

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КОМПЛЕКСНЫХ ПРОБЛЕМ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ»

УДК 616.13-089

№ госрегистрации

122120100042-3

от 01.11.2022



УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
академик РАН, профессор, д.м.н.
О.Л. Барбараш

«27» января 2023 г.

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

Разработка новых изделий медицинского назначения для сердечно-сосудистой хирургии. Переход к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Создание систем обработки больших объемов данных, машинного обучения и искусственного интеллекта
(промежуточный)

Шифр темы № 0419-2022-0003

Руководитель НИР, к.м.н.

Н.А. Кочергин

Кемерово, 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:
канд. мед. наук



Н.А. Кочергин
(Введение, заключение)

Ответственные исполнители:

Ведущий научный сотрудник
докт. мед. наук



Л.В. Антонова
(Материалы и методы, результаты)

Научный сотрудник
канд. мед. наук



Е.С. Прокудина
(Результаты 2, 3, 5, 7)

Научный сотрудник
канд. биол. наук



Е.А. Сенокосова
(Результаты 1, 2, 3, 4)

Научный сотрудник
канд. мед. наук



Н.М. Трошкинев
(Результаты 6, 7)

Исполнители темы:

Младший научный сотрудник



А.А. Арнт
(Результаты 4)

Младший научный сотрудник



А.Ю. Колесников
(Результаты 5)

Младший научный сотрудник



И. В. Ганюков
(Результаты 6)

Младший научный сотрудник



В. В. Лаптев
(Результаты 7)

РЕФЕРАТ

Отчет изложен на 31 странице, содержит 8 рисунков, 1 таблицу, 24 источника литературы.

Ключевые слова: сосудистая заплата, тканевая инженерия, эндотелизация, атеросклероз, внутрисосудистые методы визуализации, глубокое обучение, нейронные сети.

Цель исследования: Разработать прототип тканеинженерной сосудистой заплаты для артериальной реконструкции и изучить методы внутрисосудистой визуализации для оценки функционирования имплантата на овечьей модели с дальнейшей разработкой автоматизированной системы на основе глубокого машинного обучения.

Задачи исследования на 2022 год:

1. Разработать прототип тканеинженерной сосудистой заплаты для артериальной реконструкции.
2. Начать преклинические испытания разработанной заплаты на модели крупных лабораторных животных.
3. Выполнить оценку эндотелизации заплат с использованием методов прижизненной внутрисосудистой визуализации на различных сроках после имплантации.

Методы исследования:

1. Изготовление сосудистых заплат
2. Оценка структуры поверхности сосудистых заплат до и после модификации этанолом
3. Оценка физико-механических свойств
4. Оценка гемосовместимости
5. Имплантация сосудистых заплат в сонную артерию овец

6. Прижизненная внутрисосудистая визуализация сонных артерий овец с имплантированными заплатами

7. Гистологическое исследование

8. Сканирующая электронная микроскопия

Использованная аппаратура:

- аппарат Nanon-01A (МЕСС, Япония)
- система для напыления EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия)
- универсальная испытательная машина серии Z (Zwick/Roell, Германия)
- полуавтоматический 4-канальный анализатор АРАСТ 4004 (LABiTec, Германия)
- микротом HM 325 (Thermo Scientific, США)
- микроскоп AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия)
- аппарат для оптической когерентной томографии (Illumien, Abbott laboratories, США)

Полученные результаты и научная новизна

Разработан оригинальный протокол изготовления тканеинженерной сосудистой заплаты на основе 15 % фиброина шёлка. Разработанные матрицы не отличались от сонной артерии овцы по значениям предела прочности и удлинения, однако оказались жестче в 3,7 раза. Начаты преклинические испытания разработанной заплаты на модели овцы. Спустя 2 месяца имплантации тканеинженерные заплаты сохранили свою изначальную пористую структуру, представленную хаотично переплетенными нитями фиброина шелка, их диаметр при поперечном срезе совпадал с данными измерений с изображений сканирующей электронной микроскопии образцов до и после имплантации. Ксеноперикард имел обширные зоны разволокнения. Оба образца имели крайне низкую клеточность в толще материала, её плотность возрастала к внешней стороне заплаты с формированием адвентициального слоя, особенно в случае с заплатой из фиброина шелка. Таким образом, тканеинженерная заплата обладала хорошими структурными, физико-механическими и гемосовместимыми свойствами и

сохранила структурную стабильность спустя 2 месяца имплантации в сонную артерию овцы.

Впервые продемонстрирован концептуально новый подход в прижизненной визуализации заплат для оценки их ремоделирования на модели овцы. На оптической когерентной томографии выявлена равномерная гиперплазия неоинтимы по всей внутренней поверхности заплаты из фиброина шелка со средней толщиной 370 микрон; у заплаты из ксеноперикарда неоинтима неоднородна, выражена только в зоне анастомоза с толщиной 230 микрон. Данные сканирующей электронной микроскопии подтвердили выраженную гиперплазию неоинтимы тканеинженерной заплаты с толщиной 382 микрона; средняя толщина неоинтимы у заплаты из ксеноперикарда составила 105 микрон. На неоинтимае тканеинженерной заплаты обнаружен непрерывный монослой эндотелиоподобных клеток в отличие от ксеноперикарда с отсутствием целостности выстилки. Таким образом, обоснованы эффективность и безопасность выполнения оптической когерентной томографии с целью оценки эндотелизации заплат в эксперименте.

Степень внедрения

Разработанный протокол изготовления тканеинженерных сосудистых заплат и подход прижизненной визуализации и оценки их функционирования в эксперименте внедрены в научно-исследовательскую практику Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Область применения: гистология, патологическая анатомия, патологическая физиология, сосудистая биология, тканевая инженерия, сердечно-сосудистая хирургия.

Экономическая эффективность

Существующие искусственные и биоматериалы для сосудистой реконструкции имеют ряд недостатков. При имплантации сосудистых заплат из

ксеноперикарда высок риск образования аневризм, тромбообразования, быстрой дегградации, инфицирования, кальцификации и гиперплазии неоинтимы, что приводит к несостоятельности трансплантата и необходимости повторных реконструктивных операций. Разработка тканеинженерной заплаты пригодной по своим характеристикам для нужд регенеративной медицины позволит нивелировать эти недостатки. Прототип заплаты из фиброина шелка обладает биосовместимостью, имеет механически регулируемую пористую 3D-конструкцию, благоприятную для заселения собственными клетками пациента. Также не отмечена ускоренная дегградация материала, изменение его структуры, тромбообразование и выраженного воспаления.

Создание нового подхода прижизненной визуализации заплат для оценки их ремоделирования позволяет оценивать эндотелизацию на разных сроках после имплантации без выведения животных из эксперимента. Оптическая когерентная томография предоставляет изображения в высоком разрешении, которые предполагаются к использованию для получения массива данных с целью разработки специализированных алгоритмов автоматизированного распознавания структур на основе глубокого машинного обучения. Это позволит значительно снизить время исследования и интерпретации результатов, а также нивелировать ошибки, обусловленные человеческим фактором.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	8
Введение.....	9
Материалы и методы исследования.....	12
Результаты.....	16
Заключение.....	27
Список использованных источников.....	28
Приложение (список научных трудов по теме НИР).....	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОКТ – оптическая когерентная томография

PRP – обогащенная тромбоцитами плазма

RSF – регенерированный фиброин шелка

RSF-ethanol – водонерастворимая форма регенерированного фиброина шелка

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире ведется активная разработка и тестирование альтернативных материалов, в том числе биodeградируемых матриксов, которые способны интегрироваться с организмом пациента для восстановления функции кровеносного сосуда. Тканевая инженерия является одним из наиболее многообещающих подходов в этом направлении. Тканеинженерные сосудистые заплатки помогут избежать проблем, возникающих при использовании существующих материалов, благодаря восстановлению собственных тканей в месте имплантации.

