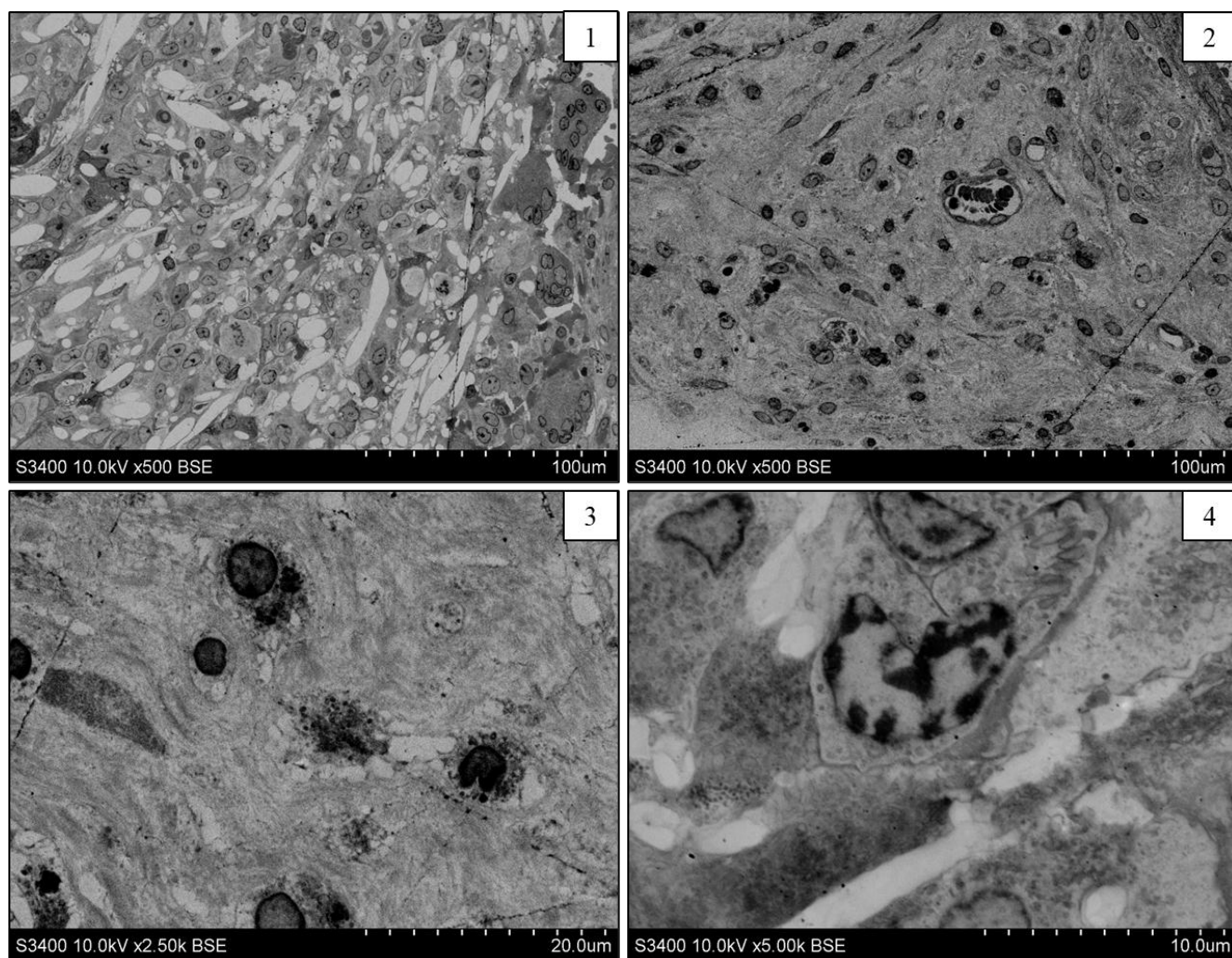


Рисунок 46 – Сканирующая электронная микроскопия эксплантированных матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) (опытная группа) – 14 суток имплантации: 1 – матрикс с клеточной инфильтрацией, ув.×500; 2 – толщина инфицированной раны с матриксом, ув.×1500; 3 – клеточное наполнение ув.×2500; 4 – гигантские многоядерные клетки, ув.×5000

Таким образом, полученная картина подтверждает отсутствие гнойного воспаления спустя 7 и 14 суток имплантации матриц ПКЛ/ПВП/Ил/А в инфицированную рану, что отражает прямое антибактериальное воздействие катионного амфифила.

Резюме

Доказана антибактериальная активность катионного амфифила, присоединенного к поверхности ПКЛ-матриков методом комплексообразования в концентрации 0,25 мг/мл. Уменьшение гнойного содержимого в ранах с матриксами ПКЛ/ПВП/Ил/А коррелировало с уменьшением размера гнойных капсул уже через 7 суток после имплантации, тогда как размер капсул с ПКЛ-матриксами и содержание в них гнойного содержимого к указанному сроку были больше. Спустя 7 суток вокруг матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А небольшие бактериальные скопления в основном обнаружены в периферической части инфицированной раны, тогда как в контрольной группе к указанному сроку выявлено наличие больших хаотично разбросанных скоплений бактерий вокруг ПКЛ-матриков. Клеточный состав, выявленный при морфологическом исследовании, подтвердил сохранение активного воспаления вокруг ПКЛ-матриков контрольной группы и его отсутствие вокруг матриков ПКЛ/ПВП/Ил/А. Спустя 14 суток в опытной группе произошло практически полное очищение раны от гнойного содержимого.

ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ С АТРОМБОГЕННЫМ И ПРОТИВОМИКРОБНЫМ ПОКРЫТИЕМ

5.1 Основные характеристики сосудистых протезов с атромбогенным и противомикробным покрытием

Исходя из опыта наших предыдущих исследований по получению ранних аневризм биodeградируемых сосудистых протезов в ходе долгосрочных преclinical испытаний на овцах, для данного исследования сосудистые ПКЛ-протезы с атромбогенным и противомикробным покрытием были изготовлены с внешней армирующей спиралью в качестве антианевризматической защиты [13].

По итогам стереомикроскопии не выявлено никаких внешних повреждений полимерного трубчатого каркаса ПКЛ, которые могли бы возникнуть в процессе формирования армирующей спирали методом экструзии (Рисунок 47).

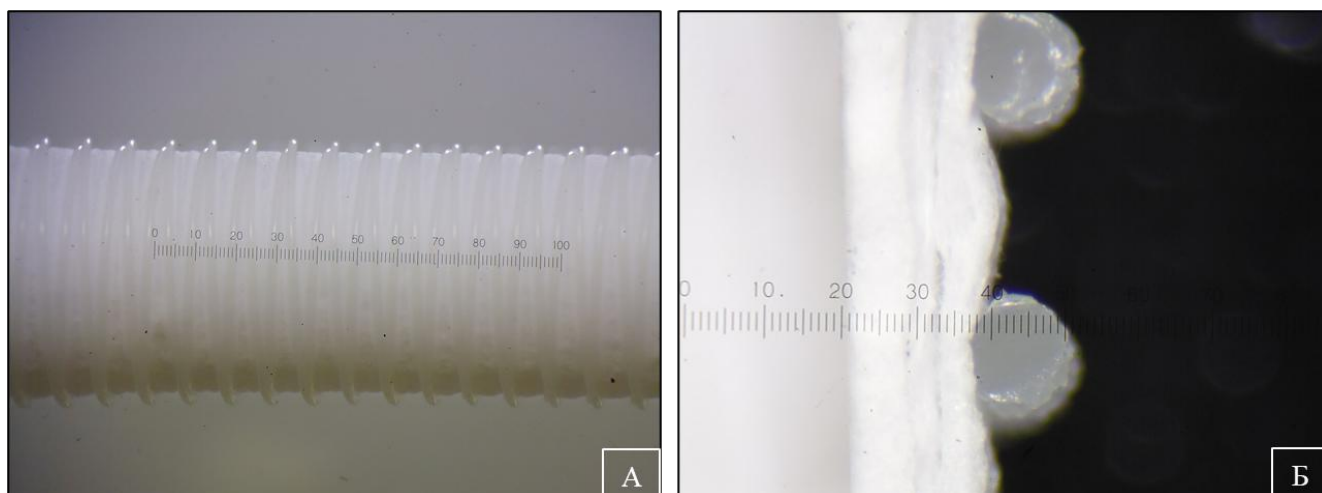


Рисунок 47 – Стереомикроскопия трубчатых ПКЛ-каркасов диаметром 4 мм, изготовленных методом электроспиннинга. А – внешний вид трубчатого каркаса с армирующей спиралью, ув. $\times 10$; Б – поперечный срез трубчатого каркаса с армирующей спиралью, ув. $\times 40$

Спекание обмоточной нити с поверхностью трубчатого ПКЛ-каркаса проходило строго под нитью с ее внедрением вглубь толщи стенки каркаса не более чем на 44 мкм (Рисунок 48). Диаметр обмоточной нити колебался в диапазоне

212-241 мкм. Толщина стенки сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А с учетом армирующей спирали не превысила 947 мкм (Рисунок 48). Формирование лекарственного покрытия на поверхности протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А, выполненное методом комплексообразования, не привело к изменению структуры внутренней и внешней поверхности протезов (Рисунок 48).



Рисунок 48 – Сканирующая электронная микроскопия сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А диаметром 4 мм

Критичное отличие полимерных сосудистых протезов от показателей сонной артерии овцы имело место лишь по модулю Юнга, который у протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А превысил значения модуля Юнга сонной артерии овцы в 13,3 раза, $p < 0,05$ (Таблица 12), [7]. Достоверных отличий между прочими показателями сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А и сонной артерии овцы не выявлено (Таблица 12).

Таблица 12 – Физико-механические свойства сосудистых протезов из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием в сравнении с сонной артерией овцы

Вид образца	n	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
		Продольное направление, Ме (Q1-Q3)		
ПКЛ/ПВП/Ил/А	6	1,35 (1,29-1,39)	201,2 (128,1-232,3)	6,5* (5,54-11,09)
Сонная артерия овцы	6	1,2 (1,06-1,9)	158,5 (126,0-169,5)	0,49 (0,39-0,66)

Примечание: *- $p < 0,05$ относительно сонной артерии овцы

5.2 Сравнительные результаты долгосрочной проходимости сосудистых протезов

5.2.1 Результаты аутоартериальной имплантации

Для оценки эффективности действия илопроста и амфифила в составе полимерных сосудистых протезов в сонные артерии овец имплантированы сосудистые протезы: ПКЛ/ПВП/Ил/А (опытная группа, n=12), ПКЛ (контрольная группа 1, n=6). Также выполнена аутоартериальная имплантация сонных артерий (контрольная группа 2, n=8) с целью оценки вклада хирургической манипуляции на сонной артерии овцы на повышение частоты тромбоза сонной артерии в отдаленном послеоперационном периоде. Срок наблюдения за имплантированными протезами составил 6 месяцев, за сонной артерией после аутоартериальной имплантации – 12 месяцев.

Известно, что овцы пригодны для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их крови к тромбообразованию, а сосудов – к кальцификации [13, 54, 152]. Данные особенности позволяют провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов, однако требуют понимания, в каком проценте случаев можно получить тромбоз артериального сосуда в случае проведения на нем хирургических манипуляций, аналогичных манипуляциям при имплантации сосудистого протеза в данный сосуд [13].

Так, спустя сутки после аутоартериальной имплантации по данным УЗИ в просвете одной из восьми реимплантированных сонных артерий выявлен обтурирующий тромб, еще в одной – флотирующий тромб в зоне проксимального анастомоза, не перекрывавший значимо просвет артерии (Рисунок 49).



Рисунок 49 – Прокладимость реимплантированной сонной артерии овцы по результатам ультразвукового исследования: А – до аутоартериальной имплантации; Б – через 1 сутки после аутоартериальной имплантации; В – через 12 месяцев после аутоартериальной имплантации

Спустя 12 месяцев наблюдения данная УЗИ-картина в реимплантированных участках сонных артерий овец сохранилась и была подтверждена результатами гистологического исследования эксплантированных образцов реимплантированных участков сонных артерий (Рисунок 49, 50).



Рисунок 50 – Результаты гистологического исследования реимплантированной сонной артерии овцы спустя 12 месяцев аутоартериальной имплантации, ув. $\times 100$

Результаты гистологического исследования показали присутствие пристеночного тромба в зоне анастомоза при аутоартериальной имплантации одной из сонных артерий. Несмотря на сужение просвета сосуда, кровоток в артерии был сохранен. Проведенное окрашивание по Ван-Гизону, а также гематоксилин-эозином и орсеином показало отсутствие деформаций и нарушений стенок реимплантированных артерий. Окрашивание ализариновым красным не выявило присутствия кальцификатов (Рисунок 50).

Таким образом, итоговая проходимость реимплантированных участков сонных артерий составила 87,5%, а стандартное хирургическое вмешательство на стенке сонной артерии овцы способно в 12,5% случаев провоцировать тромбоз, соответственно, который не обусловлен свойствами имплантируемого сосудистого протеза.

5.2.2 Результаты имплантации немодифицированных сосудистых протезов

Сосудистые протезы ПКЛ (контрольная группа 1) спустя 1 месяц имплантации сохраняли свою проходимость в 33,3% случаев (Рисунок 51). Спустя 6 месяцев имплантации просвет сосудистых протезов ПКЛ в 100,0% случаев был занят обтурирующим тромбом (Рисунок 51).



1 месяц после имплантации



6 месяцев после имплантации

Рисунок 51 – Результаты УЗИ-мониторинга проходимости сосудистых протезов ПКЛ

На внешней поверхности экспантированных немодифицированных сосудистых протезов ПКЛ визуализировалась сохранная обмоточная спираль (Рисунок 52 А). На поперечном срезе просвет всех протезов ПКЛ был занят организованным тромбом (Рисунок 52 Б).

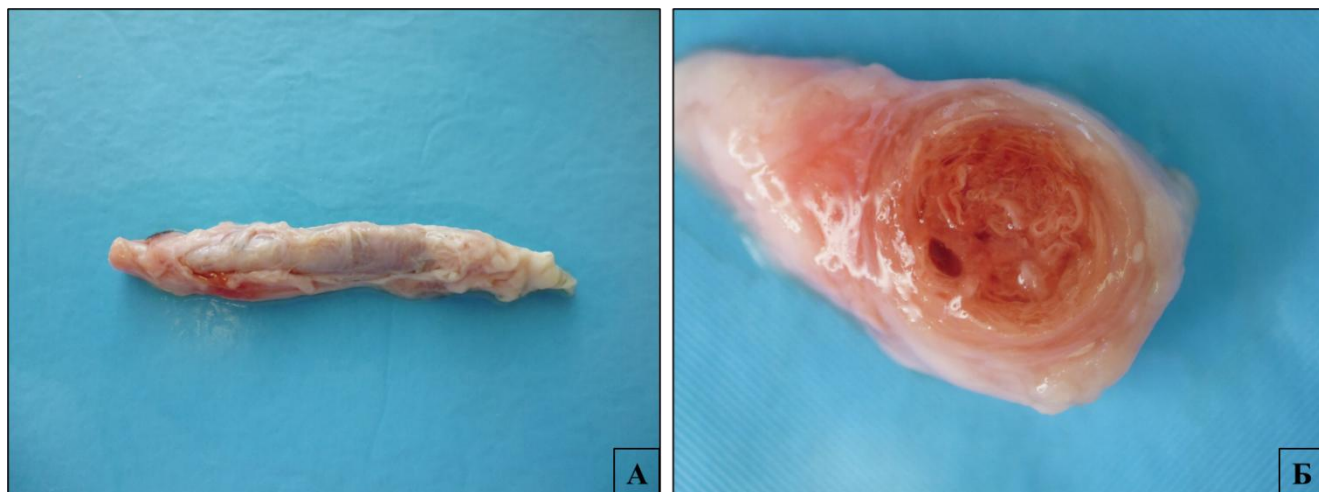
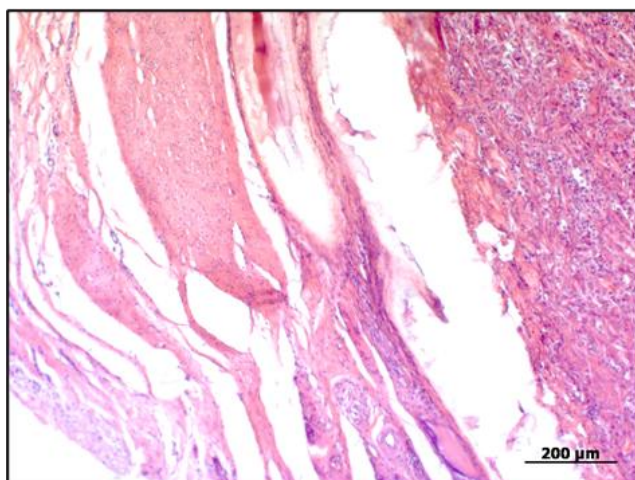


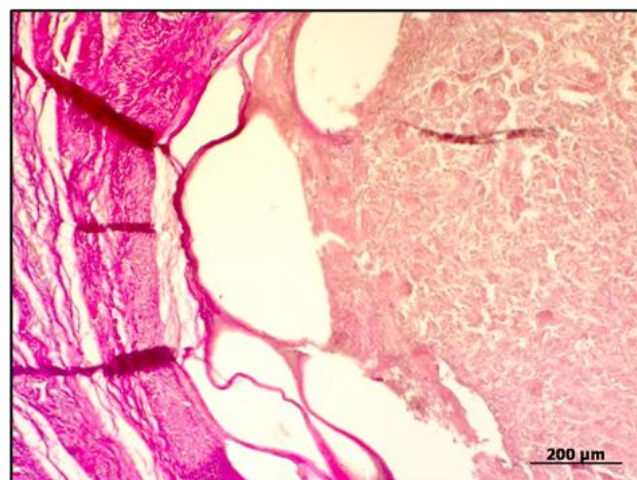
Рисунок 52 – Вид сосудистого протеза ПКЛ спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы: А – вид целого протеза; Б – вид протеза на поперечном срезе

По причине тромбоза сосудистые протезы ПКЛ демонстрировали низкую эффективность в плане ремоделирования (Рисунок 53).

