

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТЕЗОВ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

СЕВОСТЬЯНОВА В.В.¹, ЕЛГУДИН Я.А.², ГЛУШКОВА Т.В.¹,
ВНЕК Г.³, ЛЮБЫШЕВА Т.³, ЭМАНСИПАТОР С.², КУДРЯВЦЕВА Ю.А.¹,
БОРИСОВ В.В.¹, ГОЛОВКИН А.С.¹, БАРБАРАШ Л.С.¹

¹ Отдел экспериментальной и клинической кардиологии, НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, Кемерово, Россия

² Отделение хирургии, Кливлендский медицинский центр реабилитации ветеранов,

³ Факультет макромолекулярных наук и инженерии, Западный резервный университет Кейза, Кливленд, шт. Огайо, США

В настоящее время активно развиваются подходы тканевой инженерии, направленные на создание сосудистых графтов малого диаметра. Это связано с существующей в сердечно-сосудистой хирургии потребностью в протезах для проведения аорто-коронарного шунтирования. В данной работе была проведена оценка возможности использования сосудистого графта малого диаметра, изготовленного из биodeградируемого полимера поликапролактона методом электроспиннинга. Были изучены физико-механические свойства и структура графтов из поликапролактона, а также их тромборезистентность и проходимость после имплантации в кровеносное русло крыс. Результаты показали наличие оптимальных физико-механических свойств сосудистых графтов, их биосовместимость, эндотелиализацию внутренней поверхности и инфильтрацию стенки протеза клетками с формированием новой ткани. Было обнаружено образование обширного слоя неоинтимы в зонах анастомозов.

Таким образом, исследование продемонстрировало возможность использования графтов из поликапролактона в качестве сосудистых протезов, но при этом необходима их дальнейшая модификация, которая будет способствовать уменьшению гиперплазии соединительной ткани в просвет графта.

Ключевые слова: тканевая инженерия, сосудистый графт, поликапролактон, электроспиннинг.

ВСТУПЛЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с облитерацией кровеносных сосудов, являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в развитых странах мира [1]. В основе лечения таких заболеваний лежит проведение шунтирующих операций. Для осуществления процедур по восстановлению кровотока в зонах ишемии в качестве шунтов используют аутологичные вены или артерии. Однако отсутствие необходимых вен или артерий в результате их поражения или проведения повторных операций у 30% пациентов приводит к необходимости использования альтернативных сосудистых графтов [2, 3]. К последним относят гомографты, применение которых крайне ограничено малой доступностью донорского материала, синтетические графты, такие как Dacron из полиэтилентетрафолата и Gore-Tex из политетрафлуорэтилена, а также биологические протезы из ксеноматериала [4]. Несмотря на удобство в применении и коммерческую доступность, синтетические и биологические протезы диаметром менее 6 мм не могут быть использованы в качестве шунтов, так как

существует высокий риск их быстрой облитерации в результате обширной гиперплазии неоинтимы или тромбообразования [5].

На сегодняшний день существует несколько стратегий, направленных на избежание данных проблем. Одна из них заключается в создании кровеносных сосудов методом тканевой инженерии *in vitro* с использованием полимерной биodeградируемой матрицы, клеток пациента и биологически активных молекул [6, 7]. К сожалению, создание персонального графта для пациента из его собственного клеточного материала является сложным и трудоемким методом, что ограничивает его клиническое применение. Большой интерес представляет создание полимерных графтов, которые будут заселяться клетками *in vivo* и одновременно подвергаться биodeградации, что должно обеспечить регенерацию кровеносного сосуда. Одним из перспективных материалов для создания таких графтов является синтетический полимер поликапролактон (poly(-caprolactone) – PCL), который известен хорошими механическими свойствами. Механизм его деградации *in vivo* обусловлен медленным гидролитическим процессом

с образованием нетоксичных продуктов [8].

Целью данной работы явилась оценка возможности применения графтов из поликапролактона в качестве протезов сосудов малого диаметра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление PCL-графтов. Сосудистые графты (внутренний диаметр 2 мм, толщина стенки 100 мкм) изготавливали методом электроспиннинга из биodeградируемого полимера PCL ($M=80\ 000$) (Sigma-Aldrich, США). Электроспиннинг проводили при следующих условиях: 10% раствор PCL в хлороформе, напряжение на игле +15 кВ, скорость потока раствора 1 мл/ч, расстояние между иглой и коллектором 15 см. В качестве коллектора использовали вращающийся штифт диаметром 2 мм.

Физико-механические свойства PCL-графтов. Физико-механические испытания проводили на универсальной испытательной машине (Zwick/goell, Германия) в условиях одноосного растяжения образцов ($n=15$). При оценке физико-механических свойств биоматериала учитывали показатели прочности и упругой деформации. Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении, упругодеформированные свойства – по модулю упругости ($E_{\text{мод}}$) и относительному удлинению до нарушения целостности образца. Для большей точности измерения относительного удлинения к образцу применяли предварительную нагрузку в 0,01Н. В качестве контроля использовали сосудистые биопротезы «КемАнгиопротез» (ЗАО «НеоКор», Россия), изготовленные из грудной артерии крупного рогатого скота и обработанные диглицидоловым эфиром этиленгликоля. Данные протезы используют для замещения пораженных артерий среднего и малого диаметра [9].