Последние эффективные разработки в области проектирования тканеинженерных каркасов из биоматериалов сосредоточены на биомиметических микро-наноразмерных, пористых искусственных матрицах^{1,2}. Белки внеклеточного матрикса представляют собой превосходный естественный вариант каркасного материала для тканевой инженерии, который существует в «динамической реципрокности» с резидентными клетками. Компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген³, фибронектин, ламинин, эластин и гликозаминогликан, широко используются в тканевой инженерии в качестве натуральных каркасных материалов для поддержки процессов регенерации тканей^{4,5}. Так же используют и другие природные полимеры, такие как альгинат^{6,7}, целлюлоза и хитозан^{8,9}.

Хотя рассмотренные выше природные полимеры продемонстрировали многообещающие результаты, у этих материалов также есть много недостатков, включая высокую стоимость, плохие механические свойства и большой разброс между партиями, что затрудняет их применение в клинических целях. Поэтому следующим шагом мировой общественности стал поиск синтетических полимеров, пригодных по своим характеристикам для создания изделий для нужд регенеративной медицины. Такие полимеры, как полимолочная кислота, полиуретан, поли(лактид-со-гликолид) и поликапролактон широко используются в тканевой инженерии благодаря возможности регулировать и настраивать их механические характеристики и скорость деградации¹⁰. Однако синтетические

полимеры слабо интегрируют с организмом после имплантации, поскольку не содержат на поверхности сайтов для клеточной адгезии. Кроме того, многие продукты разложения этих полимеров состоят из кислых соединений, которые вредны для организма и могут вызывать нежелательные иммунные реакции. Поскольку большинству природных и синтетических полимерных каркасов обладают присущими им ограничениями, основной вектор современного материаловедения в последнее десятилетие связана с поиском биоматериалов, сочетающих в себе достоинства природных и синтетических полимеров.

Одним из перспективных материалов для тканевой инженерии стал фиброин шелка. Шелк тутового шелкопряда более 4000 лет используется в традиционной текстильной промышленности благодаря его уникальным физическим свойствам, таким как легкость, гибкость и высокая механическая прочность¹¹. Шелк одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA (США)) для использования в шовных материалах и применялся в биомедицинских целях в течение последних двух десятилетий. Фиброин является основным белком шелка, который получают из коконов шелкопряда *Bombyx mori* и родственных видов.

Фиброин шелка активно исследуется в качестве потенциального биополимера для тканевой инженерии, поскольку обладает высокой биосовместимостью¹², низкой иммуногенностью, контролируемой биорезорбируемостью и механическими свойствами^{13,14,15}. Отмечена способность фиброина шелка проявлять синергизм при комбинации с другими полимерами (формирования композитных каркасов), которые могут стимулировать клеточное поведение (например, дифференцировку, пролиферацию и прикрепление)^{16,17,18}. Кроме того, из фиброина шелка можно изготавливать биоматериалы в различных форматах, таких как пленки, гидрогели, губки, трехмерные структуры и наночастицы¹⁹.

Таким образом, работы последних лет подтверждают перспективность фиброина шелка для разработки изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии^{20,21}. Использование естественного природного материала для

изготовления сосудистых заплат позволит получить изделия с высоким уровнем биосовместимости.

Еще одной научной проблемой является необходимость прижизненной визуализации состоятельности и ремоделирования сердечно-сосудистых имплантатов. На сегодняшний день морфологическая диагностика ремоделирования имплантированных в сосудистое русло протезов клапанов, сосудов или сосудистых заплат заключается в гистологическом исследовании данных изделий после их эксплантации. Однако важным аспектом успешного долгосрочного функционирования является полноценная эндотелизация всей внутренней поверхности протеза, контактирующей с кровью. Поэтому разработка метода оценки эндотелизации как изделий, используемых в клинике, так и прототипов изделий, разрабатываемых для нужд сердечно-сосудистой хирургии и планируемых к выводу на рынок, обладает высокой практической значимостью.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) использует ближний инфракрасный свет, который позволяет выполнять визуализацию с высоким разрешением. Разрешающая способность составляет до 10 мкм при осевом разрешении и до 20 мкм при боковом разрешении, что примерно в 10 раз выше, чем при внутрисосудистом ультразвуке²². Эта отличительная особенность ОКТ позволяет получать высококачественные изображения микроструктур, таких как фиброзная капсула, *vasa vasorum*, скопление липидов и макрофагов, оценивать эндотелизацию различных сосудистых протезов²³.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изготовление и модификация сосудистых заплат

Сосудистые заплаты были изготовлены из 15% раствора регенерированного фиброина шелка (RSF) методом электроспиннинга на аппарате Nanon-01A (MECC, Япония). В качестве растворителя использовали гексофлуоропропанол. Последующая поверхностная модификация полученных матрицков проведена в 98% этаноле с целью перевода матрицков из регенерированного фиброина шелка в водонерастворимую форму (RSF-ethanol).

Оценка структуры поверхности сосудистых заплат до и после модификации этанолом

Сосудистые заплаты RSF и RSF-ethanol размером 0,5×0,5 см подвергали золото-палладиевому напылению с получением покрытия толщиной 15 нм при использовании системы для напыления EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия) и изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Оценка физико-механических свойств

Оценку механических свойств графтов проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75 на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), с использованием датчика с номинальной силой 50 Н с пределом допустимой погрешности ±1%, скорость перемещения траверсы при испытании 50 мм/мин. В качестве контроля использовали нативную внутреннюю грудную артерию человека, как «золотой» стандарт при операциях аортокоронарного шунтирования. Сегменты внутренней грудной артерии забирали при проведении операции коронарного шунтирования у пациентов, подписавших договор информированного согласия на забор материала. Дополнительным контролем выступила сонная артерия овцы – сосуд, в который планировалось имплантировать сосудистую заплату при проведении преклинических испытаний. В качестве группы сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут

«КемПериплас-Нео» (ЗАО «НеоКор», Россия), применяемый в клинической практике в качестве сосудистой заплаты биологического происхождения.

Предел прочности материала оценивали, как максимальное напряжение при растяжении (МПа) до начала разрушения. Поскольку исследуемые образцы имели существенное различие по толщине, и как следствие, площади поперечного сечения, в качестве альтернативного критерия прочности использовали абсолютное значение максимальной силы, приложенной к образцу до начала разрушения (F_{max} , Н). Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа), который определяли в диапазонах физиологического давления (80 – 120 мм рт. ст.).

Оценка гемосовместимости

С целью оценки гемосовместимых свойств разработанных заплат исследовали агрегацию тромбоцитов после контакта свежей цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP) с поверхностью заплат.

Методику выполняли в соответствии со стандартом ISO 10993.4. В свежую донорскую кровь добавляли 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Обогащенную тромбоцитами плазму получали путем центрифугирования цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут. В качестве индуктора использовали водный раствор аденозин 5-дифосфата с концентрацией 0,2 мМ/л. Интактную PRP использовали в качестве положительного контроля. Для калибровки прибора применяли бедную тромбоцитами плазму, полученную повторным центрифугированием PRP при 4000 об/мин в течение 20 минут. Перед измерением уровень ионов кальция в цитратной крови восстанавливали добавлением 0,025М раствора хлорида кальция. Для этого в 250 мкл обедненной тромбоцитами плазмы вносили 25 мкл раствора хлорида кальция и выдерживали 3 минуты. После чего определяли максимум агрегации тромбоцитов с помощью полуавтоматического 4-канального анализатора АРАСТ 4004 (LABiТес, Германия).

Имплантация сосудистых заплат в сонную артерию овец

Серия экспериментов проведена на овцах эдильбаевской породы, массой 42-45 кг, все животные – несуклящие самки. Животные оперированы последовательно. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 15 от 11.09.2018 г.).

Была проведена имплантация в сонную артерию овец биodeградируемых сосудистых заплат RSF-ethanol (n=3) и ксеноперикардальных заплат КемПериплас-Нео (n=3). Размер заплат 40,0 x 4,0 мм. Продолжительность наблюдения после имплантации составит 6 месяцев. Основные точки прижизненной визуализации и вывода животных из эксперимента – 2, 4 и 6 месяцев после имплантации.