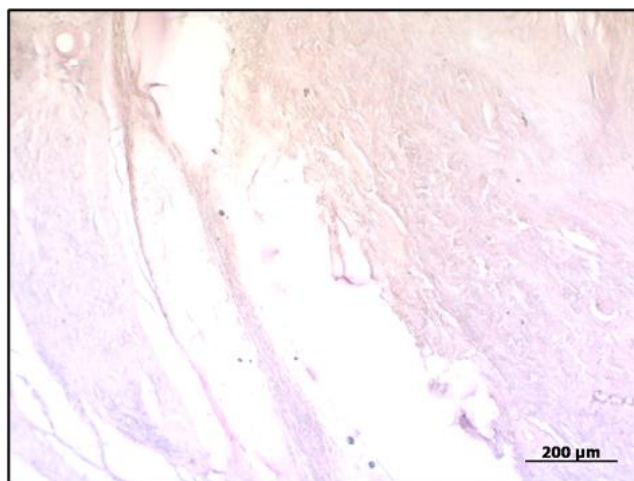
**Гематоксилин-эозин,
световая микроскопия**



**Ван-Гизон,
световая микроскопия**



**Ализариновый красный С,
световая микроскопия**



**Ализариновый красный С,
флуоресцентная микроскопия**

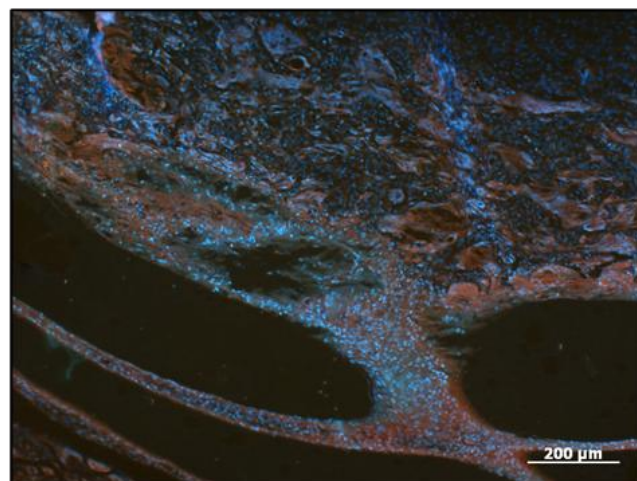


Рисунок 53 – Результаты гистологического исследования эксплантированных немодифицированных сосудистых протезов ПКЛ спустя 6 месяцев имплантации, ув. $\times 100$

Просвет эксплантированных сосудистых протезов ПКЛ был занят организованным реканализированным тромбом (Рисунок 53). Трубчатые каркасы протезов ПКЛ, несмотря на раннее тромбообразование, практически полностью резорбировались и заместились новообразованной тканью, состоящей из коллагеновых волокон и клеток моноцитарно-макрофагального и фибробластического ряда (Рисунок 53). Обмоточная спираль ПКЛ визуализировалась в неизменном виде и была окружена тонкой

соединительнотканной капсулой. В стенках протезов ПКЛ обнаружены vasa vasorum. Признаков воспаления и кальцификации в контрольной группе протезов не выявлено (Рисунок 53). По результатам иммунофлуоресцентного исследования просвет протезов ПКЛ был заполнен тромбом (Рисунок 54).

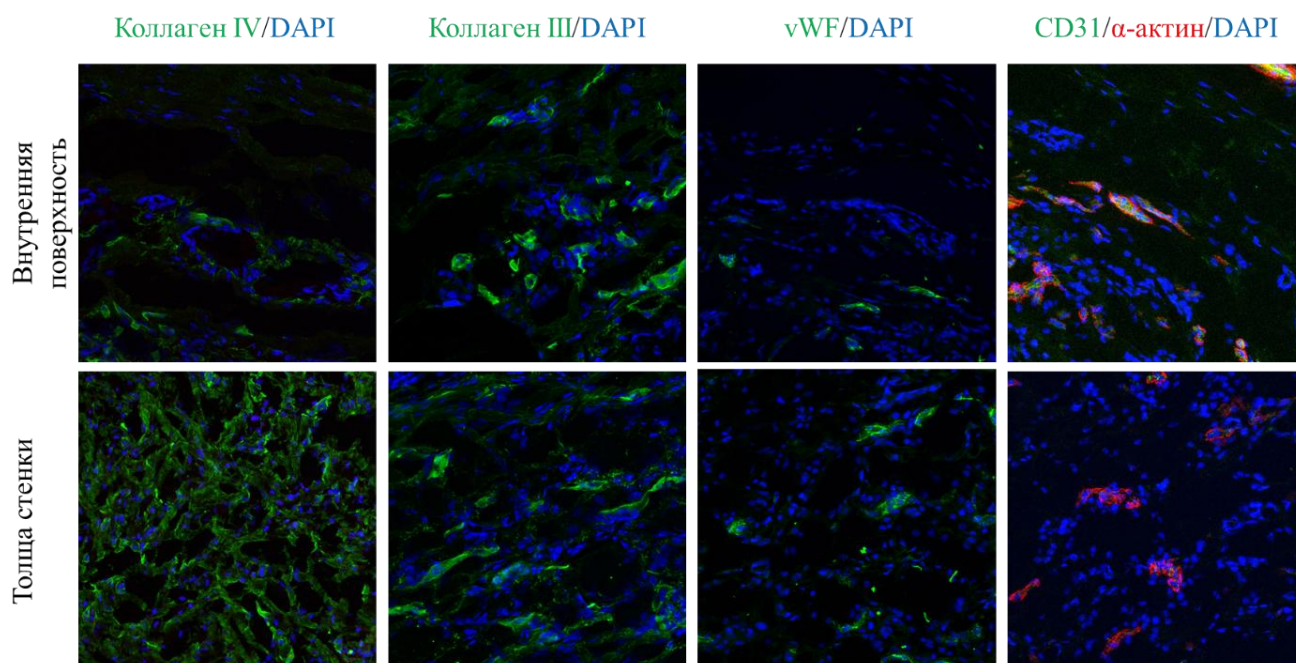


Рисунок 54 – Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных немодифицированных сосудистых протезов ПКЛ спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: панель CD31/ α -actin/DAPI: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие α -actin (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. $\times 200$, [7]

В толще стенки немодифицированных протезов ПКЛ обнаружены немногочисленные зрелые эндотелиальные клетки $CD31^+/vWF^+$, которые преимущественно выстилали vasa vasorum. Также определялись единичные клетки, содержащие α -актин. Коллагены III и IV типов локализовались преимущественно в толще резорбированной стенки протезов (Рисунок 54). Результаты сканирующей электронной микроскопии эксплантированных

образцов немодифицированных протезов ПКЛ подтвердили результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований (Рисунок 55).

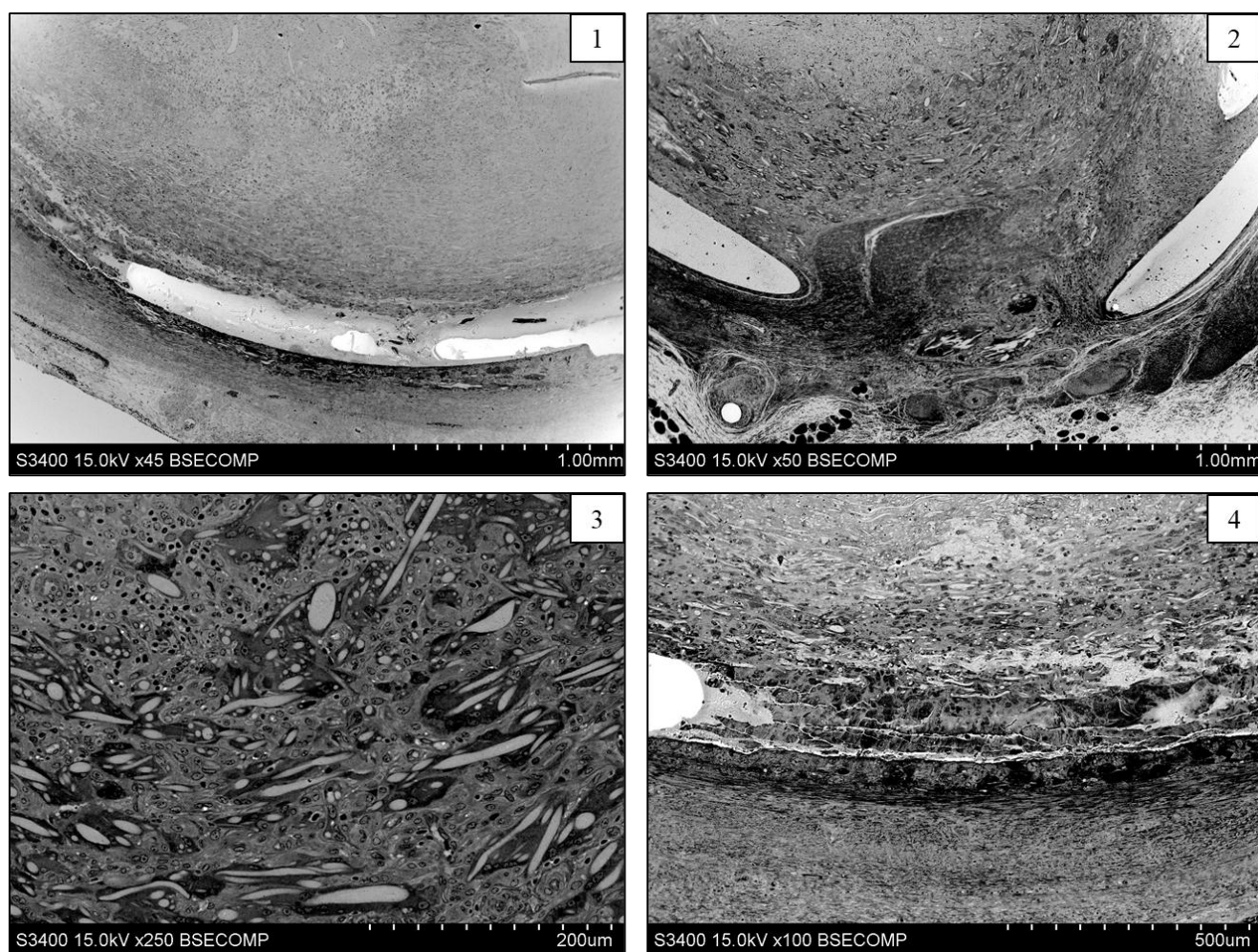


Рисунок 55 – Результаты сканирующей электронной микроскопии немодифицированных сосудистых протезов ПКЛ спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: 1 – общий вид тромбированного сосудистого протеза, ув.×45; 2 – нити армирующей спирали, ув.×50; 3 – фрагменты полимера, окруженные гигантскими многоядерными клетками, макрофагами, vasa vasorum, ув.×250; 4 – средний слой ремоделированного протеза, ув.×100

Помимо ранее описанных морфологических особенностей процессов ремоделирования протезов немодифицированных ПКЛ в толще их стенки выявлено умеренное гранулематозное воспаление с очаговыми скоплениями гигантских многоядерных и макрофагальных клеток вокруг оставшихся полимерных нитей (Рисунок 55).

5.2.3 Результаты имплантации сосудистых протезов с атромбогенным и противомикробным покрытием

Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А (опытная группа) непосредственно после имплантации в сонные артерии овец демонстрировали сохранение кровотока в 100,0% случаев (Рисунок 56).

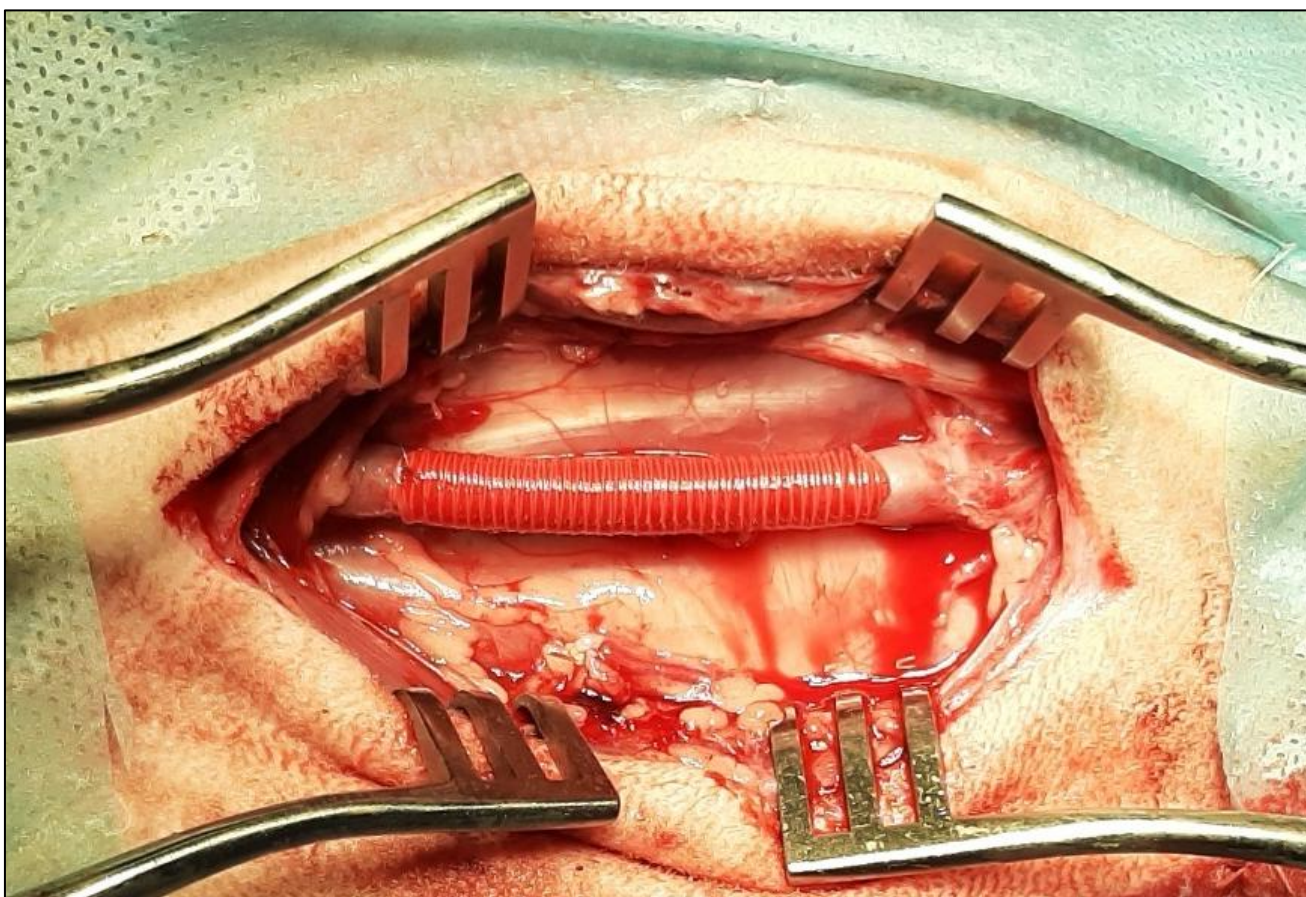
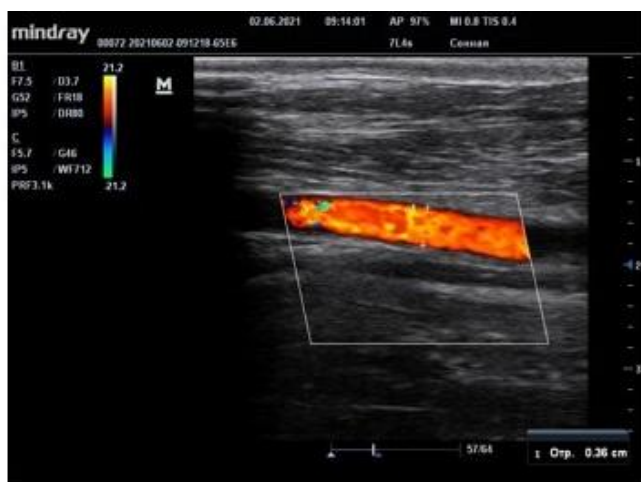
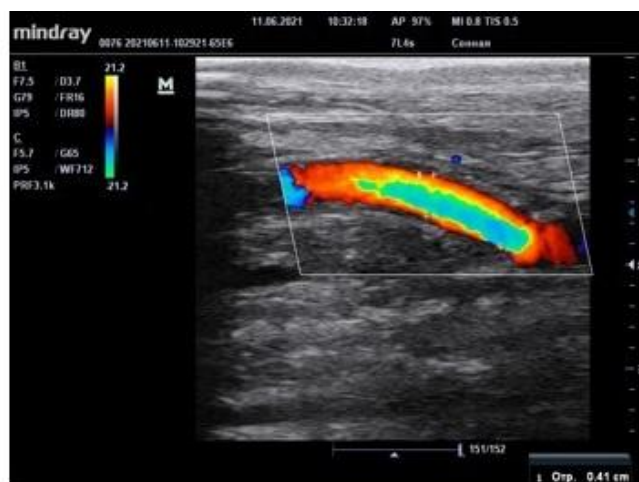