Оценка адгезии тромбоцитов на PCL-графтах. Адгезию тромбоцитов на PCL-графтах и биопротезах «КемАнгиопротез» оценивали в эксперименте *in vitro* с помощью многоканального перистальтического насоса 2054U/CA24 (Watson–Marlow, Великобритания). Магистраль с фиксированными образцами длиной 3 см заполняли свежей цитратной донорской кровью, в соотношении кровь: цитрат – 9:1. Скорость циркуляции крови составила 0,04 л/мин, $t=37^{\circ}\text{C}$. После 40 мин. контакта с кровью сегменты графтов ($n=10$) фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4$), после чего помещали в термостат при $t=37^{\circ}\text{C}$ до полного высыхания. Адгезию и морфологические изменения тромбоцитов на поверхности материала оценивали при помощи сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия. При оценке структуры поверхности графта и адгезии

тромбоцитов на полимерных графтах и биопротезах «КемАнгиопротез», образцы покрывали золотым токопроводящим напылением толщиной в 30 нм и далее изучали на сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония).

Имплантация PCL-графтов в брюшную часть аорты крыс. Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм и толщиной стенки 100 мкм имплантировали в брюшную часть аорты крыс. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания. Эксперимент выполнялся в лаборатории Cleveland VA Medical Center в соответствии с протоколом, одобренным IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, Cleveland VA Medical Center). Самцов крыс линии Wistar массой 400–450 г ($n=5$) вводили в наркоз внутривенной инъекцией 40 мг/кг тиопентала натрия. Перед операцией животным вводили 10 мг/кг цефазолина. Во время хирургического вмешательства проводили ЭКГ и измерение температуры тела. Все животные были оперированы под ингаляционным наркозом 1% изофлурана. После проведения срединной лапаротомии открывали брюшное пространство и выделяли аорту. Далее аорту пережимали ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Проксимальный анастомоз выполняли с использованием шовного материала 9–0. Графт промывали и аорту повторно пережимали. Дистальный анастомоз выполняли подобным образом. После снятия зажимов наличие тока крови через графт подтверждали интраоперационно с использованием сосудистого доплера. Через 6 недель животных выводили из эксперимента. Зону анастомоза и сам PCL-графт оценивали на наличие кровотечений, тромбообразования. Гиперплазию неоинтимы, а также степень заселения графта клетками изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилином-эозином, а

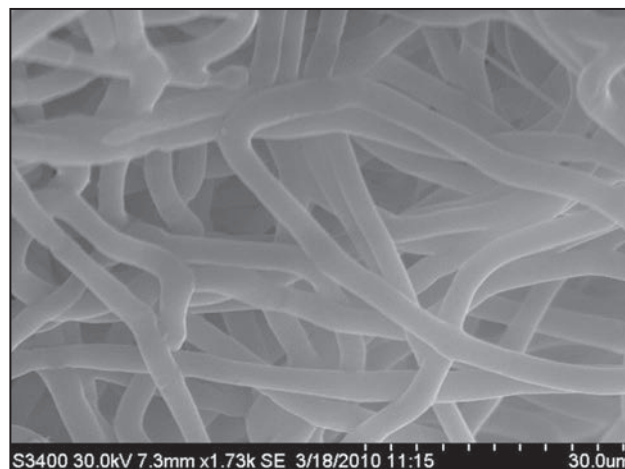


Рис. 1. Стенка PCL-графта, изображение сканирующей электронной микроскопии.

| Физико-механические свойства графтов из поликапролактона и биопротезов «КемАнгиопротез» | | | |
|---|--|--|--|
| Протезы сосудов | Прочность, МПа (25% _о <M<75% _о) | Упругая деформация | |
| | | относительное удлинение, % (25% _о <M<75% _о) | E _{мод} (25% _о <M<75% _о) |
| Биопротез «КемАнгиопротез» | 0,85<1,26<1,42 | 79,8<95,4<100,6 | 0,24<0,28<0,34 |
| PCL-графт | 1,51<1,88* <1,98 | 202,2<232,1* <441,4 | 3,27<3,89* <5,57 |

* p<0,01 относительно биопротезов «КемАнгиопротез».

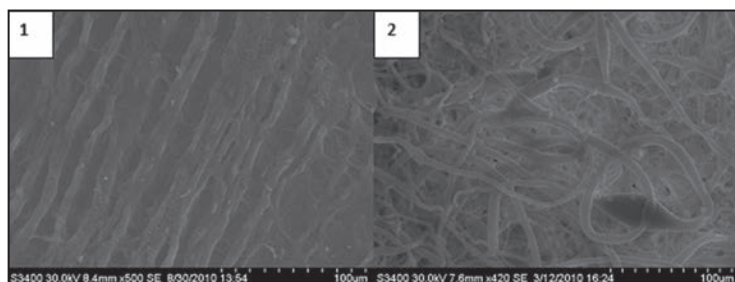


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия поверхности биопротеза «КемАнгиопротез» (1) и PCL-графта (2) после 40 минут контакта с кровью.

также по Маллори и Ван-Гизону.

Статистические методы. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего или как медиана и 25-й и 75-й перцентили (25%_о<M<75%_о).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование графтов из поликапролактона методом сканирующей электронной микроскопии показало, что поверхность имеет высокопористую структуру, образованную полимерными волокнами толщиной $3,340 \pm 0,510$ мкм. Волокна были равномерные по толщине без видимых дефектов (рис. 1).