Анестезиологическое пособие. Премедикация: ксилазин (Ксиланит) 0,05-0,25 мл на 10 кг массы животного + атропин 1 мг. в/м. Вводный наркоз: 5-7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд после вводится атракурия безилат (Риделат) в/в доза 0.5-0.6 мг/кг. Интубация трахеи эндотрахеальной трубкой диаметром 9,0. Поддержание наркоза: Севоран 2-4 об %, Риделат вводили путем непрерывной инфузии со скоростью 0.3-0.6 мг/кг/ч.

Мониторинг: АД, ЧСС, SpO₂. ИВЛ: ЧД- 12-15/мин, РЕЕР 7-9 mbar, ДО 6-8 мл/кг, FiO₂- 40-60%.

Основной этап: Доступ к сонной артерии; системная гепаринизация – 5000 ЕД в/в; пережатие сонной артерии, продольный разрез сонной артерии длиной 40 мм, имплантация сосудистых заплат размером 40 мм x 4 мм отдельными узловыми швами нитью Prolene 6/0 (Ethicon, США). Стандартный протокол профилактики воздушной эмболии и запуск кровотока; ушивание раны нитью Vicril 2,0 (Ethicon,

США); обработка шва клеем БФ, эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0.4 мл; экстубация.

Интраоперационное медикаментозное введение: инфузия 0,9% NaCl 500 мл – в/в капельно; Аксетин (цефуроксим) 1,5 г – в/в капельно.

Послеоперационное медикаментозное ведение: антибиотикотерапия (Аксетин (цефуроксим) 1,5 г – в/м 2р/сут + эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0.4 мл в течение 5 дней. При доказанной проходимости сосудов с имплантированными заплатами: клопидогрел 75 мг перорально 1р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2р/сут).

Прижизненная визуализация

Послеоперационный УЗ-скрининг проходимости сосудов с заплатами выполняли спустя 1 и 5 сутки, далее – 1 раз в 2 месяца вплоть до предполагаемого срока вывода животного из эксперимента.

Прижизненная визуализация ремоделирования заплат проведена по следующей методике: с помощью ОКТ выполнено сканирование сегмента (5 см) сонной артерии овцы с имплантированной заплатой. Для удаления форменных элементов крови использовалась мануальная инфузия рентгенконтрастного средства. Сроки проведения прижизненной визуализации 1 раз в 2 месяца с момента имплантации.

Гистологическое исследование

Проведено гистологическое исследование эксплантированных образцов заплат, имплантированных на срок 2 месяца, с окрашиванием гематоксилин-эозином. Эксплантированные образцы фиксировали в формалине в течение 24 часов, затем промывали проточной водопроводной водой для удаления фиксирующего раствора и обезвоживали в IsoPrep (BioVitrum, Россия). Пропитывали образцы парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 минут в каждой порции. Пропитанные образцы заливали парафином ГИСТОМИКС (БиоВитрум, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы НМ 325 (Thermo Scientific, США). Затем образцы помещали в термостат и сушили в течение ночи при 37 °С. После полного

высыхания, образцы депарафинизировали в о-ксилоле (3 порции) в течение 1-2 мин и дегидратировали в 96% спирте (3 порции) в течение 1-2 мин. Далее депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином-эозином в соответствии с протоколом окрашивания. Образцы исследовали с помощью микроскопа АХЮ Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива x50, x100 и x200.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Получение регенерированного фиброина шелка

Шелк состоит из двух волокон фиброина, которые окружают кокон тутового шелкопряда, склеены вместе и покрыты серицином (шелковый клей). Шелковое волокно содержит 70-75% фиброина (нерастворимого в воде белка), 20-25% серицина (растворимого в воде белка), 2-3% различных минералов, 1-1,5% восков и масел. Методика его получения из коконов тутового шелкопряда приведена на рисунке 1. Продуктом процедуры выделения фиброина шелка стали лиофилизированные губки или пленки, высушенные при 60⁰ С.