Рисунок 56 – Вид имплантированного сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А после запуска кровотока

Спустя 1 месяц после имплантации сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А сохраняли свою проходимость в 83,3% случаев (Рисунок 57). Через 6 месяцев имплантации проходимость протезов снизилась до 50,0% (Рисунок 57).



1 месяц после имплантации



6 месяцев после имплантации

Рисунок 57 – Результаты УЗИ-мониторинга проходимости сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А

Спустя 6 месяцев имплантации выявлена сохранность диаметра сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А, отсутствие аневризм и разрушения внешней армирующей спирали (Рисунок 58 А).



Рисунок 58 – Вид экспантированного сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овцы: А – макрофото; Б – стереомикроскопия, ув. $\times 10$

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 58 Б). На поперечном срезе стенки ремоделированного сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А визуализировалась неоинтима и неоадвентиция (Рисунок 58 Б).

По результатам гистологического исследования выявлено, что через шесть месяцев имплантации полимерный каркас сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А практически полностью резорбировался и заместился новообразованной сосудистой тканью. Нити обмоточной спирали сохранили свою целостность (Рисунок 59).



Рисунок 59 – Результаты гистологического исследования эксплантированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонные артерии овец, ув. $\times 100$

На внутренней поверхности протезов сформировалась тонкая неоинтима, со стороны просвета сосудистого протеза на всем протяжении выстланная монослоем эндотелиоподобных клеток (Рисунок 59). Средний слой представлен остатками полимера, фибробластами, макрофагами, единичными гигантскими многоядерными клетками инородного тела и коллагеновыми волокнами в большом количестве (Рисунок 59). Неоадвентиция содержала большое количество коллагеновых волокон и *vasa vasorum*, а также единичные фибробластоподобные

и гигантские многоядерные клетки. Однако в составе новообразованной сосудистой ткани отсутствовали эластические волокна (Рисунок 59). Тем не менее, ремоделированная стенка сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А по строению была во многом схожа со стенкой нативной артерии.

Неоинтима эксплантированных протезов покрыта эндотелиальными клетками $CD31^+vWF^+$. Субэндотелиальный слой представлен коллагеном IV типа (Рисунок 60).

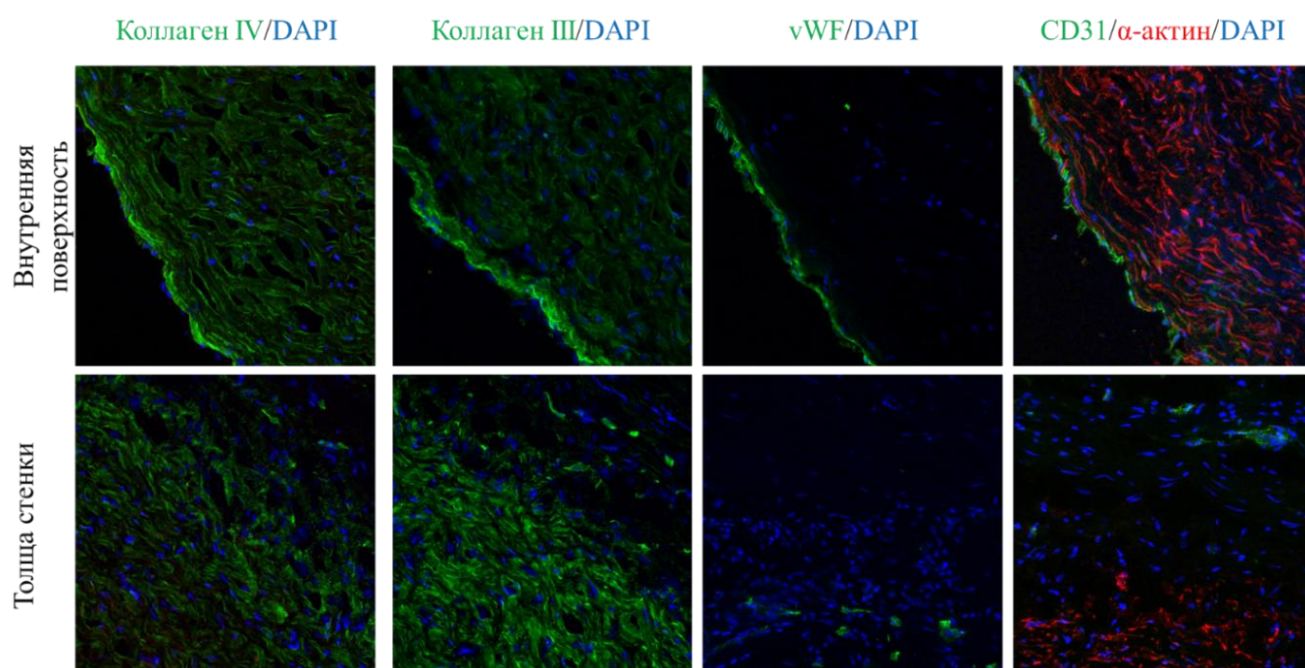


Рисунок 60 – Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: панель $CD31/\alpha\text{-actin}/DAPI$: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие $\alpha\text{-actin}$ (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. $\times 200$, [7]

Неоинтима состояла из клеток, содержащих α -актин, и коллагенов III и IV типа (Рисунок 60). 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*.

Подтверждающие результаты получены методом СЭМ (Рисунок 61).

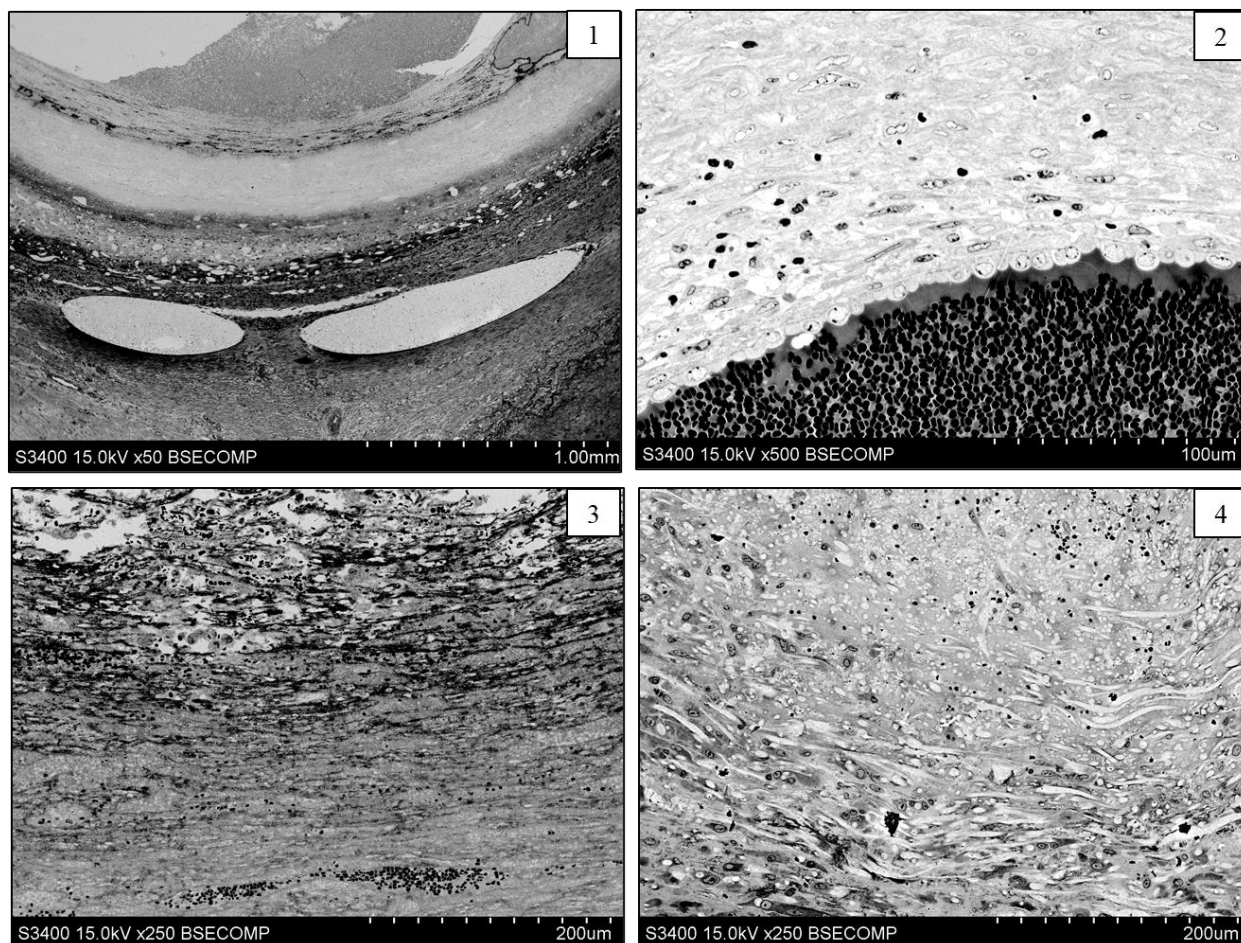


Рисунок 61 – Результаты сканирующей электронной микроскопии сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: 1 – общий вид протеза, ув.×50; 2 – эндотелиальный монослой на неоинтима со стороны просвета, ув.×500; 3 – толщина неоинтимы, ув.×250; 4 – средний слой с фрагментами полимера и единичными гигантскими многоядерными клетками, макрофагами, *vasa vasorum*, ув.×250

Признаки воспаления и кальцификации стенок протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А не выявлены. Гладкомышечноподобные клетки визуализировались преимущественно в неоинтима. Основной полимерный каркас был замещен клетками и соединительной тканью (Рисунок 61). При этом обращает на себя внимание значительно меньшее количество гигантских многоядерных клеток и

макрофагов вокруг оставшихся полимерных волокон основного каркаса протеза. Снаружи протезов формировался слой, аналогичный адвентициальной оболочке, состоявший из элементов соединительной ткани, фибробластоподобных клеток, макрофагов, единичных гигантских многоядерных клеток инородного тела (Рисунок 61).

Таким образом, при сравнительном изучении особенностей ремоделирования сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А были получены доказательства эффективности лекарственного покрытия, содержащего илопрост и катионный амфифил. Поверхностное модифицирование илопростом высокопористой стенки протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А способствовало повышению процента проходимых протезов спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец. Антибактериальный эффект катионного амфифила не прослеживался столь ярко в силу отсутствия инфицированности операционного поля или микробного обсеменения самого протеза, однако отмечено снижение выраженности гранулематозного воспаления стенки протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А в процессе их биорезорбции в сравнении с немодифицированными аналогами – сосудистыми протезами ПКЛ.

5.2.4 Результаты протеомного профилирования

Для сравнения молекулярного состава ремоделированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/ИЛ/А спустя 6 месяцев имплантации с молекулярным составом интактных контралатеральных сонных артерий овец проведено парное протеомное профилирование [59]. Анализ основных компонент показал четкое различие интактных сонных артерий и сосудистых протезов (Рисунок 62 А), [59]. Количество уникальных или значительно активированных белков составило 145 в интактных сонных артериях и 128 – в сосудистых протезах (Рисунок 62 Б), [59].

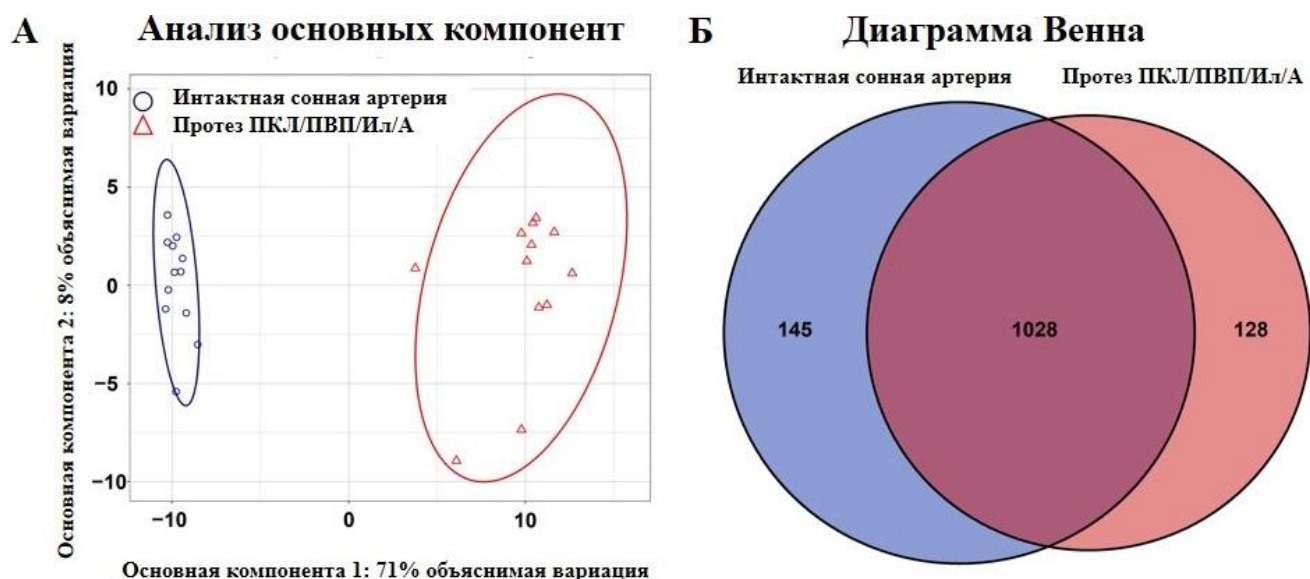


Рисунок 62 – Анализ протеомики сосудистых протезов и контралатеральных интактных сонных артерий с помощью ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией: А – анализ основных компонент; Б – диаграмма Венна; [59]

При анализе в базе данных COMPARTMENTS выявлено большее содержание белков цитоскелета в нативных сонных артериях: (56 из 145 (38,6%) уникальных или дифференциально экспрессируемых белков) в сравнении с сосудистыми протезами ПКЛ/ПВП/Ил/А (26 из 128 (20,3%) уникальных или дифференциально экспрессируемых белков), (Таблица 13), [59].