При оценке механической прочности и эластичности сосудистых графтов в качестве контроля использовали биологические протезы кровеносных сосудов «КемАнгиопротез», так как физико-механические свойства данных протезов не отличаются от нативных артерий. Результаты физико-механического испытания сосудистых графтов продемонстрировали, что показатели прочности PCL-графтов выше данных показателей биопротезов

«КемАнгиопротез» (табл.). Показатели упругой деформации PCL-графтов также превышают данные показатели биопротезов «КемАнгиопротез»: относительное удлинение – в 2,4 раза ($p=0,00001$), модуль упругости (E_{мод}) – в 14 раз ($p=0,00001$), что указывает на их большую эластичность относительно контрольных образцов. В целом, результаты физико-механических испытаний свидетельствуют о достаточной прочности и удовлетворительных свойствах упругой деформации PCL-графтов.

Гемосовместимость – важное качество протезов, взаимодействующих с кровью. Для оценки медицинских изделий, контактирующих с кровью, одним из основных тестов, рекомендованных ISO 10993-4:2009, является исследование активации тромбоцитов. При изучении внутренней поверхности графтов после контакта с кровью методом сканирующей электронной микроскопии было выявлено значительное количество адгезированных тромбоцитов,

в то время как на образцах биопротезов «КемАнгиопротез» тромбоциты отсутствовали (рис. 2). Несмотря на то, что на поверхности графтов наблюдали значительное количество адгезированных тромбоцитов, не было обнаружено измененных и расплывчатых форм клеток, что может свидетельствовать о гемосовместимости испытываемых образцов.

Согласно результатам подобных исследований по имплантации синтетических графтов в кровеносное русло мелких лабораторных животных полная эндотелиализация протеза происходит к концу 6 недели [10]. В связи с этим срок 6 недель был выбран в качестве критического для завершения эксперимента

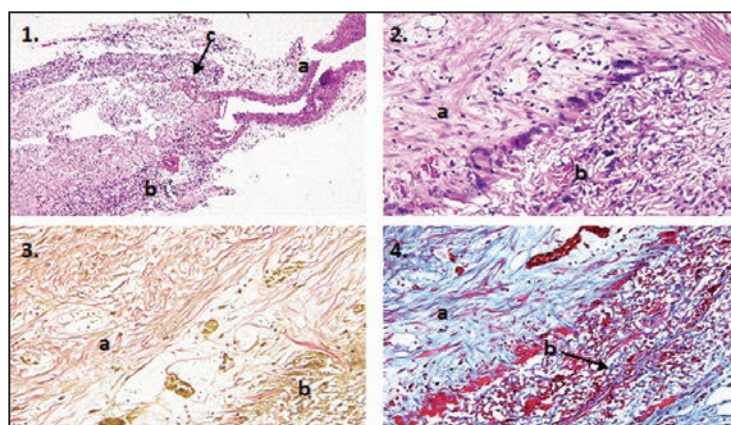


Рис. 3. Сосудистый PCL-графт через 6 недель после имплантации в брюшную часть аорты крысы: 1. Окр. гематоксилином и эозином, ув. 40: а – интактная аорта, б – PCL-графт, с – зона анастомоза; 2. Окр. гематоксилином и эозином, ув. 400: а – неоинтима, б – стенка графта, инфильтрированная клетками; 3. Окр. по Ван-Гизону, ув. 400: а – неоинтима, б – стенка графта; 4. Окр. по Маллори, ув. 400: а – неоинтима, б – участки коллагена в стенке графта.

и выведения животных. Имплантированный графт выделяли с прилежащими участками нативной аорты. При гистологическом исследовании в просвете графта и зонах анастомозов был выявлен сплошной слой неоинтимы (рис. 3). Внутренняя поверхность графта была покрыта эндотелиальными клетками, большинство из которых имело увеличенные гиперхромные ядра и уменьшенный ядерно-цитоплазматический индекс по сравнению с эндотелиальными клетками нативной аорты. Графт был инфильтрирован клетками с морфологическими признаками миофибробластов и макрофагов. Участки накопления коллагена богатые гликозаминогликанами, ламинином и фибронектином были выявлены по всей толщине и длине графта. Кроме того, не были зафиксированы гистологические признаки деградации протеза, что указывает на медленную скорость разрушения полимера.

ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие в настоящее время сосудистых кондуитов малого диаметра, обладающих хорошей проходимостью и долговечностью, обуславливает попытки создания новых сосудистых графтов для заселения клетками *in vivo* на основе биодеградируемых полимерных матриц.

С одной стороны, идеальный искусственный графт должен обладать механическими свойствами, соответствующими нативным артериям. С другой стороны, он также должен имитировать морфологию внеклеточного матрикса, что может быть обеспечено высокопористой поверхностью, состоящей из нановолокон диаметром 5–500 нм и пор размером 5–500 мкм [11]. В свою очередь механические свойства, а также микро- и наноструктура конечного продукта будут зависеть не только от используемого полимера, но также и от метода его изготовления. Одним из способов создания полимерных графтов, который привлекает все больше внимания в последние годы, является электроспиннинг растворов полимеров. Данный метод позволяет создавать тканеинженерные пористые матрицы, состоящие из тончайших волокон.

Результаты сканирующей электронной микроскопии графта, изготовленного методом электроспиннинга, показали, что его стенка состоит из переплетенных между собой тонких волокон, образующих поры. Такая структура поверхности способна имитировать внеклеточный матрикс, подходящий для формирования на его основе новой ткани. Благодаря высокому коэффициенту отношения поверхности матрицы к ее объему увеличивается адгезия клеток на тканеинженерном графте, миграция клеток, а также их пролиферация и дифференцировка. Кроме того, пористость мате-

риала способствует транспорту питательных веществ к новообразующейся ткани.