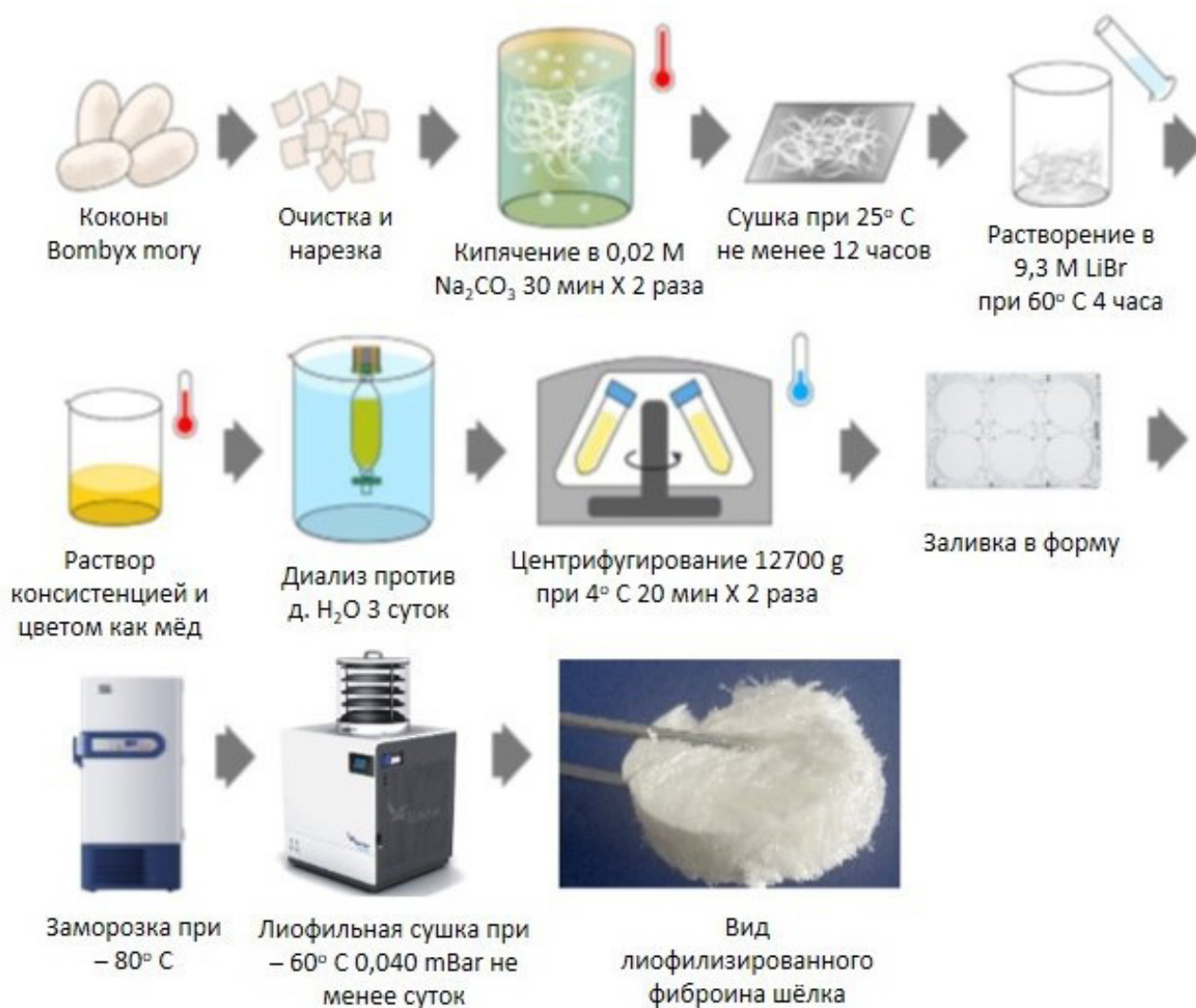


Рисунок 1. Схема получения регенерированного фиброина шелка

2. Изготовление сосудистых заплат методом электроспиннинга

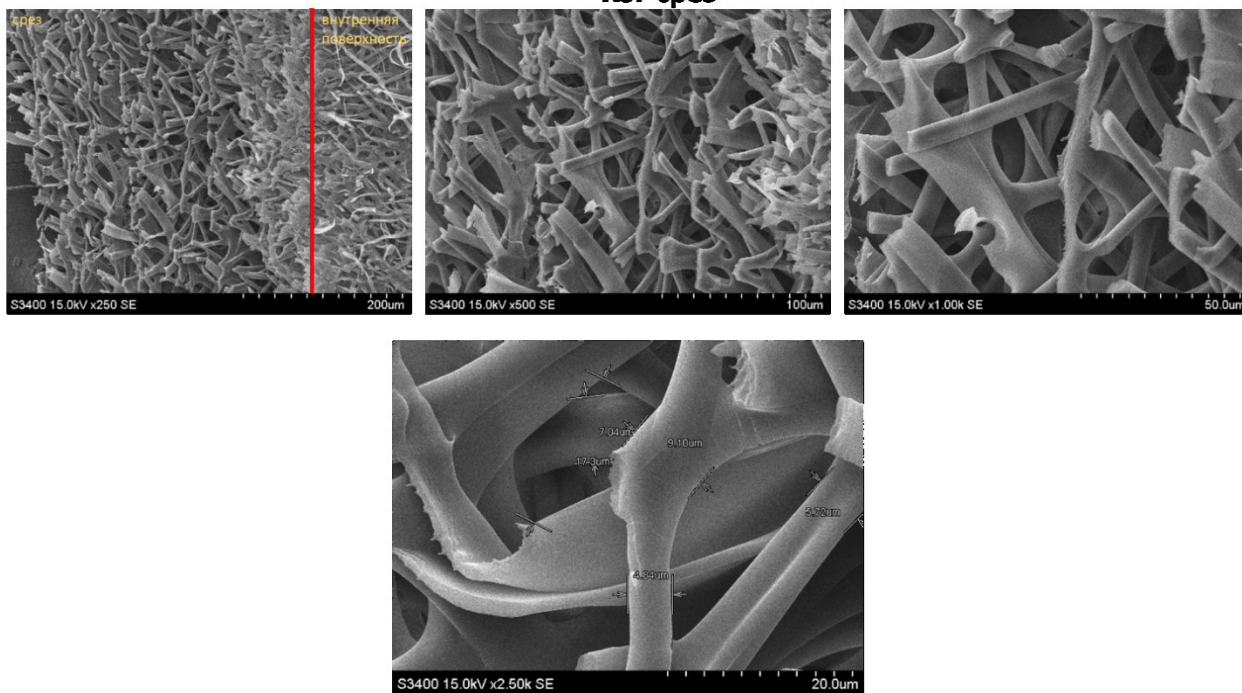
Согласно литературным данным, наиболее эффективным растворителем для фиброина шёлка является гексафторпропанол²⁴. Для изготовления сосудистых заплат был использован 15% раствор RSF в гексафторпропанол. Определен оптимальный режим изготовления матриксов из RSF методом электроспиннинга: игла 22G; расстояние от иглы до намоточного коллектора - 15 см; напряжение - 20 kV; скорость вращения коллектора - 200 оборотов в минуту; скорость подачи раствора - 1 мл/ч.

3. Перевод водорастворимой формы *b*-листов RSF в водонерастворимую

Инкубация фиброинового материала в спиртах способна инициировать образование кристаллической структуры бета-листа в белковой молекуле с

образованием водонерастворимой формы материала. Этот прием значительно увеличивает прочность и снижает срок деградации регенерированного фиброина шелка. С целью сшивки был использован 98% этанол (ethanol). При выполнении сканирующей электронной микроскопии матриц из фиброина шелка до (RSF) и после сшивки (RSF-ethanol) выявлено, что инкубация в этаноле не привела к визуальному изменению волокон (рис. 2). Помимо этого, серицин при неудовлетворительном рафинировании может оставаться на волокнах матрикса RSF в виде белых точек, видных на снимках, выполненных методом сканирующей электронной микроскопии. На наших образцах таких включений не обнаружено (рис. 2). Таким образом, внутренняя поверхность матриц RSF-ethanol отличалась «плоскими волокнами», очень тесно переплетенными между собой, с малым количеством неглубоких пор и большим числом участков зон со «спайками». На срезе матрикс RSF-ethanol представлен объемными волокнами без крупных спаек и большим количеством объемных пор. Волокна примерно одинаковы по диаметру. Средний диаметр волокон на поверхности $4,8 \text{ мкм} \pm 1,39$, в толще матрикса - $5,45 \text{ мкм} \pm 2,38$. Отмечены поперечные спайки с образованием центра до $9,1 \text{ мкм}$, и продольные с образованием «толстого волокна» до $11,1 \text{ мкм}$. На внутренней поверхности поры в основном «плоские», глубоких - относительно мало (рис. 3). В толще поры разной формы и разного объема, «вход» в пору может достигать 17 мкм . Сшивка матриц из фиброина шелка 98% этанолом не привела к изменению структуры матриц (рис. 2, 3).

RSF срез



RSF поверхность

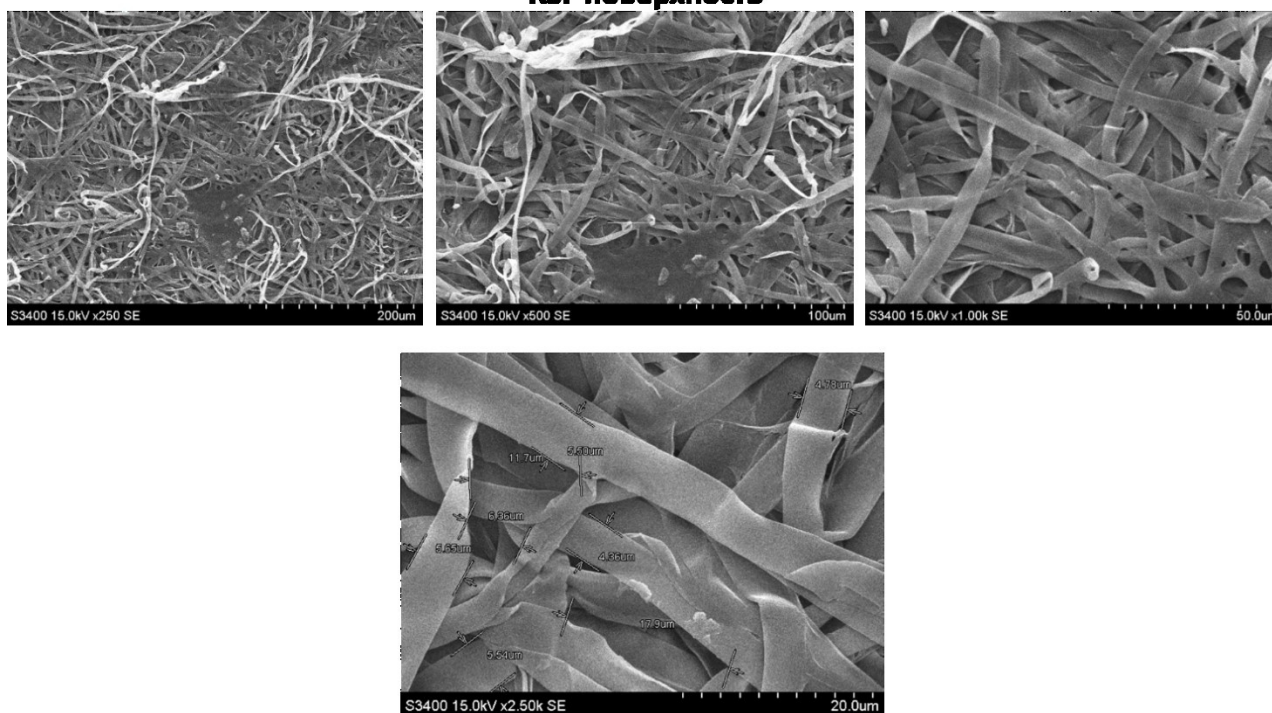
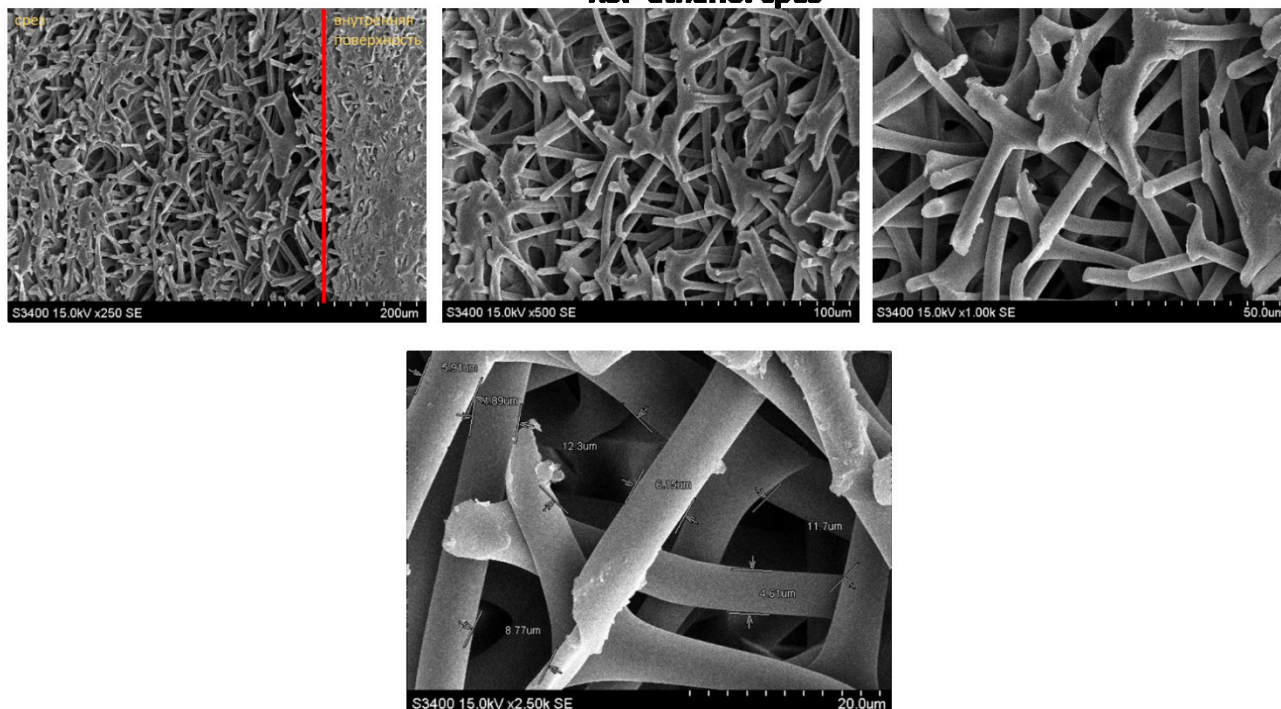