Таблица 13 – Распределение белков по клеточным компартментам

Органелла	Нативные сонные артерии	Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А	Значение p
Цитоскелет	56/145 (38,6%)	26/128 (20,3%)	0,001
Лизосома	8/145 (5,5%)	28/128 (21,9%)	0,0001
Эндосома	5/145 (3,4%)	20/128 (15,6%)	0,0005
Эндоплазматический ретикулум	22/145 (15,2%)	25/128 (19,5%)	0,35
Цитозоль	91/145 (62,8%)	81/128 (63,3%)	0,93
Внеклеточный матрикс	93/145 (64,1%)	78/128 (60,9%)	0,59
Ядро	54/145 (37,2%)	51/128 (39,8%)	0,66
Митохондрии	13/145 (9,0%)	16/128 (12,5%)	0,35
Клеточная мембрана	64/145 (44,1%)	45/128 (35,2%)	0,13
Аппарат Гольджи	9/145 (6,2%)	13/128 (10,2%)	0,23

Напротив, лизосомальные и эндосомальные белки были в избытке в протезах ПКЛ/ПВП/Ил/А (28/128 (21,9%) и 20/128 (15,6%) белков соответственно) по сравнению с нативными сонными артериями (8/145 (5,5%) и 5/145 белков (3,4%), соответственно (Таблица 13). Распределение белков, связанных с другими органеллами, не имело статистически значимых различий (Таблица 13).

Анализ в базах Gene Ontology (GO) Cellular Component и UniProtKB Keywords указал на обилие компартментов, относящихся к цитоскелету (волокон, фокальная адгезия, актин и общий цитоскелет) и базальной мембране в интактных сонных артериях, в то время как сосудистые протезы демонстрируют повышенную экспрессию белков лизосомального, эндосомального, эндоплазматического ретикулума (в частности, гладкого эндоплазматического ретикулума) и промежуточного компартмента эндоплазматического ретикулума-Гольджи), (Таблица 14, 15), [59].

Таблица 14 – Распределение белков, активированных в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с тромбогенным и противомикробным покрытием по различным клеточным компартментам (аннотировано в соответствии с базой данных Gene Ontology Cellular Component)

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение p
Интактные сонные артерии				
Актиновые стресс-волокна	72	17	33,8	$4,11 \times 10^{-18}$
Миофибриллы	244	31	18,2	$2,36 \times 10^{-26}$
Базальная мембрана	101	11	15,6	$2,14 \times 10^{-8}$
Интегрин-зависимые адгезионные комплексы	423	41	13,9	$2,65 \times 10^{-31}$
Актиновый цитоскелет	510	37	10,4	$4,78 \times 10^{-24}$
Внеклеточный матрикс, содержащий коллаген	434	24	7,9	$8,82 \times 10^{-13}$
Внеклеточный матрикс	575	24	6,0	$2,50 \times 10^{-10}$
Внеклеточный везикул	2123	82	5,5	$1,96 \times 10^{-39}$
Белки цитоскелета	2401	57	3,4	$1,40 \times 10^{-15}$

Продолжение таблицы 14 – Распределение белков, активированных в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием по различным клеточным компартментам (аннотировано в соответствии с базой данных Gene Ontology Cellular Component)

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение p
Интактные сонные артерии				
Внеклеточное пространство	4396	92	3,0	$1,95 \times 10^{-25}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Гладкая эндоплазматическая сеть	32	3	15,1	$2,59 \times 10^{-2}$
Промежуточный компартмент эндоплазматической сети и аппарата Гольджи	135	6	7,1	$6,11 \times 10^{-3}$
Внеклеточный матрикс, содержащий коллаген	434	15	5,6	$5,95 \times 10^{-6}$
Лизосома	749	28	6,0	$4,49 \times 10^{-12}$
Везикула с белковым покрытием	310	11	5,7	$1,88 \times 10^{-4}$
Внеклеточный везикул	2123	70	5,3	$5,60 \times 10^{-32}$
Внеклеточный матрикс	575	15	4,2	$1,53 \times 10^{-4}$
Эндосома	1036	22	3,4	$2,35 \times 10^{-5}$
Внеклеточная область	4396	79	2,9	$3,00 \times 10^{-20}$
Эндоплазматический ретикулум (сеть)	2045	29	2,3	$6,96 \times 10^{-4}$

Примечание: ПКЛ – поликапролактон; ПВП – поливинилпирролидон; Ил – илопрост; А – катионный амфифил

Таблица 15 – Распределение белков, активированных в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием по различным клеточным компартментам (аннотировано в соответствии с базой данных ключевых слов UniProtKB)

Категория UniProtKB Keywords	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Базальная мембрана	7	4,6	22,0	$3,2 \times 10^{-6}$
Внеклеточный матрикс	14	9,3	6,9	$6,7 \times 10^{-7}$
Цитоскелет	41	27,2	4,2	$4,0 \times 10^{-14}$
Клеточные контакты	24	15,9	3,7	$6,1 \times 10^{-7}$
Цитоплазма	88	58,3	2,2	$4,1 \times 10^{-16}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Лизосома	16	12,5	6,3	$8,8 \times 10^{-7}$
Цитоплазматический везикул	15	11,7	3,2	$2,2 \times 10^{-3}$
Клеточные контакты	14	10,9	2,4	$3,4 \times 10^{-2}$
Цитоскелет	20	15,6	2,2	$9,6 \times 10^{-3}$
Цитоплазма	66	51,6	1,8	$8,8 \times 10^{-7}$

По данным баз GO Molecular Functions и UniProtKB Key-words интактные сонные артерии содержали больше белков цитоскелета и белков, ответственных за связывание ламинина, интегрин, актина (Таблица 16, 17), [59]. Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А содержали больше белков, связывающих развернутый белок, шаперон и сворачивание белка (Таблица 16, 17), [59]. Также преобладали белки, обеспечивающие протон-транспортную АТФазную активность (Таблица 16), [59].

Таблица 16 – Молекулярные функции белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных молекулярных функций Gene Ontology), [58]

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Связывающие с ламинином	28	5	25,5	$8,45 \times 10^{-4}$
Связывание с интегрином	159	15	13,5	$7,24 \times 10^{-10}$
Связывание с актином	451	35	11,1	$4,67 \times 10^{-22}$
Связывание с коллагеном	70	5	10,2	$2,14 \times 10^{-2}$
Связывание с белками цитоскелета	1006	44	6,2	$1,78 \times 10^{-19}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Активность протон-трансформирующей АТФазы ротационного механизма	24	6	40,2	$1,85 \times 10^{-5}$
Связывание с коллагеном	70	6	13,8	$1,57 \times 10^{-3}$
Шаперон, участвующий в фолдинге белка	68	5	11,8	$1,31 \times 10^{-2}$
Связывание несвернутых белков	124	7	9,1	$3,30 \times 10^{-3}$
Связывание шаперонов	107	6	9,0	$1,21 \times 10^{-2}$

Таблица 17 – Молекулярные функции белков, активированные в интактных сонных артериях и в сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных ключевых слов UniProtKB)

Категория UniProtKB Keywords	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Мышечный белок	13	8,6	24,2	$2,8 \times 10^{-12}$
Интегрин	5	3,3	12,9	$6,2 \times 10^{-3}$
Связывающий актин	24	15,9	9,9	$3,7 \times 10^{-15}$
Оксидоредуктаза	15	9,9	2,9	$6,2 \times 10^{-3}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Кэпирование актина	4	3,1	26,4	$7,0 \times 10^{-3}$
Шаперон	10	7,8	5,6	$2,1 \times 10^{-3}$
Связывающий актин	11	8,6	4,8	$2,1 \times 10^{-3}$

Кроме того, согласно GO Biological Process, в интактных сонных артериях усиливалось развитие мышечных клеток, интегринопосредованный сигнальный путь, организация базальной мембраны, актинового цитоскелета, миофибрилл (Таблица 18), [59].

Таблица 18 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных биологических процессов Gene Ontology)

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Деполимеризация актиновых филаментов	12	4	47,7	$7,46 \times 10^{-4}$
Организация базальной мембраны	30	5	23,8	$8,01 \times 10^{-4}$
Сборка актиновых стресс-волокон	18	3	23,8	$3,23 \times 10^{-2}$
Сборка миофибрилл	62	10	23,1	$5,04 \times 10^{-8}$
Сборка интегрин-зависимых адгезионных комплексов	28	4	20,4	$7,90 \times 10^{-3}$

Продолжение таблицы 18 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных биологических процессов Gene Ontology)

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Сборка белков внеклеточного матрикса	35	4	16,3	$1,54 \times 10^{-2}$
Развитие эндотелиальных клеток	51	5	14,0	$5,61 \times 10^{-3}$
Интегрин-опосредованный путь передачи сигнала	101	9	12,7	$2,35 \times 10^{-5}$
Развитие мышечных клеток	160	14	12,5	$1,79 \times 10^{-8}$
Клеточная детоксикация	108	8	10,6	$3,52 \times 10^{-4}$
Мышечное сокращение	230	15	9,3	$1,15 \times 10^{-7}$
Организация актинового цитоскелета	549	30	7,8	$2,53 \times 10^{-14}$
Межклеточная адгезия	543	20	5,3	$1,14 \times 10^{-6}$
Организация внеклеточного матрикса	280	10	5,1	$4,99 \times 10^{-3}$
Организация цитоскелета	1240	39	4,5	$5,38 \times 10^{-12}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Восстановление пула НАДФН	16	4	40,2	$2,33 \times 10^{-3}$
Метаболизм пентоза	12	3	40,2	$1,67 \times 10^{-2}$
Метаболизм глюкозо-6-фосфата	23	5	35,0	$4,58 \times 10^{-4}$
Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)	31	4	20,8	$1,26 \times 10^{-2}$
Метаболизм коллагена	61	7	18,5	$2,94 \times 10^{-4}$
Метаболизм НАДФ	37	4	17,4	$1,89 \times 10^{-2}$
Катаболизм коллагена	41	4	15,7	$2,32 \times 10^{-2}$

Продолжение таблицы 18 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных биологических процессов Gene Ontology)

Категория Gene Ontology	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Снижение внутриклеточного pH	50	4	12,9	$3,88 \times 10^{-2}$
Шаперон-опосредованный фолдинг белка	71	5	11,3	$1,79 \times 10^{-2}$
Реакция на несвернутый белок	123	6	7,8	$2,16 \times 10^{-2}$
Фолдинг белка	221	9	6,5	$4,17 \times 10^{-3}$
Образование метаболитов-предшественников и энергии	406	12	4,7	$3,74 \times 10^{-3}$
Метаболизм углеводов	475	11	3,7	$2,76 \times 10^{-2}$
Метаболизм производных углеводов	1005	22	3,5	$3,50 \times 10^{-4}$
Регуляция протеолиза	743	14	3,0	$3,04 \times 10^{-2}$

Сосудистые протезы показали признаки метаболизма глюкозы, пентозы, нуклеотидов, НАДФ/НАДФН и коллагена, выработки энергии, фолдинга белка и регуляции протеолиза, включая подкисление (Таблица 18).

Анализ базы данных Reactome выявил согласующиеся результаты, поскольку термины, связанные с взаимодействием интегрина, синдекана и ламинина, биосинтезом дерматана и хондроитинсульфата, образованием фибронектинового матрикса, протеогликанами внеклеточного матрикса, сокращением гладких мышц и образованием эластических волокон, были выражено представлены в интактных сонных артериях (Таблица 19).

Таблица 19 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных Reactome)

Категория Reactome	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Формирование фибронектинового матрикса	6	3	71,5	$1,80 \times 10^{-3}$
Сокращение гладких мышц	39	16	58,7	$7,34 \times 10^{-19}$
Взаимодействие клетка-внеклеточный матрикс	18	7	55,6	$1,04 \times 10^{-7}$
Взаимодействие с ламинином	30	11	52,4	$2,70 \times 10^{-12}$
Репарация белка	6	2	47,7	$4,07 \times 10^{-2}$
Биосинтез дерматансульфата	11	3	39,0	$5,86 \times 10^{-3}$
Биосинтез хондроитинсульфата	19	3	22,6	$1,79 \times 10^{-2}$
Неинтегриновое взаимодействие мембраны с ВКМ	59	9	21,8	$2,82 \times 10^{-7}$
Протеогликаны внеклеточного матрикса	76	11	20,7	$1,10 \times 10^{-8}$
Интегриновый сигналинг	26	3	16,5	$3,49 \times 10^{-2}$
Синдекан-опосредованное взаимодействие	27	3	15,9	$3,76 \times 10^{-2}$
Формирование эластических волокон	45	5	15,9	$1,72 \times 10^{-3}$
Молекулы, ассоциированные с эластическими волокнами	38	4	15,0	$9,95 \times 10^{-3}$
Взаимодействия интегринов на клеточную поверхность	84	8	13,6	$3,95 \times 10^{-5}$
Организация клеточных контактов	91	8	12,6	$5,87 \times 10^{-5}$

Продолжение таблицы 19 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных Reactome)

Категория Reactome	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Пентозофосфатный путь	15	4	42,9	$6,58 \times 10^{-4}$
Возврат рецептора инсулина	26	6	37,1	$1,63 \times 10^{-5}$
Образование АФК и ААК в фагоцитах	36	6	26,8	$4,90 \times 10^{-5}$
Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса)	22	3	21,9	$2,49 \times 10^{-2}$
Сборка коллагеновых фибрилл и других мультимерных структур	60	6	16,1	$5,17 \times 10^{-4}$
Деградация коллагена	64	6	15,1	$6,50 \times 10^{-4}$
Формирование коллагена	89	8	14,5	$3,87 \times 10^{-5}$
Биосинтез коллагена и модифицирующих ферментов	67	5	12,0	$6,95 \times 10^{-3}$
Отпочковывание везикул от транс-сети Гольджи	72	5	11,2	$8,98 \times 10^{-3}$
Деградация внеклеточного матрикса	140	8	9,2	$5,71 \times 10^{-4}$
Элонгация эукариотической трансляции	94	5	8,6	$2,03 \times 10^{-2}$
Антероградный транспорт из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи	155	6	6,2	$2,54 \times 10^{-2}$
Н-связанное гликозилирование по аспарагину	305	10	5,3	$2,56 \times 10^{-3}$
Транспорт в аппарат Гольджи и последующая модификация	186	6	5,2	$4,94 \times 10^{-2}$
Мембранный трафик	626	12	3,1	$2,95 \times 10^{-2}$

Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А продемонстрировали сверхэкспрессию белков, участвующих в цикле трикарбоновых кислот, пентозофосфатном пути, биосинтезе, сборке, образовании и деградации коллагена, удлинении трансляции, транспорте из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи и продукции активных форм кислорода/азота (Таблица 19).

В соответствие с базой данных KEGG в интактных сонных артериях обнаружена повышенная регуляция актинового цитоскелета и фокальная адгезия. В сосудистых протезах ПКЛ/ПВП/Ил/А, напротив, отмечена высокая лизосомальная и фагосомная активность, а также повышенный метаболизм углерода и аминокислот (Таблица 20), [59].

Таблица 20 – Биологические процессы с участием белков, активированные в интактных сонных артериях и в сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием (аннотировано в соответствии с базой данных Киотской энциклопедии генов и геномов)

Категория KEGG	Всего белков	Дифференциально экспрессированные белки	Кратность изменения	Значение Р
Интактные сонные артерии				
Взаимодействие рецепторов внеклеточного матрикса	12	7,9	13,4	$5,8 \times 10^{-8}$
Интегрин-зависимые адгезионные комплексы	24	15,9	11,7	$1,5 \times 10^{-16}$
Сокращение сосудистых гладких мышц	10	6,6	7,3	$1,3 \times 10^{-4}$
Регуляция актинового цитоскелета	16	10,6	7,2	$9,6 \times 10^{-8}$
Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А				
Лизосома	14	10,9	9,3	$4,3 \times 10^{-7}$
Углеродный метаболизм	11	8,6	8,4	$3,8 \times 10^{-5}$
Фагосома	13	10,2	7,5	$1,1 \times 10^{-5}$
Биосинтез аминокислот	6	4,7	7,0	$3,0 \times 10^{-2}$
Метаболические пути	38	29,7	2,2	$7,2 \times 10^{-5}$

Детальный анализ уникальных и дифференциально экспрессируемых белков выявил большое количество в интактных сонных артериях сократительных белков, служащих маркерами сократительных гладкомышечных клеток (СГМК) (7/145); белков внеклеточного матрикса, составляющих базальную мембрану (16/145), и белков антиоксидантной защиты (5/145), включая Cu-Zn, митохондриальную супероксиддисмутазу и глутатион S-трансферазу (Рисунок 63).

Сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А почти не содержали наиболее 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 (Рисунок 63).