Поскольку сосудистый графт имплантируют непосредственно в кровоток, он аналогично артериям должен выдерживать давление крови. Результаты физико-механических испытаний показали, что PCL-графты превосходят биопротезы «КемАнгиопротез» по показателям прочности и эластичности. Пористая структура PCL-графтов способствует увеличению их относительного удлинения без снижения модуля упругости. В свою очередь по ранее проведенным исследованиям известно, что биопротезы «КемАнгиопротез» обладают удовлетворительными физико-механическими свойствами, что позволяет их использовать в хирургической практике для имплантации в операциях по замещению пораженных артерий среднего и малого диаметров [9]. Можно предполагать, что PCL-графты не будут уступать по прочности протезам из биологического материала, а также нативным сосудам, при этом большая эластичность должна положительно отразиться на их гемодинамических характеристиках. В свою очередь значительное количество участков полимера, обнаруженное при гистологическом исследовании графтов через 6 недель после имплантации в брюшную часть аорты крыс, свидетельствует о медленной скорости деградации протеза. Благодаря этому возможно поддержание оптимальной прочности графта до момента формирования нового кровеносного сосуда.

Адгезия и морфологические изменения тромбоцитов на поверхности материала при контакте с кровью являются одними из показателей гемосовместимости. Результаты сканирующей электронной микроскопии внутренней поверхности PCL-графтов и биопротезов после контакта с кровью продемонстрировали высокий уровень адгезии тромбоцитов к полимерным кондуитам по сравнению с биологическими протезами. Хотя на PCL-графтах адгезировалось большое количество тромбоцитов, но их активированных форм не было обнаружено. Следует отметить, что в других работах, посвященных исследованию тканеинженерных матриц из поликапролактона, было показано, что данный материал не является цитотоксичным [12]. В свою очередь на основе результатов, полученных в данной работе, также может быть сделан предварительный вывод о том, что сосудистые графты на основе поликапролактона достаточно гемосовместимы *in vitro*. Однако для более полной оценки необходимо изучение их свойств *in vivo* в эксперименте на животных.

Для оценки возможности хирургического применения, функциональности и биосовместимости сосудистые PCL-графты с внутренним диаметром 2 мм имплантировали в брюшную часть аорты крыс.

Через 6 недель после имплантации графта в зонах анастомозов был обнаружен обширный слой неоинтимы, который распространялся по всей внутренней поверхности графта. Наличие гиперплазии неоинтимы в просвете графта характерно для большинства синтетических сосудистых протезов и возникает как процесс ремоделирования кровеносного сосуда после его повреждения в течение 2–24 месяцев [5]. При нормальном течении процесса ремоделирования кровеносного протеза образование неоинтимы не приводит к значительному стенозу [13], но существует ряд причин, которые могут приводить к активному синтезу и накоплению большого количества экстрацеллюлярного матрикса и, следовательно, к гиперплазии неоинтимы. К таким факторам относят различие в диаметрах сосуда и протеза, отсутствие эндотелиальных клеток, а также миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток. Повреждение стенки сосуда стимулирует изменение фенотипа гладкомышечных клеток. В свою очередь активированные гладкомышечные клетки мигрируют из меди и интимы сосуда, где активно секретируют экстрацеллюлярный матрикс, а также ряд цитокинов и ростовых факторов, в том числе IL-1, bFGF, TGF- β 1, TNF- α , стимулирующих метаплазию соединительной ткани [14]. Кроме того, одной из причин может быть низкое напряжение сдвига на стенке сосуда, образующееся в местах анастомозов. При низком напряжении сдвига на внутренней поверхности графта клетки и секретируемый внеклеточный матрикс не ориентируются в одном на-

правлении, а располагаются случайным образом, что также провоцирует рост неоинтимы. Современные подходы, направленные на подавление гиперплазии неоинтимы, достаточно разнообразны и включают в себя доставку в периваскулярную зону лекарственных препаратов, генов, ростовых факторов, а также адсорбирование на сосудистых протезах эндотелиальных клеток. Несмотря на то, что данные способы влияния на рост неоинтимы демонстрируют положительные результаты на экспериментальных моделях, проблема гиперплазии неоинтимы в сосудистых протезах малого диаметра до сих пор остается нерешенной [15, 16].

В то же время образование эндотелиального слоя на внутренней поверхности графта, инфильтрация его стенки клетками, а также образование внеклеточного матрикса, замещающего полимерный материал графта, обнаруженные через 6 месяцев после имплантации, являются главными характеристиками процесса заживления кондуита.

Таким образом, при изучении свойств PCL-графтов, изготовленных методом электроспиннинга, было выявлено, что данные протезы обладают необходимыми физико-механическими свойствами, достаточно гемосовместимы и могут служить каркасом для образования собственного сосуда после имплантации в кровеносное русло млекопитающих. Несмотря на это, необходима дальнейшая модификация полимерных графтов, которая будет способствовать подавлению гиперплазии неоинтимы и сохранению проходимости кровеносного сосуда.

USE OF POLYCAPROLACTONE GRAFTS FOR SMALL-DIAMETER BLOOD VESSELS

SEVOSTYANOVA V.V.¹, ELGUDIN Y.A.², GLUSHKOVA T.V.¹,
WNEK G.³, LUBYSHEVA T.³, EMANCIPATOR S.², KUDRYAVTSEVA YU.A.¹,
BORISOV V.V.¹, GOLOVKIN A.S.¹, BARBARASH L.S.¹

¹ Federal State Budgetary Facility "Scientific Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases" under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Kemerovo, Russia

² Cleveland VA Medical Center, Department of Surgery,

³ Case Western Reserve University, Department of Macromolecules Science and Engineering, Cleveland, OH, USA

Current trends are toward actively developing approaches of tissue engineering, aimed at creating vascular grafts of small diameter. This is due to the existing in cardiovascular surgery demand for prostheses to be used in coronary artery bypass grafting. The present work was undertaken in order to assess possibilities of using small-diameter vascular grafts made of biodegradable polymer polycaprolactone by means of electrospinning. The authors studied physico-mechanical properties and structure of polycaprolactone grafts, as well as their thromboresistance and patency after implantation into the vascular bed of rats. The obtained results demonstrated optimal physico-mechanical properties of the vascular grafts, their biocompatibility, endothelialisation of the internal surface, and infiltration of the graft's wall by cells with the formation of new tissue, accompanied and followed by the development of an extensive intimal layer in the zones of the anastomoses.