Рисунок 2. Несшитый матрикс на основе фиброина шелка (RSF)

RSF-ethanol чрез



RSF-ethanol поверхность

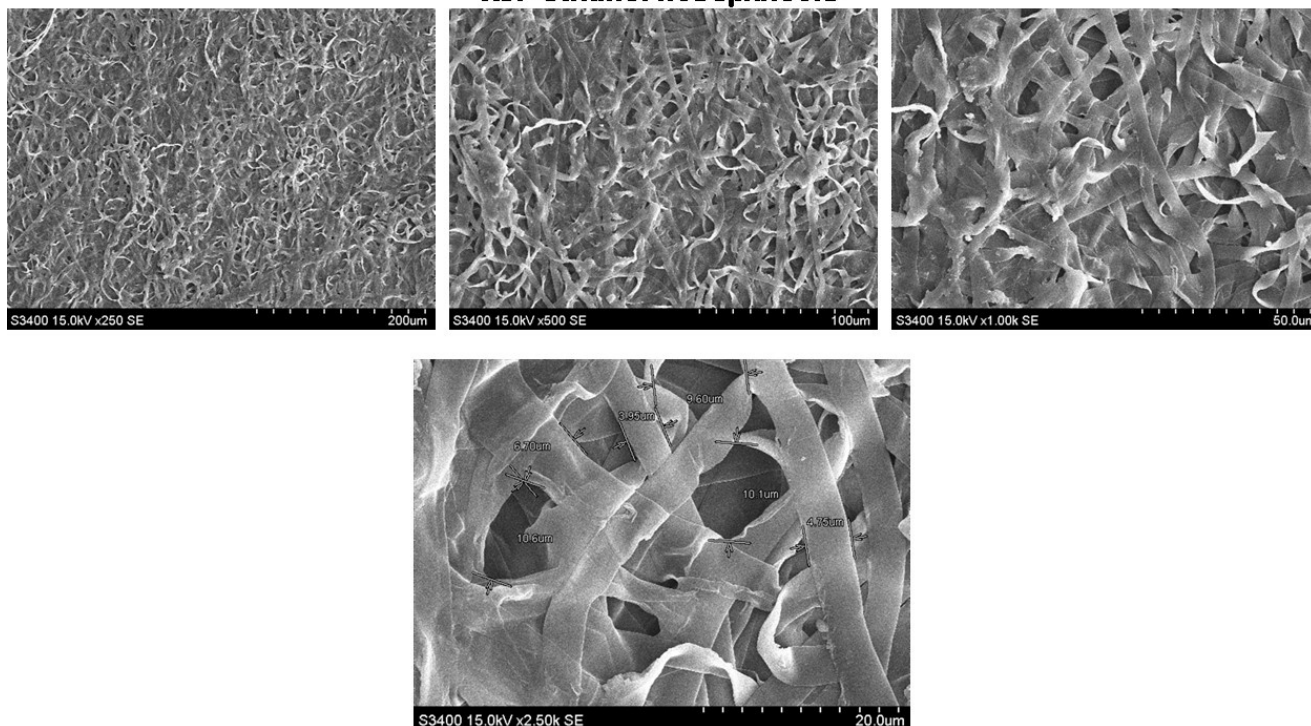


Рисунок 3. RSF-матрикс, сшитый 98 % этанолом (RSF-ethanol)

4. Физико-механические свойства заплат

Изучены физико-механические свойства матриксов RSF-ethanol в сравнении с нативными сосудами: внутренней грудной артерией человека и сонной артерией овцы. Также для сравнения использован ксеноперикардальный лоскут

«КемПериплас-Нео», в настоящее время активно используемый в клинической практике в качестве сосудистой заплаты (табл. 1).

Таблица 1. Физико-механические свойства полимерных заплат RSF-ethanol в сравнении с лоскутом «КемПериплас-Нео», сонной артерией овцы и внутренней грудной артерией человека.

Данные представлены как Ме (25-75%)

	Напряжение, МПа	F _{max} , Н	Относи- тельное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
RSF-ethanol	1,78 (1,71-1,8) ■	1,16 (1,15-1,17) ■	56,42 (52,08- 60,75)**	7,96 (7,37-8,53) */**/■
Сонная артерия овцы	1,2 (1,06 - 1,9)*/■	1,01 (0,88-1,42) ■	158,5 (126,0 - 169,5)*/#	0,49 (0,39 - 0,66)*/#
внутренняя грудная артерия	2,48 (1,36-3,25) ■	0,92 (0,59-1,72) ■	29,72 (23,51-39,62)**	2,42 (1,87-3,19)**/#
«КемПерип-лас- Нео»	10,06 (9,12-1,38)*/**/#	15,4 (12,6-6,2)*/**/#	64,96 (61,08-72,6) */**	1,11 (1,02-1,34) */#

* – $p < 0,05$ относительно *A.tammaria*, ** - $p < 0,05$ относительно сонной артерии овцы,
– $p < 0,05$ относительно RSF-ethanol, ■ – $p < 0,05$ относительно КемПериплас-Нео.