Уникальные и дифференцированно экспрессируемые белки									
Категория	Белок	Описание	UniProt	Уникальные пептиды	Интактные сонные артерии		Сосудистые протезы ПК.Л/ПВ/И.Л/А		Кратность изменения
					Средняя площадь пика	n	Средняя площадь пика	n	
Белки уникальные или повышенные в интактных сонных артериях									
Уникальные белки									
VSMC	SYNEM	Сивемин	O15061	12	41540	11	0	0	Уникально
VSMC	MYH11	Миозин-II (тяжелая цепь миозина гладких мышц)	P35749	31	28981	10	0	0	Уникально
VSMC	SMTN	Смугелин	P53814	17	25656	10	0	0	Уникально
Сверхэкспрессированные белки									
VSMC	CNN1	Кальпонин-1	P51911	44	3528030	12	60424	8	58.4
VSMC	TAGL	Трагстелин-2	Q01995	42	14350803	12	293487	12	48.9
VSMC	DESM	Десмин	P17661	43	205282	12	12445	1	16.5
VSMC	ACTA	Актин, гладкая мускулатура аорты (α -гладкомышечный актин)	P62736	52	290095	12	30808	5	9.4
Уникальные белки									
BM	LAMC1	Субъединица ламинина γ -1	P11047	28	81845	12	0	0	Уникально
BM	LAMB2	Субъединица ламинина β -2	P55268	28	75025	12	0	0	Уникально
BM	LAMA4	Субъединица ламинина α -4	Q16363	30	71619	12	0	0	Уникально
BM	ITA7	Интегрин α -7	Q13683	14	64099	12	0	0	Уникально
BM	NID2	Нидоген-2	Q14112	10	35376	11	0	0	Уникально
BM	DAG1	Дистрогликан-1	Q14118	5	31765	10	0	0	Уникально
BM	ITA3	Интегрин α -3	P26006	6	24819	11	0	0	Уникально
BM	LAMB1	Субъединица ламинина β -1	P07942	18	19174	9	0	0	Уникально
BM	BCAM	Молекула базальной клеточной адгезии	P50895	6	18637	9	0	0	Уникально
Сверхэкспрессированные белки									
BM	CO1A1	Цепь коллагена α -1 (XVIII)	P39060	17	147367	12	3323	1	44.3
BM	COFA1	Цепь коллагена α -1 (XV)	P39059	12	46228	12	1942	1	23.8
BM	ITA1	Интегрин α -1	P56199	16	50063	12	2117	1	23.6
BM	CSPG4	Хондроитин сульфат протеогликан 4	Q6UVK1	21	28511	12	1273	1	22.4
BM	ITB1	Интегрин β -1	P05556	28	484048	12	31591	10	15.3
BM	PGBM	Основной белок протеогликана гепарансульфата, специфичный для базальной мембраны	P98160	74	112827	12	13568	6	8.3
BM	FINC	Фибронектин	P02751	23	38792	12	6096	2	6.4
Сверхэкспрессированные белки									
AD	SODC	Супероксиддисмутаза [Cu-Zn]	P00441	11	122932	12	6375	2	19.3
AD	SBP1	Метантиоксиданта	Q13228	23	76414	12	7568	2	10.1
AD	GSTM1	Глутатион-S-трансфераза Ми 1	P09488	22	518262	12	67169	12	7.7
AD	SODM	Супероксиддисмутаза [Mn], митохондриальная	P04179	9	148119	12	40055	11	3.7
AD	GSTM3	Глутатион S-трансфераза Ми 3	P21266	21	90817	12	30591	10	3.0
Белки уникальные или повышенные в сосудах протезах ПК.Л/ПВ/И.Л/А									
Уникальные белки									
L	CATB	Катепсин В	P07858	12	0	0	175523	12	Уникально
L	CATZ	Катепсин Z	Q9UBR2	8	0	0	160166	12	Уникально
L	CD68	Макросалин	P34810	2	0	0	105319	9	Уникально
L	CATK	Катепсин К	P43235	22	0	0	99865	12	Уникально
L	VATB2	Субъединица В протонной АТФазы V-типа, мозговая изоформа	P21281	28	0	0	86825	12	Уникально
L	PPA5	Тартратрезистентная кислая фосфатаза 5	P13686	5	0	0	70002	11	Уникально
L	CATS	Катепсин S	P25774	7	0	0	53733	12	Уникально
L	VATH	Субъединица H протонной АТФазы V-типа	Q9U112	13	0	0	44683	12	Уникально
L	VATC1	Субъединица C1 протонной АТФазы V-типа	P21283	12	0	0	41481	12	Уникально
L	LAMP2	Лизосомно-ассоциированный мембранный гликопротеин 2	P13473	7	0	0	35766	12	Уникально
L	CATH	Прокатепсин Н	P09668	6	0	0	25165	12	Уникально
L	COR1A	Коронин-1A	P31146	19	0	0	23827	11	Уникально
L	GNS	N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза	P15586	6	0	0	22626	10	Уникально
Сверхэкспрессированные белки									
L	VATE1	Субъединица E1 протонной АТФазы V-типа	P36543	12	1266	1	71002	12	56.1
L	VATG1	Субъединица G1 протонной АТФазы V-типа	O75348	5	2397	2	106688	12	44.5
L	LAMP1	Лизосомно-ассоциированный мембранный гликопротеин 1	P11279	3	1423	1	35688	12	25.1
L	NAGAB	α -N-ацетилгалактозаминидаза	P17050	7	1035	1	22339	12	21.6
L	VATA	Каталитическая субъединица A протонной АТФазы V-типа	P38606	32	7126	4	125329	12	17.6
L	CATD	Катепсин D	P07339	15	37977	12	265322	12	7.0
Уникальные белки									
PS	CO3A1	Цепь коллагена α -1 (III)	P02461	7	0	0	32890	9	Уникально
PF	HS105	Белок теплового шока 105 кДа	Q92598	12	0	0	15672	9	Уникально
Сверхэкспрессированные белки									
PS	CO1A1	Цепь коллагена α -1 (I)	P02452	13	2736	1	50639	10	18.5
PS	CO1A2	Цепь коллагена α -2 (I)	P08123	14	1673	1	24419	9	14.6
PS	PEPD	Хаа-Про дипептидаза	P12955	21	4818	3	53006	12	11.0
PF	PP1B	Пептидил-пролил-дисульфотрансфераза В	P23284	13	9687	4	58711	12	6.1
PS	VIME	Виментин	P08670	78	199369	12	1009816	12	5.0
PF	TCRA	Субъединица α белка T-комплекса	P17987	13	5602	4	18282	9	3.3
PS	EF1B	Фактор удлинения 1- β	P24534	5	33337	12	97149	12	2.9
PF	CH60	Белок теплового шока 60 кДа, митохондриальный	P10809	35	36905	11	94132	12	2.5
PF	NPM	Нуклеофосмин	P06748	10	26539	10	64340	12	2.4
PS	EF1D	Фактор удлинения 1- δ	P29692	9	35955	11	84119	12	2.3
PF	CH10	Белок теплового шока 10 кДа, митохондриальный	P61604	7	49037	12	110381	12	2.2
PF	CALR	Кальретикулин	P27797	28	58623	12	111315	12	2.0
Уникальные белки									
G	ACONC	Цитоплазматическая аконитатгидратаза	P21399	33	0	0	41951	12	Уникально
G	ENPP1	Член 1 семейства эктонуклеотидифосфатаз/фосфолиаз	P22413	11	0	0	32048	12	Уникально
G	GLYC	Серингидроксиметилтрансфераза, цитозольная	P34896	9	0	0	27817	12	Уникально
G	GLYM	Серингидроксиметилтрансфераза, митохондриальная	P34897	6	0	0	22154	11	Уникально
Сверхэкспрессированные белки									
G	HXK1	Гексокиназа-1	P19367	13	965	1	20706	11	21.4
G	SDHB	Сукцинатдегидрогеназа [убихинон] железо-серная субъединица, митохондриальная	P21912	13	2505	1	45839	10	18.3
G	GANAB	Нейтральная альфа-глюкозидаза АВ	Q14697	19	2398	2	39649	12	16.5
G	FUMH	Фумаратгидратаза, митохондриальная	P07954	18	2688	2	35470	12	13.2
G	TRXR1	Тиоредоксинпродуктаза 1, цитоплазматическая	Q16881	17	3873	3	50092	12	12.9
G	FABP5	Белок 5, связывающий жирные кислоты	Q01469	20	25106	1	278649	12	11.1
G	CAH2	Карбоангидраза 2	P00918	12	9765	5	59639	12	6.1
G	CPGL	6-фосфоглюконолактоназа	O95336	10	4656	3	20545	10	4.4
G	G6PD	Глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа	P11413	35	21528	11	82509	12	3.8
G	IDH3A	Субъединица α изоцитратдегидрогеназы [НАД], митохондриальная	P50213	5	7170	3	19694	9	2.7
G	CPGD	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирующая	P52209	39	44725	11	119738	12	2.7
VSMC (сократительные белки) BM (компоненты базальной мембраны) AD (белки антиоксидантной защиты) L (лизосомы) PS (цитие белков) PF (фолдинг белков) G (метаболизм глюкозы)									

VSMC (сократительные белки) BM (компоненты базальной мембраны) AD (белки антиоксидантной защиты) L (липопротеины) PS (сигналы белков) PF (фолдинг белков) G (метаболизм глюкозы)

Рисунок 63 – Уникальные и дифференциально экспрессируемые белки в интактных сонных артериях и сосудистых протезах из поликапролактона с атромбогенным и противомикробным покрытием

Наименьшее кратное изменение маркеров СГМК в интактных сонных артериях по сравнению с сосудистыми протезами ПКЛ/ПВП/Ил/А составило около 10 (для α -SMA) (Рисунок 63). Компоненты базальной мембраны (такие, как субъединицы ламинина и нидоген хондроитинсульфат и фибронектин) значительно подавлялись в сосудистых протезах (Рисунок 63). Экспрессия макрофагального маркера CD68, лизосомальных белков (19/128), таких как катепсины (B, D, H, K, S и Z), субъединицы протонной АТФазы V-типа (A, B, C1, E1, G1 и H) и лизосомы, ассоциированные с мембраной, гликопротеины (LAMP1 и LAMP2) в сосудистых протезах были ограничены или значительно увеличены, что свидетельствует о хроническом воспалении (Рисунок 63), [59]. Полученная картина соответствует нормальным процессам биорезорбции конструкций, выполненных из биodeградируемых полимеров.

Резюме

В совокупности результаты морфологического исследования и протеомного профилирования эксплантированных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А продемонстрировали, что процессы деградации полимера и регенерации сосудистой ткани в стенке сосудистых протезов были синхронизированы, что подтверждено активным энергетическим обменом и белковым синтезом, укладкой и сборкой. Однако в сосудистых протезах отсутствовали как эластические волокна, так и организованный слой истинных гладкомышечных клеток сосудов, что указывает на риск развития аневризм в долгосрочной перспективе. Тем не менее, сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А были полностью эндотелизированы и достаточно устойчивы к тромбозу. 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 является итогом естественных процессов биорезорбции полимерного трубчатого каркаса протезов, происходящих с участием клеток ретикуло-гистиоцитарной системы, и никак не связанных с инфицированием и развившимся на его фоне истинным воспалением. Сосудистые протезы не имели молекулярных признаков инфекции и кальцификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка коммерчески доступных медицинских изделий, обладающих атромбогенной и противомикробной активностью, имеет большое значение для текущих потребностей трансплантологии, сердечно-сосудистой хирургии, нейрохирургии и микрохирургии.

Наиболее часто используемым биodeградируемым полимером в тканевой инженерии для восстановления на его основе сосудистой ткани является поли(ε-капролактон) – прочный и эластичный полимер, каркасы из которого после имплантации в артериальное русло способны выдерживать кровяное давление и замещаться новообразованной тканью в процессе своей постепенной деградации в условиях кровотока [149, 168]. Хотя биосовместимость ПКЛ ниже, чем у природных полимеров, он не вызывает неадекватного иммунного ответа и демонстрирует стабильный характер биodeградации, в ряде стран разрешен к медицинскому использованию. Хорошая технологичность и относительно низкая стоимость делают ПКЛ многообещающим полимером для массового производства медицинских изделий на его основе [149, 168].

При создании высокопористых матриксов, предназначенных для имплантации в кровотоки, нельзя исключать возможность их микробного обсеменения в случаях существующей у пациентов транзиторной бактериемии, аналогичной сценарию инфекционного эндокардита [52]. Инфекция высокопористого трансплантата, особенно если это сосудистый протез, может спровоцировать или еще больше усилить тромбоз [52, 174]. 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 – химические соединения, механизм действия которых основан на разрушении

бактериальных мембран и разрушении бактериальной РНК, что способно препятствовать не только микробной адгезии, но и формированию биопленки на поверхности медицинских изделий [181]. В основе механизма действия катионных амфифилов лежит нарушение целостности бактериальной мембраны [8, 50]. Разрушение бактериальной стенки делает менее вероятным развитие устойчивости патогенов к катионным амфифилам в сравнении с традиционными антибиотиками. При этом катионные амфифилы, так же, как и антибиотики, блокируют некоторые ферменты, нарушают функции РНК и ДНК, повреждают мембраны субклеточных компартментов [8]. Антибактериальная активность катионного амфифила не зависит от строения катиона, в связи с чем антибактериальные свойства катионного амфифила будут сохраняться на протяжении всего периода его существования на поверхности полимерного матрикса вне зависимости от характеристик биологической среды, окружающей матрикс [114, 137].

В данной работе для поверхностного модифицирования ПКЛ-матрикса, изготовленных методом электроспиннинга, использован 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид – катионный амфифил, продемонстрировавший ранее высокие антибактериальные свойства [8, 181].

Для сравнительной оценки эффективности присоединения 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида были использованы два вида поверхностного модифицирования: метод комплексообразования и метод ковалентной сшивки [11]. Содержание 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромида на поверхности ПКЛ-матрикса при ковалентной сшивке составило $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см² [11]. При поверхностном модифицировании ПКЛ-матрикса 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-матрикса катионный амфифил оставался на поверхности матрикса вне

зависимости от способа его присоединения – посредством ковалентной сшивки или методом комплексообразования.

Использованные методы поверхностного модифицирования достоверно не меняли структуру поверхности и физико-механические свойства ПКЛ-матриков, но оказывали различное влияние на биосовместимость конечного изделия.

Известная дозозависимая способность катионных амфифилов провоцировать гемолиз эритроцитов была выявлена и в настоящем исследовании [12]. Так, использование 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл для поверхностного модифицирования ПКЛ-матриков методом комплексообразования и в количестве $6,3 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ Моль/см² для модифицирования ПКЛ-матриков методом ковалентной сшивки спровоцировало гемолиз эритроцитов до уровня, превысившего допустимую норму 2,0%. Помимо этого, модифицирование ПКЛ-матриков 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 матриков с обогащенной тромбоцитами плазмой.

Присоединение методом комплексообразования 1,5-бис(4-тетрадецил-1,4-дiazониabiцикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид 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 [11]. 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) [11].

Также доказано, что включение в состав лекарственного модифицирующего покрытия антиагреганта илопроста и его совместное присоединение с катионным амфифилом к поверхности ПКЛ-матриков методом комплексообразования значительно снизило показатели агрегации тромбоцитов после контакта матриков с обогащенной тромбоцитами плазмой (в 4,5-8,0 раз в зависимости от концентраций параллельно присоединенного катионного амфифила; $p < 0,05$) в сравнении с матриксами, не содержащими илопрост.

Достоверного влияния дозы ионизирующего излучения в 10 и 15 кГр, проводимого с целью полимеризации ПКЛ-матриков с ПВП для последующего присоединения лекарственных препаратов методом комплексообразования, на агрегацию тромбоцитов к поверхности ПКЛ-матриков не выявлено. Использованные режимы облучения также не оказывали пагубного влияния на активность и высвобождение лекарственных препаратов, на физико-механические и биосовместимые свойства матриков. Следовательно, доза облучения 15 кГр предпочтительнее, 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. 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. Клеточный индекс эндотелиальных клеток линии Ea.hy 926 спустя 72 часа культивирования в присутствии данных матриков не имел достоверных отличий от клеточного индекса клеток, культивированных

изолированно или в присутствии немодифицированных матриксов, или матриксов с изолированным включением илопроста или катионного амфифила.