Hence, the study showed possibilities of using polycaprolactone grafts as vascular prostheses, however requiring their further modification which would promote and contribute to a decrease in hyperplasia of connective tissue in the graft's lumen.

Key words: tissue engineering, vascular graft, polycaprolactone, electrospinning.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases associated with obliteration of blood vessels are the leading cause of mortality and invalidization of the population in the developed countries of the world [1]. Treatment of such diseases is based on bypass operations. Surgical procedures aimed at restoring blood flow in ischemic zones are performed using autologous veins or arteries as bypass grafts. However, lack of the required veins or arteries resulting from their damage or carrying out re-operations in 30% of patients leads to the necessity of using alternative vascular grafts [2, 3]. To the latter belong homografts whose use is extremely limited due to small availability of the donor material, also synthetic grafts such as Dacron from polyethylenetetrafolate and Gore-Tex made of polytetrafluoroethylene, as well as biological prostheses made of xenomaterials [4]. Despite their usability and commercial availability synthetic and biological prostheses measuring less than 6 mm in diameter cannot be used as bypass grafts since there is high risk of their rapid obliteration resulting from extensive hyperplasia of the neointima or thrombus formation [5].

By now, there are several strategies aimed at avoiding such problems. One of them consists in creation of blood vessels by means of in vitro tissue engineering

using a polymeric biodegradable matrix, patient's cells and biologically active molecules [6, 7]. Unfortunately, creation of an individual graft for a patient from his/her own cellular material is a complicated and laborious method which limits its clinical application. Of great interest is creation of polymeric grafts which would be inhabited by cells in vivo and simultaneously undergo biodegradation which should provide regeneration of the blood vessel. One of the promising materials for creating such grafts is a synthetic polymer polycaprolactone (poly- ϵ -caprolactone – PCL) known by its good mechanical properties. The mechanism of its in vivo degradation is conditioned by a slow hydrolytic process with the formation of non-toxic products [8].

The present work was aimed at evaluating possibilities of using grafts made of polycaprolactone as prostheses for small-diameter vessels.

MATERIALS AND METHODS

Manufacture of PCL grafts. Vascular grafts (an internal diameter of 2 mm and wall thickness measuring 100 μ m) were manufactured by means of electrospinning from a biodegradable polymer PCL (M=80 000) (Sigma-Aldrich, USA). Electrospinning was carried out under the following conditions: a 10 % solution of PCL in

chloroform, voltage at the needle + 15 kV, solution flow rate 1 ml/h, distance between the needle and the collector 15 cm. A rotating pin measuring 2 mm in diameter was used as the collector.

Physico-mechanical properties of PCL grafts. Physico-mechanical tests were performed on versatile testing machine (Zwick/roell, Germany) under the conditions of uniaxial tension of the samples (n=15). Assessing the physico-mechanical properties of the biomaterial, we took into consideration the parameters of strength and elastic deformity. Strength was evaluated by the maximal tension stress, elastic-deformity properties were assessed by the modulus of elasticity (E_{mod}) and percent elongation until the integrity of the sample is broken. For better accuracy of measuring the relative elongation the sample was preliminarily loaded with 0.01 N. As the control, we used vascular bioprotheses "KemAngioprotez" («NeoCor» Closed Corporation, Russia) made of the bovine thoracic artery and treated with ethylene glycol diglycidyl ether. These prostheses are used for restoration of damaged small-to-medium-diameter arteries [9].

Assessment of blood platelet adhesion on PCL grafts. Blood platelet adhesion on the PCL grafts and "KemAngioprotez" biografts was assessed in vitro experiments by means of the multichannel peristaltic pump 2054U/CA24 (Watson-Marlow, Great Britain). The lines containing fixed samples 3 cm long were filled with fresh citrated donor blood, with a blood: citrate ratio of 9:1. The velocity of blood circulation amounted to 0.04 l/min, at $t=37$ degrees Centigrade. Forty minutes after contact with blood the grafts' segments (n=10) were fixed in 2% solution of glutaric aldehyde in phosphate buffer (pH=7.4), then were placed into a thermostat at $t=37^{\circ}\text{C}$ until dried completely. Adhesion and morphological alterations of blood platelets on the surface of the material were assessed by means of scanning electron microscopy.

Scanning electron microscopy. While assessing the structure of the graft's surface and platelet adhesion on the polymeric grafts and bioprotheses "KemAngioprotez", the samples were covered with gold current-conducting sputtered 30-nm coating to be further examined using the scanning electron microscope S3400N (Hitachi, Japan).