Сосудистые заплаты из фиброина шелка RSF-ethanol по прочности были схожи с нативными сосудами (сонной артерией овцы и внутренней грудной артерией человека). Однако жесткость заплат RSF-ethanol в 3,28 раза превзошла аналогичный показатель внутренней грудной артерии и в 16,2 раза - жесткость сонной артерии овцы ($p < 0,05$). Лоскут «КемПериплас-Нео» по своим физико-механическим характеристикам отличался и от внутренней грудной артерии и сонной артерии овцы (табл. 1). Так, напряжение и сила, приложенная к образцу до начала его разрушения, у ксеноперикарда оказалась в 4 и 16,7 раз выше, чем у внутренней грудной артерии, и в 8,4 и 15,2 раза выше, чем у сонной артерии овцы ($p < 0,05$). При этом модуль Юнга у КемПериплас-Нео оказался в 2,6 раза ниже, чему

внутренней грудной артерии, и в 2,3 раза ниже, чем у сонной артерии овцы ($p < 0,05$).

Таким образом, после сшивки этанолом сосудистые заплаты RSF-ethanol утратили некоторую мягкость, однако эластичность соответствовала уровню нативных сосудов.

5. Результаты оценки гемосовместимости заплат RSF-ethanol

При изучении агрегационной активности тромбоцитов не выявлено достоверной разницы между интактной PRP (83,97 (81,75; 86,14) %), сосудистыми заплатами RSF-ethanol (86,41 (84,45; 90,03) %) и КемПериплас-Нео (85,03 (83,57; 87,16) %), (рис. 4). Данный факт свидетельствует о высокой гемосовместимости заплат из фиброина шелка.

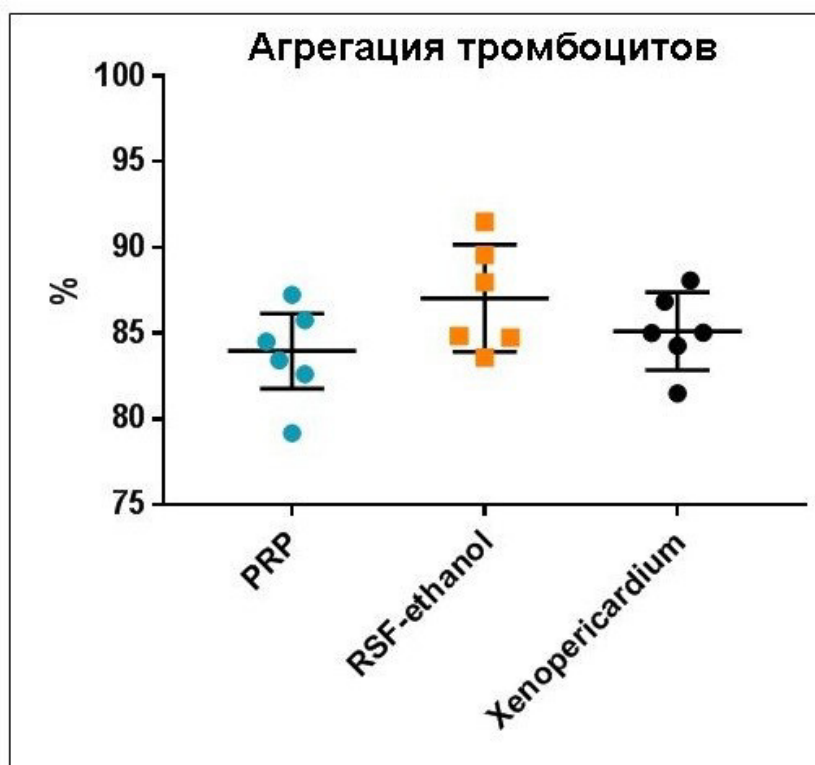


Рисунок 4. Результаты агрегации тромбоцитов на поверхности сосудистых заплат в сравнении с интактной обогащенной тромбоцитами плазмой. Результаты представлены в виде Ме (25%; 75%).

5. Первые результаты имплантации сосудистых заплат в сонную артерию овцы

Выполнены имплантации сосудистых заплат PSF-ethanol (n=3) и «КемПерипалс-Нео» (n=3). Изображения имплантированных заплат с запущенным током крови представлены на рисунке 5.

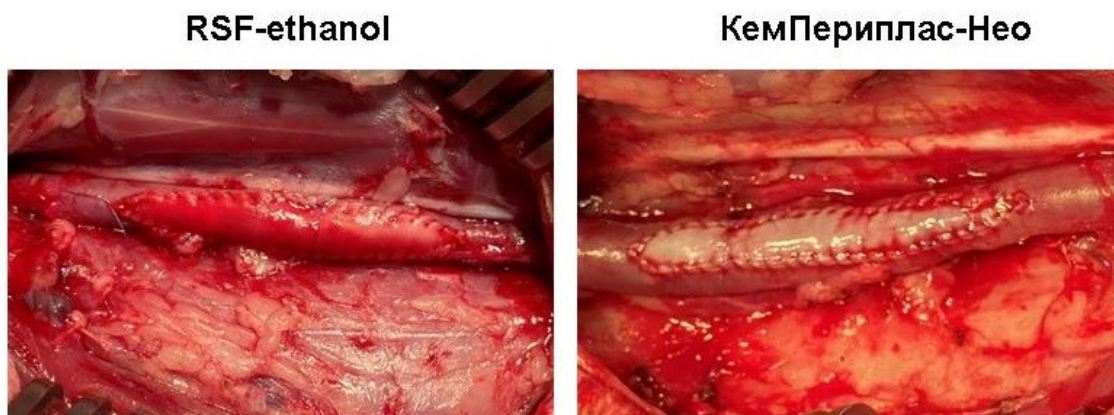
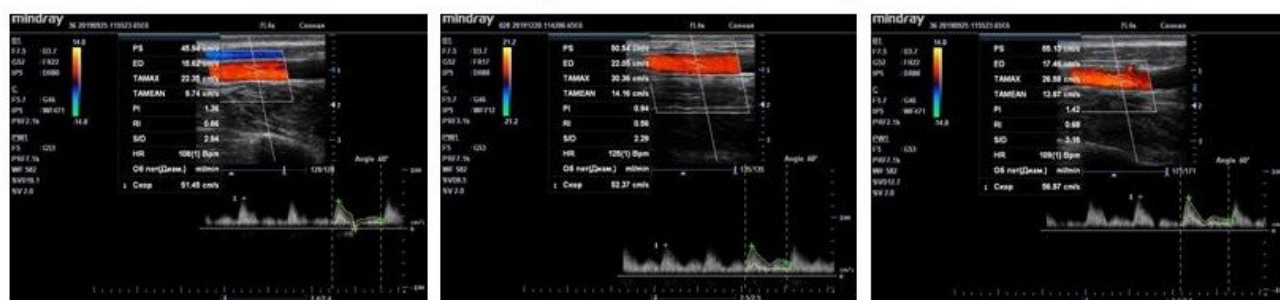


Рисунок 5. Макрофото имплантированных заплат после запуска кровотока

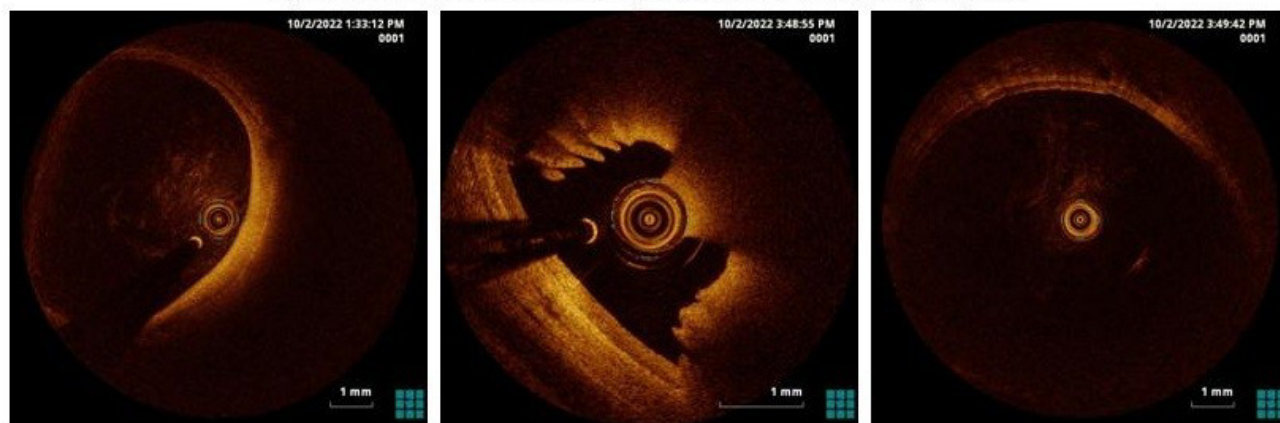
Каждая овца получила всё требуемое медикаментозное сопровождение до, во время операции и в течении 30 дней после нее. Каждой овце проведено ультразвуковое исследование сонной артерии на предмет проходимости зоны артерии с заплатой с замером основных характеристик: диаметр комплекса артерия + протез, скорость кровотока. При этом скорость кровотока в просвете сосудов с данными разновидностями заплат была идентична и достоверно не отличалась от скорости кровотока в интактном сосуде (рис. 6).