Полимерные матриксы ПКЛ/ПВП/Ил/А с катионным амфифилом, присоединенным методом комплексообразования в концентрации 0,25 мг/мл, продемонстрировали отличные бактериостатические свойства в месте наложения матриксов на агар, не вызывая при этом гемолиза эритроцитов в агаре Мюллера-Хинтона с кровью, что будет гарантированно профилактировать микробное обсеменение стенок матриксов после их имплантации в сосудистое русло без пагубного влияния на клетки крови. Однако ПКЛ-матриксы 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 матриксов на этапе *in vitro*, оптимальным явился матрикс ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр).

Тестирование антибактериальной эффективности матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15 кГр) *in vivo* выполнено в агрессивных условиях инфицированной раны, смоделированной посредством внутримышечной инъекции в подготовленную резаную рану на холке крыс линии *Wistar* взвеси культуры *S.aureus* в концентрации 10^5 - 10^{12} КОЕ/мл. В качестве группы контроля выступили немодифицированные ПКЛ-матриксы. 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, а небольшие бактериальные скопления в основном обнаружены в периферической части инфицированной раны. 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. Клеточный состав содержимого капсул подтвердил сохранение активного воспаления вокруг немодифицированных ПКЛ-матриксов и его отсутствие вокруг матриксов ПКЛ/ПВП/Ил/А 0,25 мг/мл (15

кГр). Спустя 14 суток в опытной группе произошло практически полное очищение раны от гнойного содержимого.

Для оценки эффективности сочетанного действия илопроста и катионного амфифила в составе прототипа конкретного медицинского изделия (в данной работе – сосудистого протеза ПКЛ/ПВП/Ил/А диаметром 4 мм) в сонные артерии овец имплантированы сосудистые протезы ПКЛ/ПВП/Ил/А с армирующей спиралью, катионным амфифилом и илопростом, 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 локализации сосудистых протезов не моделировалась.

Результаты аутоартериальной имплантации свидетельствовали о том, что стандартная хирургическая манипуляция на стенке сонной артерии овцы сама по себе способна приводить к тромбозу просвета сонной артерии 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 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. При этом защиту от тромбообразования оказал илопрост. Присутствие катионного амфифила в отсутствии условий инфицированной раны привело снижению выраженности хронического гранулематозного воспаления, которое проявилось гораздо слабее при ремоделировании стенки проходимых сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А в сравнении с немодифицированными сосудистыми протезами ПКЛ даже на фоне тромбоза их просвета.

Согласно полученным результатам морфологического исследования в стенке проходимых сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А 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.

Несмотря на то, что к настоящему времени проведено большое количество исследований на животных по оценке эффективности имплантации сосудистых протезов, подавляющее большинство исследований не содержит оценку молекулярных процессов регенерации биodeградируемых сосудистых протезов после имплантации [31]. 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 ПКЛ/ПВП/Ил/А, впервые было выполнено протеомное профилирование эксплантированных биodeградируемых сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А в сравнении с интактными контрлатеральными сонными артериями овец.

В новообразованной сосудистой ткани, заместившей деградирующий сосудистый протез ПКЛ/ПВП/Ил/А, подтвержден белковый синтез и активный энергетический метаболизм, свидетельствовавший о синхронизации

ремоделирования с деградацией стенки протеза, протекавшей с активным участием макрофагов [30, 59, 61, 198]. Вся полученная картина явилась итогом естественных процессов биорезорбции полимерного каркаса протеза, происходящих с участием клеток ретикуло-гистиоцитарной системы, и никак не связана с инфицированием или истинным воспалением. О таком типе ремоделирования биodeградируемых сосудистых протезов неоднократно сообщалось ранее [64, 68, 69, 152, 195]. Также сообщалось об ускоренной деградации полимерных каркасов у овец по сравнению с крысами, что свидетельствует о более высокой активности ретикуло-гистиоцитарной системы у овец [19, 67].

Таким образом, преимущество разработанных сосудистых протезов ПКЛ/ПВП/Ил/А явилось контролируемое замещение биodeградируемого трубчатого каркаса новообразованной сосудистой тканью, 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.

Таким образом, протеомные подходы способны дать представление о регенерации сосудов после имплантации биodeградируемых сосудистых протезов и указать на потенциальные риски несостоятельности подобных медицинских изделий.

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-дiazониабицикло[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. Матриксы 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-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромидом.

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

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

А – Амфифил катионный (противомикробный препарат 1,5-Бис-(4-тетрадецил-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октан-1-ил)пентан тетрабромид)

АМП – Антимикробные пептиды

БТП – Бедная тромбоцитами плазма

ВСА – Внутренняя сонная артерия

Ил – Илопрост

КА – Катионные амфифилы

КЭА – Каротидная эндартерэктомия

ОТП – Обогащенная тромбоцитами плазма

ПВП – Поливинилпирролидон

ПЭГ-гирудин/PEG-гирудин – Полиэтиленгликоль-гирудин

ТИ – Тканевая инженерия

ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ЧСА – Четвертичные соли аммония

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

[P(LLA-CL)] – (Poly(l-lactide-co-caprolactone)/Поли(L-лактид-ко-капролактон)

PCL/ПКЛ – Polycaprolactone/Поликапролактон

PET – Polyethyleneterephthalate/Полиэтилентерефталат

PGA – Polyglycolic acid/Полигликолевая кислота

PLA – Polylactide acid/Полимолочная кислота

PLCL – Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone/Сополимер молочной кислоты и поликапролактона

PLGA – Poly(lactic acid-co-glycolic acid/Сополимер молочной и гликолевой кислот

PTFE – Polytetrafluoroethylene/Политетрафторэтилен

SF – Silk Fibroin/фиброин шелка

SDF-1 α – Cell-derived factor-1 alpha/Стромальный фактор 1 α

NHS – N-hydroxy-succinimide/N-гидроксисукцинимид

NO – Nitric oxide/Оксида азота

tPA – Tissue plasminogen activator/Тканевый активатор плазминогена

VEGF – Vascular endothelial growth factor/Сосудистый эндотелиальный фактор
роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ изгибной жесткости сосудистых графтов с использованием методов численного моделирования / Е. А. Овчаренко, К. Ю. Клышников, М. А. Резвова и др. // Биофизика. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 614–621.
2. Биodeградируемые сосудистые заплаты: сравнительная характеристика физико-механических и гемосовместимых свойств / Л. В. Антонова, А. В. Миронов, В. Н. Сильников и др. // Якутский медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 35–39.
3. Биodeградируемый сосудистый протез малого диаметра: виды модифицирования биологически активными молекулами и RGD-пептидами / Е. А. Сенокосова, Е. О. Кривкина, Л. В. Антонова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 86–96.
4. Влияние полимерного состава тканеинженерных сосудистых заплат, содержащих фактор роста эндотелия сосудов, на их свойства и ремоделирование *in situ* / В. В. Севостьянова, А. В. Миронов, Л. В. Антонова и др. // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 25–36.
5. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1 α и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра / Л. В. Антонова, В. В. Севостьянова, А. Г. Кутихин и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 96–109.
6. Воронов, Д. А. Выбор метода реконструкции сонных артерий при их атеросклеротическом поражении: автореф. дис. ... канд. мед. Наук : 14.00.44 / Д. А. Воронов ; Российский научный центр хирургии РАМН. – Москва, 2002. – 22 с.
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 и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2024. – Т. XXVI, № 5. – С. 105–118.

8. Кривкина, Е. О. 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. – Т. 10, № 3. – С. 90–102.

9. Морфологические особенности ремоделирования биологических и тканеинженерных сосудистых заплат: результаты испытаний на модели овцы / Е. С. Прокудина, Е. А. Сенокосова, Л. В. Антонова и др. // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38, № 4. – С. 250–259.

10. Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами / Л. В. Антонова, В. Н. Сильников, М. Ю. Ханова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 142–152.

11. Оценка биосовместимости и антимикробных свойств биodeградируемых сосудистых протезов различного полимерного состава с атромбогенным и противомикробным лекарственным покрытием / Л. В. Антонова, Е. О. Кривкина, В. Н. Сильников и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23, №2. С. 122–136.

12. Полимерные материалы с антибактериальной активностью: проблемы выбора низкомолекулярных антибактериальных агентов / В. Н. Сильников, Л. С. Королева, Е. О. Кривкина и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2021. – Т. 29. – С. 494–506.

13. Результаты преclinical испытаний биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели овцы / Л. В. Антонова, Е. О. Кривкина, М. Ю. Ханова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. XXIV, № 3. – С. 80–93.

14. Севостьянова, В.В. 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.
15. Тканеинженерная заплата, модифицированная фактором роста эндотелия сосудов, для реконструкции сосудистой стенки / В. В. Севостьянова, А. В. Миронов, Л. В. Антонова и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2020. – Т. 24, № 4. – С. 114–128.
16. Тканеинженерные сосудистые заплаты – сравнительная характеристика и результаты преклинических испытаний на модели овцы / Л. В. Антонова, А. В. Миронов, А. Р. Шабаев и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. XXIV, № 4. – С. 94–108.
17. Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза малого диаметра в условиях потока / М. Ю. Ханова, Е. А. Великанова, В. Г. Матвеева и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23, № 3. – С. 101–114.
18. Ханова, М. Ю. Основные аспекты создания *in vitro* клеточнозаселенных сосудистых протезов / М. Ю. Ханова, Л. В. Антонова // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. – Т. 7, № 4. – С. 100–109.
19. A brief report on an implantation of small-caliber biodegradable vascular grafts in a carotid artery of the sheep / L. V. Antonova, A. V. Mironov, A. E. Yuzhalin et al. // Pharmaceuticals (Basel). – 2020. – Vol. 13, № 5. – P. 101.
20. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy / P. Texakalidis, S. Giannopoulos, N. Charisis et al. // J Vasc Surg. – 2018. – Vol. 68, № 4. – P. 1241–1256.
21. A multicenter experience with the surgical treatment of infected abdominal aortic endografts / V. J. Davila, W. Stone, A. A. Duncan et al. // J Vasc Surg. – 2015. – Vol. 62, № 4. – P. 877–883.

22. A pilot study of a triple antimicrobial-bonded Dacron graft for the prevention of aortic graft infection / I. Aboshady, I. Raad, A. S. Shah et al. // *J Vasc Surg.* – 2012. – Vol. 56, № 3. – P. 794–801.
23. A prospective antibacterial for drug-resistant pathogens: a dual warhead amphiphile designed to track interactions and kill pathogenic bacteria by membrane damage and cellular DNA cleavage / D. Thiyagarajan, S. Goswami, C. Kar et al. // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – P. 7434–7436.
24. A Six-Year Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections in an Italian Teaching Acute Care Hospital / A. Gentili, M. Di Pumpo, D. I. La Milia et al. // *Int J Environ Res Public Health.* – 2020. – Vol. 17, № 21. – P. 7724.
25. Acute Mechanical Consequences of Vessel-Specific Coronary Bypass Combinations / C. J. Kostelnik, M. K. Gale, K. J. Crouse et al. // *Cardiovasc Eng Technol.* – 2023.
26. Aerosolized Iloprost Randomized Study Group. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension / H. Olschewski, G. Simonneau, N. Galiè et al. // *N Engl J Med.* - 2002. - Vol. 347 (5). - P. 322-329
27. An Internet-based registry examining the efficacy of heparin coating in patients undergoing coronary stent implantation / R. Mehran, E. Nikolsky, E. Camenzind et al. // *Am Heart J.* – 2005. – Vol. 150, № 6. – P. 1171–1176.
28. Analysis of structure and properties of antibacterial vascular patch used in abdominal aorta aneurysm surgeries / Z. Draczyński, T. Gąsiorowski, B. Kolesińska et al. // *J Appl Biomater Funct Mater.* – 2019. – Vol. 17, № 2. – P. 2280800018793818.
29. Andersson, D. I. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides / D. I. Andersson, D. Hughes, J. Z. Kubicek-Sutherland // *Drug Resist Updat.* – 2016. – Vol. 26. – P. 43–57.
30. Anes, E. Spatial localization of cathepsins: Implications in immune activation and resolution during infections / E. Anes, D. Pires, M. Mandal, J. M. Azevedo-Pereira // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 955407.

31. Animal studies for the evaluation of in situ tis-sue-engineered vascular grafts - a systematic review, evidence map, and meta-analysis / S. E. Koch, B. J. de Kort, N. Holshuijsen et al. // NPJ Regen. Med. – 2022. – Vol. 7. – P. 17.
32. Antimicrobial-bonded graft patency in the setting of a polymicrobial infection in swine (*Sus scrofa*) / M. S. Clemens, M. C. Stull, K. W. Hata et al. // J Vasc Surg. – 2017. – Vol. 66, № 4. – P. 1210–1216.
33. Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin-impregnated Dacron grafts / V. Gahtan, G. E. Esses, D. F. Bandyk et al. // J Surg Res. – 1995. – Vol. 58, № 1. – P. 105–110.
34. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics-a novel way to combat antibiotic resistance? / M. S. Zharkova, D. S. Orlov, O. Y. Golubeva et al. // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – P. 128.
35. Aronson, J. K. Side Effects of Drugs Annual: A world-wide yearly survey of new data and trends in adverse drug reactions / J. K. Aronson. – Elsevier, 2003. – Vol. 26. - 662 p.
36. Assessment of the vasodilator response in primary pulmonary hypertension: Comparing prostacyclin and iloprost administered by either infusion or inhalation / C.F Opitz, R. Wensel, M. Bettmann et al. // European Heart Journal. - 2003. - Vol. 24 (4). - P. 356–365.
37. Avramovic, J. Prevention of prosthetic vascular graft infection by rifampicin impregnation of a protein-sealed Dacron graft in combination with parenteral cephalosporin / J. Avramovic, J. P. Fletcher // J Cardiovasc Surg (Torino). – 1992. – Vol. 33, № 1. – P. 70–74.
38. Bera, S. Antibacterial activities of aminoglycoside antibiotics-derived cationic amphiphiles. Polyol-modified neomycin B-, kanamycin A-, amikacin-, and neamine-based amphiphiles with potent broad spectrum antibacterial activity / S. Bera, G. G. Zhanel, F. Schweizer // J. Med. Chem. – 2010. – Vol. 53. – P. 3626–3631.

39. Bicephalic amphiphile architecture affects antibacterial activity / J. E. LaDow, D. C. Warnock, K. M. Hamill et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 46. – P. 4219–4226.
40. Binding kinetics of triclosan (Irgasan) to alloplastic vascular grafts: an in vitro study / T. Hernández-Richter, H. M. Schardey, F. Löhlein et al. // *Annals of Vascular Surgery.* – 2000. – Vol. 14, № 4. – P. 370–375.
41. Biocidal activity of polystyrenes that are cationic by virtue of protonation / M. A. Gelman, B. Weisblum, D. M. Lynn et al. // *Org Lett.* – 2004. – Vol. 6, № 4. – P. 557–560.
42. Biological evaluation of tetracationic compounds based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane moieties connected by different linkers / E. A. Burakova, I. Vol. Saranina, N. Vol. Tikunova et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24. – P. 6012–6020.
43. Biomaterials and Modifications in the Development of Small-Diameter Vascular Grafts / M. A. Hiob, S. She, L. D. Muiznieks et al. // *Biomater. Sci. Eng.* – 2017. – Vol. 3, № 5. – P. 712–723.
44. Biran, R. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices / R. Biran, D. Pond // *Advanced drug delivery reviews.* – 2017. – Vol. 112. – P. 12–23.
45. Broad-spectrum antibacterial amphiphilic aminoglycosides: A new focus on the structure of the lipophilic groups extends the series of active dialkyl neamines / L. Zimmermann, J. Kempf, F. Briée et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 157. – P. 1512–1525.
46. Brunton, L. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 13th ed / L. Brunton, B. Knollmann. – New York, NY : McGraw-Hill Education, 2017.
47. Cannon, C. P. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy / C. P. Cannon, R. Tracy // *Journal of thrombosis and thrombolysis.* – 1995. – Vol. 2, № 2. – P. 95–106.