Implantation of PCL grafts into the abdominal portion of the aorta of rats. The vascular grafts with an internal diameter of 2 mm and wall thickness of 100 μm were implanted into the abdominal portion of the aorta of rats. The animals were kept in the conditions of a vivarium with ad libitum access to food and water on the nutrition ration. The experiment was carried out at the Laboratory of the Cleveland VA Medical Center according to the protocol approved by the IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, Cleveland VA Medical Center). The Wistar male rats weighing 400–450 g (n=5) were narcotized by an intra-abdominal injection of 400

mg/ml of sodium thiopental. Prior to operation 10 mg/kg cefazolin was injected to the rats. During surgical intervention ECG was performed and body temperature measured. All animals were operated on under inhalation anaesthesia with 1% isoflurane. Median laparotomy was followed by opening of the retroperitoneal space and exposing of the aorta which was then clamped below the renal artery and above the level of bifurcation. The proximal anastomosis was performed using the suture material 9–0. The graft was washed out and the aorta re-clamped. The distal anastomosis was established in a similar manner. Once the clamps removed, the presence of blood flow through the graft was confirmed intraoperatively by means of vascular Doppler. After six weeks the animals were withdrawn from the experiment. The anastomosis zone and the PCL graft itself were assessed for the presence of haemorrhage and thrombus formation. Neointimal hyperplasia and the degree of colonization of the graft with cells were studied by means of light microscopy, staining the preparations with haematoxylin-eosin, as well as according to the Mallory and van Gieson techniques.

Statistical methods. The obtained findings were processed using the Applied Programs Package Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Normalcy of distribution was evaluated by means of the Kolmogorov–Smirnov criterion. Statistical significance was determined by means of the Mann–Witney non-parametric criterion. The differences were regarded statistically significant if $p < 0.01$. The data were represented as the mean \pm standard error or as a median and the 25th and 75th percentiles ($25\% < M < 75\%$).

RESULTS

Studying the polycaprolactone grafts by means of scanning electron microscopy demonstrated that the surface had a high-porous structure, formed by polymeric fibres $3.340 \pm 0.510 \mu\text{m}$ thick. The fibres were uniform in thickness with no visible defects (Fig. 1).

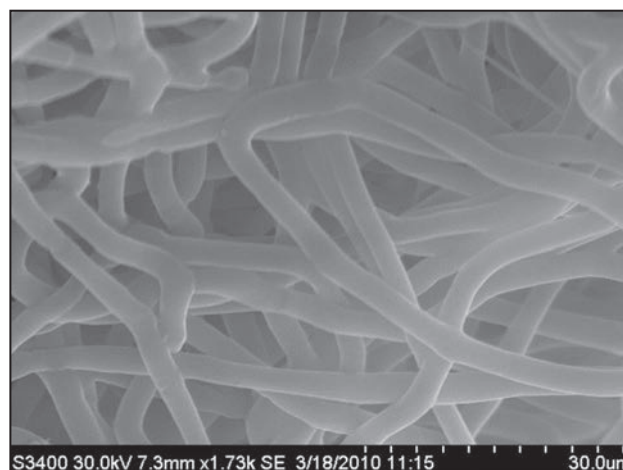


Fig. 1. PCL graft's wall, view of scanning electron microscopy.

| Physico-mechanical properties of polycaprolactone grafts and bioprosthesis "KemAngioprotez" Table | | | |
|--|--|--|--|
| Vascular prostheses | Strength, MPa (25% ₀ <M<75% ₀) | Elastic deformation | |
| | | Percent elongation, % (25% ₀ <M<75% ₀) | E_{mod} (25% ₀ <M<75% ₀) |
| Bioprosthesis "KemAngioprotez" | 0.85<1.26<1.42 | 79.8<95.4<100.6 | 0.24<0.28<0.34 |
| PCL graft | 1.51<1.88* <1.98 | 202.2<232.1* <441.4 | 3.27<3.89* <5.57 |

**p*<0.01 as compared to bioprosthesis "KemAngioprotez".

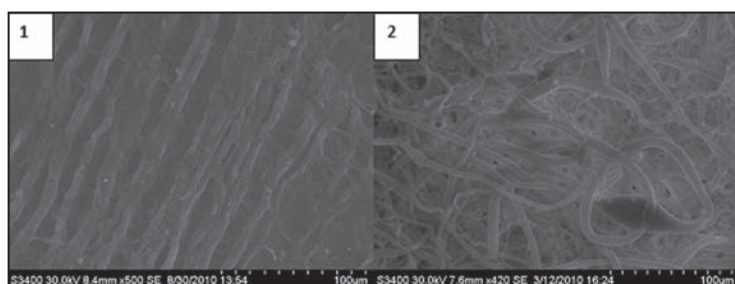


Fig. 2. Scanning electron microscopy of the surface of the bioprosthesis "KemAngioprotez" (1) and PCL graft (2) 40 minutes after contact with blood.

Assessing the mechanical strength and elasticity of vascular grafts we used biological prostheses of blood vessels "KemAngioprotez" as control, since the physico-mechanical properties of these prostheses do not differ from those of the native arteries. The results of physico-mechanical tests of vascular grafts showed that the indices of strength of the PCL grafts are higher than those of bioprosthesis "KemAngioprotez" (Table). The indices of elastic deformation of the PCL grafts also exceed those of bioprosthesis "KemAngioprotez": relative elongation – by a factor of 2.4 (*p*=0.00001), elasticity modulus (E_{mod}) by a factor of 14 (*p*=0.00001), thus strongly suggesting their greater elasticity as compared to the control samples. As a whole, the results of physico-mechanical tests are indicative of sufficient strength and satisfactory properties of elastic deformation of PCL grafts.