В ходе прижизненной визуализации ремоделирования заплат обнаружено, что спустя 2 месяца имплантации заплат в сонную артерию овец в обеих группах сформировалась неоинтима. На ОКТ выявлена равномерная гиперплазия неоинтимы по всей внутренней поверхности заплаты из фиброина шелка со средней толщиной 370 микрон; у заплаты из ксеноперикарда неоинтима неоднородна, выражена только в зоне анастомоза с толщиной 230 микрон (рис. 6).

УЗИ с функцией доплера



Прижизненная когерентная томография



RSF-ethanol

КемПериплас-Нео

Сонная артерия
овцы

Рисунок 6. Результаты ультразвукового исследования с функцией доплера и прижизненной ОКТ сосудистых заплат спустя 2 месяца имплантации (в сравнении с интактной сонной артерией овцы)

6. Результаты морфологического исследования эксплантированных заплат

При изучении гистологической картины эксплантированных заплат RSF-ethanol сохранность первоначальной структуры заплат: определились неизменные волокна фибрина (рис. 7: А-Б; рис. 8: А-Д). Расслоения в толще матрикса - незначительные.

2 месяца имплантации

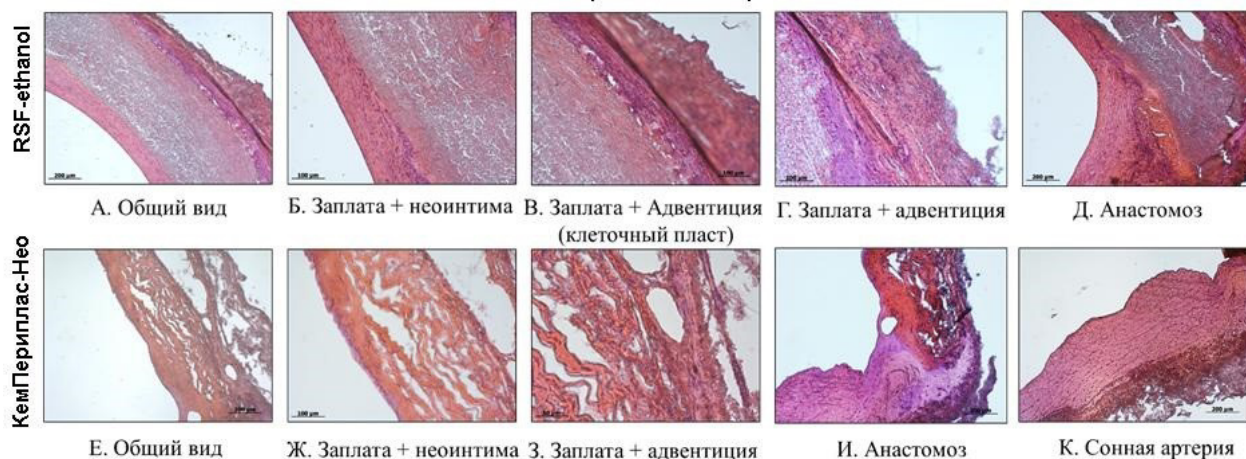


Рисунок 7. Гистология эксплантированных заплат из фиброина шёлка и ксеноперикарда через 2 месяца. Гематоксилин и эозин

Выявлена гиперплазия неоинтимы, которая имела равномерную толщину на всем протяжении заплаты (рис. 6: А, Б, Д; рис.7: А, В). Эндотелиоподобные клетки покрывали всю поверхность неоинтимы, обращенную в просвет сосуда. Клеточность стенки заплаты была крайне низкой в центральной части с увеличением количества клеток в зонах, приближенных к анастомозам. Эластиновые волокна не определялись. Коллагеновые волокна выявлены преимущественно во внешней соединительнотканной капсуле, сформировавшейся вокруг заплаты со стороны адвентиции. Вновь сформированный адвентициальный слой был ярко выражен, с высокой наполненностью фибробластоподобными клетками (рис. 7: В, Г).

2 месяца имплантации

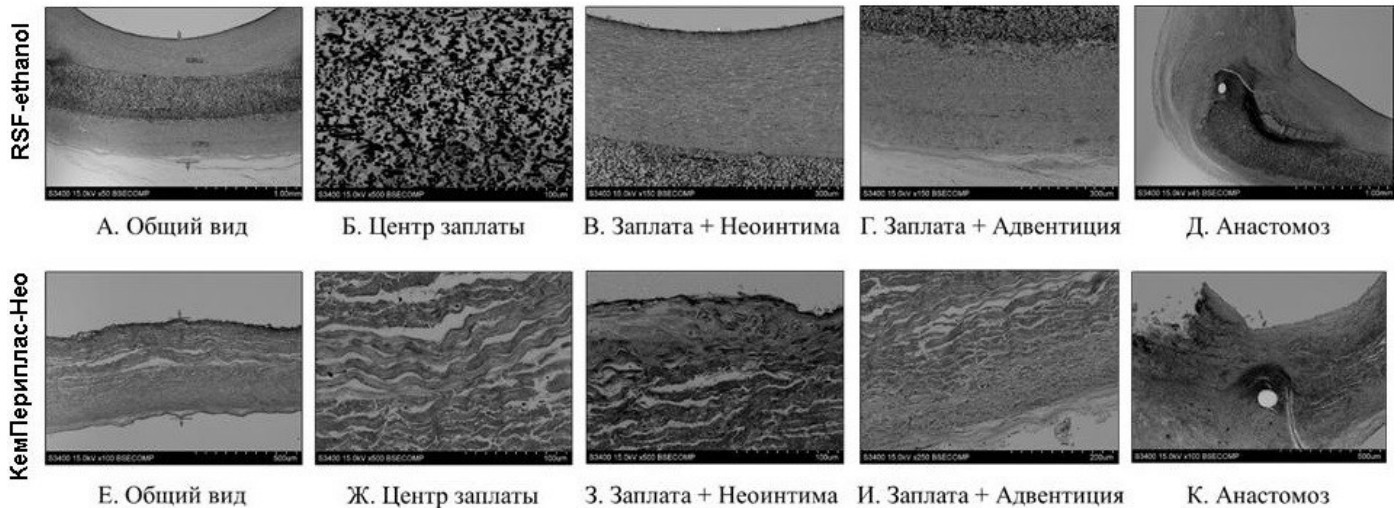


Рисунок 8. Сканирующая электронная микроскопия заплат из фиброина шёлка и ксеноперикарда спустя 2 месяца имплантации

Эксплантированная заплата КемПериплас-Нео имела характерную коллагеновую структуру бычьего перикарда. При этом выявлено значительное расслоение стенки заплаты вдоль всей ее длины (рис. 7: Е-И; рис. 8: Е-К). В отличие от заплаты из фиброина шелка выраженная гиперплазия неоинтимы в ксеноперикардальной заплате обнаружена только в зонах анастомозов (рис. 7: Е, Ж, И; рис. 8: Е, З, К). Однако в центре заплаты толщина неоинтимы значимо тоньше относительно фиброина шелка. Эндотелизация внутренней поверхности неоинтимы проходила менее качественно – без формирования эндотелиального монослоя. Обнаружен прерывистый слой эндотелиоподобных клеток (рис. 7: Ж; рис. 8: З). Клеточность стенки ксеноперикардальной заплаты – крайне низкая, эластин четко не визуализировался (рис. 7: Е-З; рис. 8: Е-К). При этом сформировался тонкий адвентициальный слой, содержащий фибробластоподобные клетки (рис. 7: Ж, З; рис. 8: И).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан оригинальный протокол изготовления тканеинженерной сосудистой заплаты на основе 15 % фиброина шёлка. Тканеинженерная заплата обладала хорошими структурными, физико-механическими и гемосовместимыми свойствами и сохранила структурную стабильность спустя 2 месяца имплантации в сонную артерию овцы. Окончательная оценка качества ремоделирования данной заплаты будет проведена после получения результатов ее 6-месячной имплантации в сонную артерию овцы.