48. Cefazolin and Ertapenem Salvage Therapy Rapidly Clears Persistent Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia / E. R. Ulloa, K. V. Singh, M. Geriak et al. // *Clin Infect Dis.* – 2020. – Vol. 71, № 6. – P. 1413–1418.
49. Chester, J. F. The causes of synthetic vascular graft failure / J. F. Chester // *Annals of the College of Surgeons of Hong Kong.* – 2002. – Vol. 6, № 4. – P. 97–101.
50. Ciumac, D. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides / D. Ciumac, H. Gong, X. Hu, J. R. Lu // *J Colloid Interface Sci.* – 2019. – Vol. 537. – P. 163–185.
51. Clarke, J. Ceramic gentamicin beads in vascular graft infection--a cautionary note / J. Clarke, J. Shalhoub, S. K. Das // *Vasc Endovascular Surg.* – 2013. – Vol. 47, № 1. – P. 76–77.
52. Coagulation: At the heart of infective endocarditis / L. Liesenborghs, S. Meyers, T. Vanassche et al. // *J. Thromb. Haemost.* – 2020. – Vol. 18. – P. 995–1008.
53. Comparison of the Antimicrobial Properties of Silver Impregnated Vascular Grafts with and without Triclosan / X. Berard, L. Stecken, J. B. Pinaquy et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2016. – Vol. 51, № 2. – P. 285–292.
54. 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 et al. // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, №10. P. 8540.
55. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence / J. X. Binder, S. Pletscher-Frankild, K. Tsafou et al. // *Database (Oxford).* – 2014. – Vol. 2014. – P. bau012.
56. Complex treatment of vascular prostheses infections / O. Andercou, D. Marian, G. Olteanu et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol. 97, № 27. – P. e11350.
57. Continuous intravenous iloprost to revert treatment failure of first-line inhaled iloprost therapy in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension / R. Ewert, C.F. Opitz, R. Wensel et al. // *Clin Res Cardiol.* - 2007. - Vol. 96. P. 211–217.

58. Contrasting biofunctionalization strategies for the enhanced endothelialization of biodegradable vascular grafts/A. J. Melchiorri, N. Hibino, T. Yi et al. // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 437–446.

59. Controlled and Synchronised Vascular Regeneration upon the Implantation of Iloprost- 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 et al. // *Polymers (Basel)*. – 2022. – Vol.14, № 23. P. 5149.

60. Cross-sectional imaging of aortic infections / D. J. Murphy, A. R. Keraliya, M. D. Agrawal et al. // *Insights Imaging*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 801–818.

61. Cysteinyl cathepsins in cardiovascular diseases / X. Zhang, S. Luo, M. Wang et al. // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* – 2020. – Vol. 1868. – P. 140360.

62. Darius, H. Antiplatelet effects of intravenous iloprost in patients with peripheral arterial obliterative disease / H. Darius, V. Hossmann, K. Schrör // *Klinische Wochenschrift*. – 1986. – Vol. 64, № 12. – P. 545–551.

63. Deser, S. B. Perioperative intravenous Iloprost therapy in addition to percutaneous transluminal angioplasty improves patency for peripheral arterial occlusive disease / S. B. Deser // *Perfusion*. - 2024. - Vol. 39 (7). - P. 1363-1370.

64. Development of small diameter nanofiber tissue engineered arterial grafts / H. Kurobe, M. W. Maxfield, S. Tara et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. e0120328.

65. Development of Small-diameter Polyester Vascular Grafts Coated with Silk Fibroin Sponge / T. Tanaka, R. Tanaka, Y. Ogawa et al. // *Organogenesis*. – 2020. – Vol. 16, № 1. – P. 1–13.

66. Development of thrombus-resistant and cell compatible crimped polyethylene terephthalate cardiovascular grafts using surface co-immobilized heparin and collagen / B. Al Meslmani, G. Mahmoud , B. Strehlow et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – Vol. 43. – P. 538–546.

67. Different degradation rates of nanofiber vascular grafts in small and large animal models / T. Fukunishi, C. S. Ong, P. Yesantharao et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2020. – Vol. 14. – P. 203–214.
68. Differential outcomes of venous and arterial tissue en-gineered vascular grafts highlight the importance of coupling long-term implantation studies with computational modeling / C. A. Best, J. M. Szafron, K. A. Rocco et al. // *Acta Biomater.* – 2019. – Vol. 94. – P. 183–194.
69. Distinct Effects of Heparin and Interleukin-4 Functionalization on Macrophage Polarization and In Situ Arterial Tissue Regeneration Using Resorbable Supramolecular Vascular Grafts in Rats / V. Bonito, S. E. Koch, M. M. Krebber et al. // *Adv. Healthc. Mater.* – 2021. – Vol. 10. – P. e2101103.
70. DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides / X. Kang, F. Dong, C. Shi et al. // *Sci Data.* – 2019. – Vol. 6, № 1. – P. 148.
71. DRAMP: a comprehensive data repository of antimicrobial peptides / L. Fan, J. Sun, M. Zhou et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 24482.
72. Early host tissue response to different types of vascular prostheses coated with silver acetate or vaporized metallic silver / P. Jeanmonod, M. W. Laschke, N. Gola et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2014. – Vol. 47, № 6. – P. 680–688.
73. Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization / Y. Yao, J. Wang, Y. Cui et al. // *Acta biomaterialia.* – 2014. – Vol. 10, № 6. – P. 2739–2749.
74. Efficacy and safety of endotracheal instillation of iloprost for persistent pulmonary hypertension of the newborn / G. A. Okbay, M. Ciftel, M.E. Timur et al. // *Cardiol Young.* - 2022. - Vol. 32(12). - P. 1894-1900.
75. Efficacy of antiseptic impregnation of aortic endografts with rifampicin compared to silver against in vitro contamination with four bacteria that frequently cause vascular graft infections / S. Honig, P. Seeger, H. Rohde et al. // *JVS: Vascular Science.* – 2020. – Vol. 1. – P. 181–189.

76. Electrospun Bilayer Composite Vascular Graft with an Inner Layer Modified by Polyethylene Glycol and Heparin to Regenerate the Blood Vessel / H. Kuang, S. Yang, Y. Wang et al. // *Journal of biomedical nanotechnology*. – 2019. – Vol. 15, № 1. – P. 77–84.
77. Electrospun nanofiber-based drug delivery systems / D. G. Yu, L. M. Zhu, K. White et al. // *Health*. – 2009. – Vol. 1, № 02. – P. 67.
78. El-Gamel, A. Proximal Aortic Graft Infection: Time for Treatment in an Aortic Centre? / A. El-Gamel // *Heart, Lung and Circulation*. – 2022. – Vol. 31, № 1. – P. 4–6.
79. EMid-term results of silver-coated Dacron graft implantation in aortic and lower extremity revascularization / Z. Szeberin, Z. Münch, M. Fehérvári et al. // *Magyar Sebészet*. – 2010. – Vol. 63, № 6. – P. 369–373.
80. Evaluation of platelet deposition and neointimal hyperplasia of heparin-coated small-caliber ePTFE grafts in a canine femoral artery bypass model / P. H. Lin, R. L. Bush, Q. Yao et al. // *Journal of Surgical Research*. – 2004. – Vol. 118, № 1. – P. 45–52.
81. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts in vivo / L. Zhao, X. Li, L. Yang et al. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. – 2021. – Vol. 118. – P. 111441.
82. Fabrication of poly (l-lactic acid)/gelatin composite tubular scaffolds for vascular tissue engineering / K. T. Shalumon, S. Deepthi, M. S. Anupama et al. // *International journal of biological macromolecules*. – 2015. – Vol. 72. – P. 1048–1055.
83. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency / S. Wang, X. M. Mo, B. J. Jiang et al. // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 2131–2139.
84. Fatima, M. Complications associated with angioplasty / M. Fatima, Z. Mahveen // *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*. – 2017. – Vol. 8, № 7. – P. 2789–2797.

85. Gharamti, A. Vascular Graft Infections: An update / A. Gharamti, Z. A. Kanafani // *Infect Dis Clin North Am.* – 2018. – Vol. 32, № 4. – P. 789–809.
86. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study / G. A. Roth, G. A. Mensah, C. O. Johnson et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2020. – Vol. 76, № 25. – P. 2982–3021.
87. Goddard, J. M. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds / J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss // *Prog. Polym. Sci.* – 2007. – Vol. 32. – P. 698–725.
88. Graft infectivity of rifampin and silver-bonded polyester grafts to MRSA contamination / D. Schmach, P. Armstrong, B. Johnson et al. // *Vasc Endovascular Surg.* – 2005. – Vol. 39, № 5. – P. 411–420.
89. Grant, S. M. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures / S. M. Grant, K. L. Goa // *Drugs.* – 1992. – Vol. 43, № 6. – P. 889–924.
90. Growth factors-loaded stents modified with hyaluronic acid and heparin for induction of rapid and tight re-endothelialization / D. H. Choi, S. N. Kang, S. M. Kim et al. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2016. – Vol. 141. – P. 602–610.
91. Halder, J. Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple head groups leads to impressive antibacterial activity / J. Halder, P. Kondaiah, S. Bhattacharya // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48. – P. 3823–3831.
92. Haney, E. F. Antimicrobial Peptides: An Introduction / E. F. Haney, S. C. Mansour, R. E. Hancock // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1548. – P. 3–22.
93. Hasan, A. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts / A. Hasan, A. Memic, N. Annabi [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 11–25.

94. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association / C. W. Tsao, A. W. Aday, Z. I. Almarzooq et al. // *Circulation*. – 2022. – Vol. 145, № 8. – P. e153–e639.
95. Hemocompatibility research on the micro-structure surface of a bionic heart valve / X. Ye, Z. Wang, X. Zhang et al. // *Biomed Mater Eng*. – 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 2361–2369.
96. Heparin-bonded ePTFE grafts compared with vein grafts in femoropopliteal and femorocrural bypasses: 1- and 2-year results / K. Daenens, S. Schepers, I. Fourneau et al. // *J Vasc Surg*. – 2009. – Vol. 49, № 5. – P. 1210–1216.
97. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene grafts without heparin in a long-term comparison / R. H. Samson, R. Morales, D.P. Showalter et al. // *Journal of vascular surgery*. – 2016. – Vol. 64, № 3. – P. 638–647.
98. Heparin-Eluting Tissue-Engineered Bioabsorbable Vascular Grafts / Y. Matsuzaki, A. Ulziibayar, T. Shoji et al. // *Appl. Sci*. – 2021. – Vol. 11. – P. 4563.
99. Hydrogel Small-Diameter Vascular Graft Reinforced with a Braided Fiber Strut with Improved Mechanical Properties / G. Guan, C. Yu, M. Xing et al. // *Polymers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 5. – P. 810.
100. Ikeda, T. Biologically active polycations: Antimicrobial activities of Poly[trialkyl(vinylbenzyl)ammonium chloride]-type polycations / T. Ikeda, S. Tazuke // *Die Makromol. Chem. Rapid Commun*. – 1983. – Vol. 4. – P. 459–461.
101. Iloprost: Old and New Indications / B. Banerji, M.A. Parikh, R. Minkin et al. // *Cardiol Rev*. – 2025.
102. Impact of Modification on the Energy Characteristics of Surfaces and Matrix Properties of the New Effective Polymer Vascular Implants / Yu. G. Bogdanova, L. V. Antonova, V. N. Silnikov et al. // *Key Engineering Materials*. – 2021. – Vol. 899. – P. 342–354.

103. Improvement of a Novel Small-diameter Tissue-engineered Arterial Graft With Heparin Conjugation / Y. Matsuzaki, Sh. Miyamoto, H. Miyachi et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2021. – Vol. 111, № 4. – P. 1234–1241.

104. In vitro and in vivo evaluation of a small-caliber coaxial electrospun vascular graft loaded with heparin and VEGF / Y. T. Hu, X. D. Pan, J. Zheng et al. // *International Journal of Surgery.* – 2017. – Vol. 44. – P. 244–249.

105. In vitro biocompatibility evaluation of bioresorbable copolymers prepared from L-lactide, 1, 3-trimethylene carbonate, and glycolide for cardiovascular applications / X. Shen, F. Su, J. Dong et al. // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2015. – Vol. 26, № 8. – P. 497–514.

106. In vitro Evidence of Improved Antimicrobial Efficacy of Silver and Triclosan Containing Vascular Grafts Compared with Rifampicin Soaked Grafts / X. Berard, M. Puges, J. B. Pinaquy et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2019. – Vol. 57, № 3. – P. 424–432.

107. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds / K. Kim, Y. K. Luu, C. Chang et al. // *J Control Release.* – 2004. – Vol. 98, № 1. – P. 47–56.

108. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin / N. H. Wallén, M. Ladjevardi, J. Albert et al. // *Thrombosis research.* – 1997. – Vol. 87, № 1. – P. 151–157.

109. Inhaled iloprost in preterm infants with severe respiratory distress syndrome and pulmonary hypertension / O. Yilmaz, H. Kahveci, C. Zeybek et al. // *Am J Perinatol.* - 2014. - Vol. 31(4). - P. 321-326.

110. Inhaled iloprost induces long-term beneficial hemodynamic changes in patients with pulmonary arterial hypertension receiving combination therapy / K. Yasuda, S. Adachi, I. Nishiyama et al. // *Pulm Circ.* - 2022. - Vol. 12(2). - P. e12074.

111. Intraoperative assessment of technical perfection in carotid endarterectomy: a prospective analysis of 1305 completion procedures. Collaborators of the EVEREST

study group. Eversion versus standard carotidendartectomy / S. Zannetti, P. Cao, P. De Rango et al. // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 1999. – Vol. 18, № 1. – P. 52–58.

112. Janiec, M. Symptomatic late saphenous vein graft failure in coronary artery bypass surgery / M. Janiec, A. Dimberg, R. P. F. Lindblom // *Interdiscip Cardiovasc Thorac Surg*. – 2023. – Vol. 36, № 4. – P. ivad052.

113. Jung, F. Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets / F. Jung, S. Braune, A. Lendlein // *Clin Hemorheol Microcirc*. – 2013. – Vol. 53, № 1–2. – P. 97–115.

114. Le, C. F. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides / C. F. Le, C. M. Fang, S. D. Sekaran // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2017. – Vol. 61, № 4. – P. e02340–16.

115. Li, H. L. Current Evidence on Management of Aortic Stent-graft Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis / H. L. Li, Y. C. Chan, S. W. Cheng // *Ann Vasc Surg*. – 2018. – Vol. 51. – P. 306–313.

116. Limitations in the use of rifampicin-gelatin grafts against virulent organisms / S. Koshiko, T. Sasajima, S. Muraki et al. // *J Vasc Surg*. – 2002. – Vol. 35, № 4. – P. 779–785.

117. Linhardt, R. J. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity / R. J. Linhardt // *J. Med. Chem*. – 2003. – Vol. 19. – P. 2551–2554.

118. Livermore, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? / D. M. Livermore // *J Antimicrob Chemother*. – 2009. – Vol. 64. – P. 29–36.

119. Long-term outcomes after stenting versus endarterectomy for treatment of symptomatic carotid stenosis: the international carotid stenting study (ICSS) randomised trial / L. H. Bonati, J. Dobson, R. L. Featherstone et al. // *Lancet*. – 2015. – Vol. 385, № 9967. – P. 529–538.

120. Loss of stability in a small-caliber vascular graft / K. U. Klyshnikov, E. A. Ovcharenko, M. A. Rezvova et al. // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2019. – Vol. 11, № 2. – P. 7–12.

121. Matamouros, S. S. Typhimurium strategies to resist killing by cationic antimicrobial peptides / S. Matamouros, S. I. Miller // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1848. – P. 3021–3025.

122. Matsuzaki, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides / K. Matsuzaki // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1788, № 8. – P. 1687–1692.

123. Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts / F. Montini-Ballarina, D. Calvo, P. C. Caracciolo et al. // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2016. – Vol. 60. – P. 220–233.

124. Medical treatment of prosthetic vascular graft infections: Review of the literature and proposals of a Working Group / M. Revest, F. Camou, É. Senneville et al. // *International journal of antimicrobial agents*. – 2015. – Vol. 46, № 3. – P. 254–265.

125. Menger, M. D. In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts / M. D. Menger, F. Hammersen, K. Messmer // *Thorac Cardiovasc Surg*. – 1992. – Vol. 40, № 1. – P. 19–25.

126. Mensah, G. A. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond / G. A. Mensah, G. A. Roth, V. Fuster // *J Am Coll Cardiol*. – 2019. – Vol. 74, № 20. – P. 2529–2532.

127. Microbial evolution of vascular graft infections in a tertiary hospital based on positive graft cultures / R. Gouveia E Melo, B. Martins, D. M. Pedro et al. // *J Vasc Surg*. – 2021. – Vol. 74, № 1. – P. 276–284.e4.

128. Modulating antimicrobial activity by synthesis: dendritic copolymers based on nonquaternized 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate by Cu-mediated ATRP / G. Vigliotta, M. Mella, D. Rega et al. // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13, № 3. – P. 833–841.