Haemocompatibility is known to be an important property of bioprosthesis interacting with blood. For assessment of medical-purpose items contacting with blood, one of the main tests recommended by ISO 10993:2009 is the study of activation of blood platelets. Examining the internal surface of the grafts after contact with blood by means of scanning electron microscopy revealed a considerable number of adhered thrombocytes, while the samples of bioprosthesis "KemAngioprotez" contained no blood platelets (Fig. 2). Despite the fact that the grafts' surface showed a considerable number of adhered thrombocytes there were neither changed nor spread out forms of cells, which may be indicative of haemocompatibility of the tested samples.

According to the results of similar studies on implantation of synthetic grafts into the blood channel of small laboratory animals complete endothelialisation of the prosthesis occurs by the end of week 6 [10]. In this connection, the term of 6 weeks was chosen as critical for termination of the experiment and withdrawal of animals. The implanted graft was exposed with the adjacent portions of the native aorta. Histological studies showed that in the lumen of the graft there was a continuous layer of the neointima (Fig. 3). The inner surface of the graft was covered with endothelial cells the majority of which had increased hyperchromatic nuclei and decreased nuclear-cytoplasmic index as compared to the endothelial cells of the native aorta. The graft was infiltrated by cells with morphological properties of myofibroblasts and macrophages. Portions of accumulation of collagen rich with glycosaminoglycans, laminin and fibronectin were revealed in the whole thickness and all long the length of the graft. Besides, there were no histological signs of the graft's degradation, thus suggesting a slow rate of the polymer destruction.

DISCUSSION

The fact of currently lacking small-diameter vascular conduits possessing good patency and durability calls for attempts aimed at creating new vascular grafts to be infiltrated with cells *in vivo* on the basis of biodegradable polymeric matrices.

On the one hand, an ideal graft should possess mechanical properties corresponding to native arteries. On the other hand, it should also imitate morphology of the extracellular matrix which may be provided by

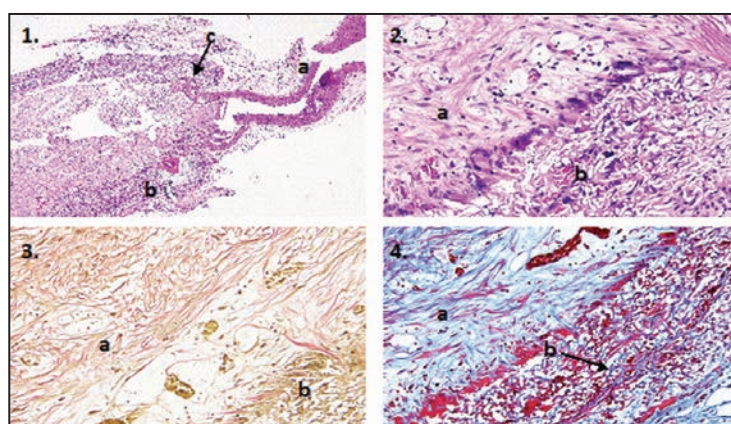


Fig. 3. Vascular PCL graft 6 weeks after implantation into the abdominal portion of the aorta of the rat: 1. Haematoxylin and eosin stain, magnification $\times 40$: a – intact aorta, b – PCL graft, c – anastomosis zone; 2. Haematoxylin and eosin stain, magnification $\times 400$: a – neointima, b – graft's wall infiltrated with cells; 3. Haematoxylin and eosin stain, magnification $\times 400$: a – neointima, b – graft's wall; 4. Mallory's stain, magnification $\times 400$: a – neointima, b – portions of collagen in the graft's wall.

highly porous surface consisting of nanofibers measuring 5–500 nm in diameter and 5–500- μ m pores [11]. In its term, mechanical properties, as well as micro and nano-structure of the final product would depend not only on the polymer used but also on the method of its manufacturing. One of the methods of creating polymeric grafts, attracting ever increasing attention during recent years, is electrospinning of polymeric solutions. This method makes it possible to create tissue-engineering matrices consisting of the thinnest fibres.

The findings of scanning electron microscopy of the graft made by the method of electrospinning demonstrated that its wall consisted of intertwined between each other fine fibres forming pores. Such structure of the surface is capable of imitating the cellular matrix suitable for formation of new tissue on its base. Thanks to a high coefficient of the ratio of the matrix's surface to its volume there occurs an increase in cell adhesion of cells on the tissue-engineering graft, cell migration, as well as cellular proliferation and differentiation. Besides, porosity of the material promotes transport of nutrient substances to the newly forming tissue.

Since a vascular graft is implanted directly into the blood flow, it analogously to arteries should withstand pressure of blood. The results of physico-mechanical tests demonstrated that PCL grafts are superior to bioprostheses "KemAngioprotez" by the indices of strength and elasticity. The porous structure of PCL grafts contributes to an increase in their relative elongation without decreasing the modulus of elasticity. In its turn, according to earlier studies it is known that bioprostheses "KemAngioprotez" possess satisfactory physico-mechanical properties, which makes it possible to use them in surgical practice for implantation during operations on replacement of affected medium-to-small diameter arteries [9]. It may be supposed that PCL grafts would not be inferior by strength to prostheses from biological material, as well as native vessels, with the greater elasticity should positively tell on their haemodynamic characteristics. In its turn, a considerable number of polymeric portions revealed on histological examination of the grafts six months after implantation into the abdominal portion of the aorta of rats strongly suggest a slow rate of prosthesis's degradation. This makes it is possible to maintain optimal strength of the graft till the moment of formation of a new blood vessel.