Впервые продемонстрирован концептуально новый подход в прижизненной визуализации заплат для оценки их ремоделирования на модели овцы. ОКТ продемонстрировала свою эффективность и безопасность в оценке эндотелизации и ремоделирования заплат в эксперименте.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

-
- ¹ Rosellini E, Barbani N, Lazzeri L, Cascone MG. Biomimetic and Bioactive Small Diameter Tubular Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Biomimetics*. 2022; 7(4):199. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7040199>.
- ² Xie, C., Guo, T., Wang, W. et al. Scaffold Engineering with Flavone-Modified Biomimetic Architecture for Vascular Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Regen Med* 19, 755–767 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13770-022-00448-2>
- ³ Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafoschi F, Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019, 12;7:166. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166
- ⁴ Khanna A, Zamani M, Huang NF. Extracellular Matrix-Based Biomaterials for Cardiovascular Tissue Engineering. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(11):137. Published 2021 Oct 22. doi:10.3390/jcdd8110137
- ⁵ Brown, B.N.; Badylak, S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl. Res*. 2014, 163, 268–285
- ⁶ Beltran-Vargas NE, Peña-Mercado E, Sánchez-Gómez C, Garcia-Lorenzana M, Ruiz JC, Arroyo-Maya I, Huerta-Yeppez S, Campos-Terán J. Sodium Alginate/Chitosan Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering: The Influence of Its Three-Dimensional Material Preparation and the Use of Gold Nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2022 Aug 9;14(16):3233. doi: 10.3390/polym14163233
- ⁷ Lee, K.Y.; Mooney, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci*. 2012, 37, 106–126
- ⁸ Lipovka, A.; Kharchenko, A.; Dubovoy, A.; Filipenko, M.; Stupak, V.; Mayorov, A.; Fomenko, V.; Geydt, P.; Parshin, D. The Effect of Adding Modified Chitosan on the Strength Properties of Bacterial Cellulose for Clinical Applications. *Polymers* 2021, 13, 1995. <https://doi.org/10.3390/polym13121995>
- ⁹ Hickey, R.J.; Pelling, A.E. Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2019, 7, 45
- Croisier, F.; Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur. Polym. J*. 2013, 49, 780–792

-
- ¹⁰ Kirillova A, Yeazel TR, Asheghali D, Petersen SR, Dort S, Gall K, Becker ML. Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers. *Chem Rev.* 2021 Sep 22;121(18):11238-11304. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01200
- ¹¹ Huang, W.; Ling, S.; Li, C.; Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* 2018, 47, 6486–6504
- ¹² Singh R., Eitler D. Morelle R. et al. Optimization of cell seeding on electrospun PCL-silk fibroin scaffolds. *European Polymer Journal* 134 (2020) 109838
- ¹³ Sun, W.; Zhang, Y.; Gregory, D.A.; Jimenez-Franco, A.; Tomeh, M.A.; Lv, S.; Wang, J.; Haycock, J.W.; Lu, J.R.; Zhao, X. Patterning the neuronal cells via inkjet printing of self-assembled peptides on silk scaffolds. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 2020, 30, 686–696.
- ¹⁴ Kopp A., Smeets R., Gosau M., Kröger N., et al. Effect of process parameters on additive-free electrospinning of regenerated silk fibroin nonwovens. *Bioactive Materials* 2020, 5(2), 241-252. doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.010.
- ¹⁵ Zhang, C.; Zhang, Y.; Shao, H.; Hu, X. Hybrid Silk Fibers Dry-Spun from Regenerated Silk Fibroin/Graphene Oxide Aqueous Solutions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, 8, 3349–3358
- ¹⁶ He, P.; Sahoo, S.; Ng, K.S.; Chen, K.; Toh, S.L.; Goh, J.C.H. Enhanced osteoinductivity and osteoconductivity through hydroxyapatite coating of silk-based tissue-engineered ligament scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2013, 101, 555–566.
- ¹⁷ Cai, Z.-X.; Mo, X.-M.; Zhang, K.-H.; Fan, L.-P.; Yin, A.-L.; He, C.-L.; Wang, H.-S. Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite Nanofibers for Wound-dressing Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 3529–3539.
- ¹⁸ Wang, J.; Yang, Q.; Cheng, N.; Tao, X.; Zhang, Z.; Sun, X.; Zhang, Q. Collagen/silk fibroin composite scaffold incorporated with PLGA microsphere for cartilage repair. *Mater. Sci. Eng. C* 2016, 61, 705–711
- ¹⁹ Sun, W.; Gregory, D.A.; Tomeh, M.A.; Zhao, X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1499. <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>

²⁰ Alessandrino A, Chiarini A, Biagiotti M, Dal Prà I, Bassani GA, Vincoli V, Settembrini P, Pierimarchi P, Freddi G, Armato U. Three-Layered Silk Fibroin Tubular Scaffold for the Repair and Regeneration of Small Caliber Blood Vessels: From Design to in vivo Pilot Tests. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019 Nov 29;7:356. doi: 10.3389/fbioe.2019.00356.

²¹ Chan, A.H.P., Filipe, E.C., Tan, R.P. et al. Altered processing enhances the efficacy of small-diameter silk fibroin vascular grafts. *Sci Rep* 9, 17461 (2019).

Doi:10.1038/s41598-019-53972-y

²² Raïber L, Mintz GS, Koskinas KC, Johnson TW, Holm NR, Onuma Y, Radu MD, Joner M, Yu B, Jia H, Meneveau N, de la Torre Hernandez JM, Escaned J, Hill J, Prati F, Colombo A, di Mario C, Regar E, Capodanno D, Wijns W, Byrne RA, Guagliumi G; ESC Scientific Document Group. Clinical use of intracoronary imaging. Part 1: guidance and optimization of coronary interventions. An expert consensus document of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions. *Eur Heart J* 2018;39:3281–3300. doi:10.1093/eurheartj/ehy285

²³ Kataoka Y, Hammadah M, Puri R, et al. Plaque microstructures in patients with coronary artery disease who achieved very low low-density lipoprotein cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2015;242:490-5. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.005

²⁴ Sun, W.; Gregory, D.A.; Tomeh, M.A.; Zhao, X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1499.

<https://doi.org/10.3390/ijms22031499>

ПРИЛОЖЕНИЕ

Список научных трудов по теме НИР

Статьи:

1. Кочергин Н.А., Синьков М.А., Ваккосов К.М., Ганюков В.И. Методика Szabo против стандартного бифуркационного стентирования коронарных артерий. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2022;11(4S): 57-64. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4S-57-64

Доклады:

1. Кочергин Н.А., Арнт А.А. Возможность использования искусственных нейронных сетей во внутрисосудистых методах визуализации. 9-12 ноября 2022, г. Москва, XXIV Московский международный конгресс по рентгенэндоваскулярной хирургии.

2. Кочергин Н.А. Развитие феномена «no-reflow» у пациентов с острым инфарктом миокарда: патогенез, предикторы и влияние на прогноз лечения. 9-12 ноября 2022, г. Москва, XXIV Московский международный конгресс по рентгенэндоваскулярной хирургии.