129. Molchanova, N. Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs / N. Molchanova, P. R. Hansen, H. Franzyk // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22, № 9. – P. 1430.
130. Mortality From Ischemic Heart Disease / A. N. Nowbar, M. Gitto, J. P. Howard et al. // *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. – 2019. – Vol. 12, № 6. – P. e005375.
131. Mouriño, V. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments / V. Mouriño, J. P. Cattalini, A. R. Boccaccini // *J R Soc Interface*. – 2012. – Vol. 9, № 68. – P. 401–419.
132. Murugesan, S. Immobilization of heparin: approaches and applications / S. Murugesan, R. J. Linhardt, J. Xie // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2008. – Vol. 8, № 2. – P. 80–100.
133. Nakamura, K. Pathology of Endovascular Stents / K. Nakamura, J. H. Keating, E. R. Edelman // *Interv Cardiol Clin*. – 2016. – Vol. 5, № 3. – P. 391–403.
134. Nanofibrous vascular scaffold prepared from miscible polymer blend with heparin/stromal cell-derived factor-1 alpha for enhancing anticoagulation and endothelialization / W. Wang, D. Liu, D. Li et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019.
135. Nawrocki, K. L. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of gram-positive bacteria / K. L. Nawrocki, E. K. Crispell, S. M. McBride // *Antibiotics*. – 2014. – Vol. 3. – P. 461–492.
136. New broad-spectrum antibacterial amphiphilic aminoglycosides active against resistant bacteria: From neamine derivatives to smaller neosamine analogues / L. Zimmermann, I. Das, J. Désiré et al. // *J. Med. Chem*. – 2016. – Vol. 59. – P. 9350–9369.
137. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria / M. Scocchi, M. Mardirossian, G. Runti et al. // *Curr Top Med Chem*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 76–88.

138. Norouzi, S. K. Bilayered heparinized vascular graft fabricated by combining electrospinning and freeze-drying methods / S. K. Norouzi, A. Shamloo // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – Vol. 94. – P. 1067–1076.

139. No-touch saphenous vein graft harvesting technique for coronary artery bypass grafting / Y. Inaba, M. Yamazaki, M. Ohono et al. // *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. – 2020. – Vol. 68. – P. 248–253.

140. Palermo, E. F. Chemical structure of cationic groups in amphiphilic polymethacrylates modulates the antimicrobial and hemolytic activities / E. F. Palermo, K. Kurod // *Biomacromolecules*. – 2009. – Vol. 10. – P. 1416–1428.

141. Pashneh-Tala, S. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future / S. Pashneh-Tala, S. MacNeil, F. Claeysens // *Tissue Eng Part B Rev*. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 8–100.

142. Patency of a small vessel prosthesis bonded to tissue plasminogen activator and iloprost / R. S. Greco, H.C. Kim, A.P. Donetz et al. // *Annals of vascular surgery*. – 1995. – Vol. 9, № 2. – P. 140–145.

143. Pathologic analysis of 19 heart valves with silver-coated sewing rings / J. Butany, R. L. Leask, N. D. Desai et al. // *J Card Surg*. – 2006. – Vol. 21, № 6. – P. 530–538.

144. Patient characteristics predict patency of early-cannulation arteriovenous grafts / D. B. Kingsmore, K. S. Stevenson, S. Richarz et al. // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 10743.

145. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development / M. Heise, G. Schmidmaier, I. Husmann et al. // *European journal of vascular and endovascular surgery*. – 2006. – Vol. 32, № 4. – P. 418–424.

146. Pelletier-Galarneau, M. Vascular graft infection: Improving diagnosis with functional imaging / M. Pelletier-Galarneau, D. Juneau // *J. Nucl. Cardiol*. – 2020. – P. 1–5.

147. Perigraft vascularization and incorporation of implanted Dacron prostheses are affected by rifampicin coating / M. R. Moussavian, M. W. Laschke, G. Schlachtenberger et al. // *J Vasc Surg.* – 2016. – Vol. 64, № 6. – P. 1815–1824.

148. Polyacrylonitrile nanofibers coated with silver nanoparticles using a modified coaxial electrospinning process / D. G. Yu, J. Zhou, N. P. Chatterton et al. // *Int J Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 7. – P. 5725–5732.

149. Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review / E. H. Backes, S. V. Harb, C. A. G. Beatrice et al. // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2022. – Vol. 110. – P. 1479–1503.

150. Porcine carotid artery replacement with biodegradable electrospun poly-ε-caprolactone vascular prosthesis / W. Mrówczyński, D. Mugnai, S. de Valence et al. // *J Vasc Surg.* – 2014. – Vol. 59, № 1. – P. 210–219.

151. Powell, T. W. A passive system using rifampin to create an infection-resistant vascular prosthesis / T. W. Powell, S. J. Burnham, G. Johnson Jr. // *Surgery.* – 1983. – Vol. 94, № 5. – P. 765–769.

152. Preclinical study of patient-specific cell-free nanofiber tissue-engineered vascular grafts using 3-dimensional printing in a sheep model / T. Fukunishi, C. A. Best, T. Sugiura et al. // *J Thorac Cardiovasc. Surg.* – 2017. – Vol. 153. – P. 924–932.

153. Prevention of graft infection by bonding of gentamycin to Dacron prostheses / A. Haverich, S. Hirt, M. Karck et al. // *J Vasc Surg.* – 1992. – Vol. 15, № 1. – P. 187–193.

154. Prevention of perioperative vascular prosthetic infection with a novel triple antimicrobial-bonded arterial graft / I. Aboshady, I. Raad, D. Vela et al. // *J Vasc Surg.* – 2016. – Vol. 64, № 6. – P. 1805–1814.

155. Prevention of *Staphylococcus aureus* graft infection by a new gelatin-sealed vascular graft prebonded with antibiotics / I. Javerliat, O. Goëau-Brissonnière, V. Sivadon-Tardy et al. // *J Vasc Surg.* – 2007. – Vol. 46, № 5. – P. 1026–1031.

156. Prevention of vascular graft infection by rifampin bonding to a gelatin-sealed Dacron graft / O. Goëau-Brissonnière, C. Leport, F. Bacourt et al. // *Ann Vasc Surg.* – 1991. – Vol. 5, № 5. – P. 408–412.

157. Prevention of vascular graft infections with antibiotic graft impregnation prior to implantation: in vitro comparison between daptomycin, rifampin and nebacetin / T. Bisdas, E. Beckmann, G. Marsch et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2012. – Vol. 43, № 4. – P. 448–456.

158. Prophylactic use of the silver-acetate-coated graft in arterial occlusive disease: a retrospective, comparative study / A. Larena-Avellaneda, S. Russmann, M. Fein et al. // *J Vasc Surg.* – 2009. – Vol. 50, № 4. – P. 790–798.

159. Rahmati Nejad, M. Electrospun PET/PCL small diameter nanofibrous conduit for biomedical application / M. Rahmati Nejad, M. Yousefzadeh, A. Solouk // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2020. – Vol. 110. – P. 110692.

160. Results from a multicenter registry of heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for above-the-knee femoropopliteal bypass / G. Piffaretti, W. Dorigo, P. Castelli et al. // *J Vasc Surg.* – 2018. – Vol. 67, № 5. – P. 1463–1471.

161. Revascularization with Obturator or Hemi-neoaortoiliac System for Partial Aortic Graft Infections / D. Phang, M. R. Smeds, M. Abate et al. // *Ann Vasc Surg.* – 2019. – Vol. 54. – P. 166–175.

162. Ricco, J. B. InterGard silver bifurcated graft: features and results of a multicenter clinical study / J. B. Ricco, InterGard Silver Study Group // *Journal of vascular surgery.* – 2006. – Vol. 44, № 2. – P. 339–346.

163. Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular Dacron graft material / T. Hernández-Richter, H. M. Schardey, F. Wittmann et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2003. – Vol. 26, № 5. – P. 550–557.

164. Risk assessment of significant upper extremity arteriovenous graft infection in the Vascular Quality Initiative / S. R. Levin, A. Farber, T. W. Cheng et al. // *J Vasc Surg.* – 2020. – Vol. 71, № 3. – P. 913–919.

165. Sakiyama-Elbert, S. E. Incorporation of heparin into biomaterials / S. E. Sakiyama-Elbert // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 1581–1587.
166. Sardelic, F. Rifampicin impregnated Dacron grafts: no development of rifampicin resistance in an animal model / F. Sardelic, P. Y. Ao, J. P. Fletcher // *Eur J Vasc Endovasc Surg*. – 1995. – Vol. 9, № 3. – P. 314–318.
167. Sasisekharan, R. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function / R. Sasisekharan, G. Venkataraman // *Current opinion in chemical biology*. – 2000. – Vol. 4, № 6. – P. 626–631.
168. Schmitt, P. R. Current Applications of Polycaprolactone as a Scaffold Material for Heart Regeneration / P. R. Schmitt, K. D. Dwyer, K. L. K. Coulombe // *ACS Appl. Bio. Mater.* – 2022. – Vol. 5. – P. 2461–2480.
169. Schneider, F. Efficacy of collagen silver-coated polyester and rifampin-soaked vascular grafts to resist infection from MRSA and *Escherichia coli* in a dog model / F. Schneider, S. O'Connor, J. P. Becquemin // *Ann Vasc Surg*. – 2008. – Vol. 22, № 6. – P. 815–821.
170. Seeger, J. M. Management of patients with prosthetic vascular graft infection / J. M. Seeger // *The American Surgeon*. – 2000. – Vol. 66, № 2. – P. 166–177.
171. Shapiro, J. R. Transient migratory osteoporosis in osteogenesis imperfecta / J. R. Shapiro // *Osteogenesis Imperfecta*. – Academic Press, 2014. – P. 359–370.
172. Shoji, T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery / T. Shoji, T. Shinoka // *Transl Pediatr.* – 2018. – Vol. 7, № 2. – P. 188–195.
173. Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility / V. Catto, S. Farè, I. Cattaneo et al. // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – Vol. 54. – P. 101–111.
174. *Staphylococcus aureus* increases platelet reactivity in patients with infective endocarditis / A. Polzin, L. Dannenberg, R. M'Pembale et al. // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – P. 12933.

175. Stent-Only Versus Adjunctive Balloon Angioplasty Approach for Saphenous Vein Graft Percutaneous Coronary Intervention: Insights From DIVA Trial / F. Latif, L. Uyeda, R. Edson et al. // *Circ Cardiovasc Interv.* – 2020. – Vol. 13, № 2. – P. e008494.

176. STS Adult Cardiac Surgery Database: 2021 Update on Outcomes, Quality, and Research / M. E. Bowdish, R. S. D'Agostino, V. H. Thourani et al. // *Ann Thorac Surg.* – 2021. – Vol. 111, № 6. – P. 1770–1780.

177. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications / X. Ren, Y. Feng, J. Guo et al. // *Chem Soc Rev.* – 2015. – Vol. 44, № 15. – P. 5680–5742.

178. Sustained release of vancomycin from novel biodegradable nanofiber-loaded vascular prosthetic grafts: in vitro and in vivo study / K. S. Liu, C. H. Lee, Y. C. Wang et al. // *Int J Nanomedicine.* – 2015. – Vol. 10. – P. 885–891.

179. Sustained thromboresistant bioactivity with reduced intimal hyperplasia of heparin-bonded polytetrafluoroethylene propaten graft in a chronic canine femoral artery bypass model / J. Freeman, A. Chen, R. J. Weinberg et al. // *Ann. Vasc.Surg.* – 2018. – Vol. 49. – P. 295–303.

180. Synthesis and antibacterial bioactivities of cationic deacetyl linezolid amphiphiles / P. Y. Bai, S. S. Qin, W. C. Chu et al. // *Eur J Med Chem.* – 2018. – Vol. 155. – P. 925–945.

181. Synthesis and structureactivity relationship of novel 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane derivatives as potent antimicrobial agents / L. A. Yarinich, E. A. Burakova, B. A. Zakharov et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 95. – P. 563–573.

182. Synthetic amphiphiles as therapeutic antibacterials: lessons on bactericidal efficacy and cytotoxicity and potential application as an adjuvant in antimicrobial chemotherapy / S. Goswami, M. D. Adhikari, C. Kar et al. // *J. Mater. Chem. B.* – 2013. – Vol. 1. – P. 2612–2623.

183. Systematic review of guidelines for the management of asymptomatic and symptomatic carotid stenosis / A. L. Abbott, K. I. Paraskevas, S. K. Kakkos et al. // *Stroke*. – 2015. – Vol. 46. – P. 3288–3301.

184. Systemic and local antibiotic prophylaxis in the prevention of prosthetic vascular graft infection: an experimental study / F. J. Lehnhardt, G. Torsello, L. G. Claeys et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg*. – 2002. – Vol. 23, № 2. – P. 127–133.

185. Tabushi, I. Molecular recognition of nucleotides by means of ionic interaction in hydrophobic media / I. Tabushi, Y. Kobuke, J. Imuta // *Nucleic Acids Symp Ser*. – 1979. – № 6. – P. s175–s178.

186. The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions / M. F. Maitz, M. C. L. Martins, N. Grabow et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Vol. 94. – P. 33–43.

187. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model / Y. Matsuzakia, R. Iwaki, J. W. Reinhardt et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2020. – Vol. 115. – P. 176–184.

188. The grafts modified by heparinization and catalytic nitric oxide generation used for vascular implantation in rats / J. Gao, L. Jiang, Q. Liang et al. // *Regenerative biomaterials*. – 2018. – Vol. 5, № 2. – P. 105–114.

189. The in vivo characterization of electrospun heparin-bonded polycaprolactone in small-diameter vascular reconstruction / H. Y. Duan, X. Wu, Q. Guan et al. // *Vascular*. – 2015. – Vol. 23, № 4. – P. 358–365.

190. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria / S. M. Swaney, H. Aoki, M. C. Ganoza et al. // *Antimicrob. Agents Chemother*. – 1998. – Vol. 42. – P. 3251–3255.

191. The prophylactic efficacy of rifampicin-soaked graft in combination with systemic vancomycin in the prevention of prosthetic vascular graft infection: an experimental study / M. Sacar, I. Goksin, A. Baltalarli et al. // *J Surg Res*. – 2005. – Vol. 129, № 2. – P. 329–334.

192. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth / K. M. Blum, J. C. Zbinden, A. B. Ramachandra et al. // *Communications medicine*. – 2022. – Vol. 2, № 3.

193. Tissue engineering at the blood-contacting surface: a review of challenges and strategies in vascular graft development / D. Radke, W. Jia, D. Sharma et al. // *Adv. Healthcare Mater.* – 2018. – Vol. 7, № 15. – P. e1701461.

194. Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model / L. V. Antonova, E. O. Krivkina, V. V. Sevostianova et al. // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13, № 16. – P. 2637.

195. Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model / T. Fukunishi, C. A. Best, T. Sugiura et al. // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – P. e0158555.

196. Tissue-engineered vascular grafts for use in the treatment of congenital heart disease: From the bench to the clinic and back again / J. Patterson, T. Gilliland, M. Maxfield et al. // *Reg. Med.* – 2012. – Vol. 7. – P. 409–419.

197. Topaz, O. Cardiovascular Thrombus: From Pathology and Clinical Presentations to Imaging, Pharmacotherapy and Interventions / O. Topaz. – Academic Press, 2018. - 670 p.

198. Trivedi, P. C. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin / P. C. Trivedi, J. J. Bartlett, T. Pulinilkunnil // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – P. 1131.

199. Vascular Graft Infections, Mycotic Aneurysms, and Endovascular Infections: A Scientific Statement From the American Heart Association / W. R. Wilson, T. C. Bower, M. A. Creager et al. // *Circulation*. – 2016. – Vol. 134, № 20. – P. e412–e460.

200. Vascular Graft Pre-Treatment with Daptomycin Prior to Implantation Prevents Graft Infection with *Staphylococcus aureus* in an In Vivo Model / C.

Salmoukas, S. Ruemke, E. Rubalskii et al. // Surg Infect (Larchmt). – 2020. – Vol. 21, № 2. – P. 161–168.

201. Vascular tissue engineering: Fabrication and characterization of acetylsalicylic acid-loaded electrospun scaffolds coated with amniotic membrane lysate / S. Aslani, M. Kabiri, M. Kehtari et al. // Journal of Cellular Physiology. – 2019. – Vol. 234, № 9. – P. 16080–16095.

202. Willard, J. E. The use of aspirin in ischemic heart disease / J. E. Willard, R. A. Lange, L. D. Hillis // New England Journal of Medicine. – 1992. – Vol. 327, № 3. – P. 175–181.

203. Xue, Y. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts / Y. Xue, H. Xiao, Y. Zhang // Int J Mol Sci. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 3626–3655.

204. Zhu, A. P. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft / A. P. Zhu, Z. Ming, S. Jian // Applied Surface Science. – 2005. – Vol. 241, № 3–4. – P. 485–492.