Adhesion and morphological changes of blood platelets on the surface of the material on contact with blood are amongst indices of haemocompatibility. The results of scanning electron microscopy of the inner surface of the PCL grafts and bioprostheses after contact with blood demonstrated a higher level of adhesion of blood platelets to the polymeric conduits as compared to biological prostheses. Although a large number of thrombocytes were adhered on the PCL grafts, no

activated forms thereof were revealed. Mention should be made that in other works dedicated to studying tissue-engineering matrices from polycaprolactone showed that this material is not cytotoxic [12]. In its turn based on the results obtained in the present work one could also draw a preliminary conclusion that polycaprolactone-based vascular grafts are sufficiently biocompatible in vitro. However for more complete assessment it is necessary to study their properties in vivo in experiments on animals.

In order to assess possibilities of surgical application, functionality and biocompatibility, vascular PCL grafts with an internal diameter of 2 mm were implanted into the abdominal portion of the aorta of rats. Six week after graft's implantation the zones of anastomosis showed an extensive neointimal layer extending along the whole internal inner surface of the graft. The presence of neointimal hyperplasia in the graft's lumen is characteristic of the majority of synthetic vascular prostheses and appears as a process of remodelling of the blood vessel after its damage during 2–24 months [5]. In the normal course of the process of the blood vessel remodelling the formation of the neointima does not lead to considerable stenosis [13] but there is a series of causes which may result in active synthesis and accumulation of a great number of the extracellular matrix and hence to neointimal hyperplasia. To such factors belong difference in the diameters of the vessel and prosthesis, lack of endothelial cells, as well as migration and proliferation of smooth muscle cells. Damage of the vascular wall stimulates a change of the phenotype of smooth muscle cells. In its turn activated smooth muscle cells migrate from the media to the intima of the vessel where they actively secrete the extracellular matrix as well as a series of cytokines and growth factors, including IL-1, bFGF, FGF- β 1, TNF- α , stimulating metaplasia of connective tissue [14]. Besides, one of the causes may be low shearing stress on the walls of the vessel in the places of anastomoses. At low shearing stress on the inner surface of the graft, the cells and secreted extracellular matrix are not oriented in one direction but are situated haphazardly, which also provokes neointimal growth. Present-day approaches aimed at suppression of neointimal hyperplasia are sufficiently diversified and include delivery into the perivascular zones of medicinal agents, genes, growth factors, as well as adsorption of endothelial cells on vascular prostheses. Despite the fact that these methods of influencing neointimal growth demonstrate positive results on experimental models the problem concerning neointimal hyperplasia in small-diameter vascular prostheses remains unsolved as yet [15, 16].

At the same time, formation of the endothelial level on the inner surface of the graft, infiltration of its wall with cells, as well as formation of the extracellular matrix replacing the polymeric material of the graft, discovered

6 months after implantation are the main characteristics of the conduit's healing process.

Hence, while studying properties of PCL grafts manufactured by electrospinning revealed that these prostheses possess the necessary physico-mechanical properties, are sufficiently hemocompatible, and may serve as a carcass for formation of the own vessel after implantation into the blood channel of the mammals. Despite this, polymeric grafts require further modification which would promote inhibition of neointimal hyperplasia and preservation of patency of the blood vessel.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. **Ounpuu S., Anand S., Yusuf S.** The impending global epidemic of cardiovascular diseases. *Eur. Heart. J.* 2000; 21: 880–883.
2. **Bokeria L.A., Brishvili I.I., Solnyshkov L.E., et al.** Reoperations in patients with coronary artery disease – state of the art. *Bulletin of the Research Centre of Cardiovascular Surgery named after Bakulev under the RAMS.* 2009; 10(3): 5–27 (in Russian).
3. **Taylor L.M., Edwards J.M., Porter J.M.** Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of modern series. *J. Vasc. Surg.* 1990; 11: 193–205.
4. **Brockbank K.G., McNally R.T., Walsh K.A.** Cryopreserved vein transplantation. *J. Cardiac. Surg.* 1992; 7: 170–176.
5. **Chlupac J., Filova E., Bacakova L.** Blood vessels replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol. Res.* 2009; 58 (Suppl. 2): 119–139.
6. **Cooper K., Chun I., Colter D., inventors; Ethicon Inc., assignee.** Tissue engineered blood vessels. US patent 0,275, 129. 2009 Nov 5.
7. **Tillman B., Yazdani S., Lee S., et al.** The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials.* 2009; 30: 583–588.
8. **Bolgen N., Menciloglu Y.Z., Acatay K., et al.** In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2005; 16: 1537–1555.
9. **Barbarash L.S., Krivtsov A.S., Zhuravleva I. Yu.** Biological prostheses of arteries. Kemerovo. 1996 (in Russian).
10. **Nottelet B., Pektok E., Mandracchia D.** Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ϵ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 89(4): 865–875.
11. **Teo W-E., Inai R., Ramakrishna S.** Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2011; 12: 1–19.
12. **Neuss S., Apel C., Buttler P., et al.** Assessment of stem cell/biomaterial combination for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials.* 2008; 29: 302–312.
13. **Wu J., Zhang C.** Neointimal hyperplasia, vein graft remodeling, and long-term patency. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009; 297: 1194–1195.
14. **Davis C., Fischer J., Ley K., et al.** The role of inflammation in vascular injury and repair. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1699–1709.
15. **Lin P.H., Chen C., Bush R.L., et al.** Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *J. Vasc. Surg.* 2004; 39(6): 1322–1328.
16. **Petrofski J.A., Hata J.A., Gehrig T.R., et al.** Gene delivery to aortocoronary saphenous vein grafts in a large animal model of intimal hyperplasia. *J. Thoracic. and Cardiovasc. Surg.* 2004; 127(1): 27–33.