

УДК 616-089.819.843-77:615.461

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СОСУДИСТОГО ГРАФТА МАЛОГО ДИАМЕТРА ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Севостьянова В.В., Головкин А.С., Филиппев Д.Е., Глушкова Т.В., Борисов В.В.,
Бураго А.Ю., Барбараш Л.С.

ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН,
Кемерово, e-mail: sevastyanova.victoria@gmail.com

На сегодняшний день тканеинженерные сосудистые графты малого диаметра являются перспективной альтернативой аутооттрансплантатам для проведения шунтирующих операций. В данной работе представлены результаты исследования по определению параметров электроспиннинга для изготовления биodeградируемого сосудистого графта из поликапролактона. Проведена оценка физико-механических свойств, морфологии и диаметра волокон PCL-графтов, изготовленных при различных параметрах электроспиннинга. Кроме того, изучено влияние напряжения и концентрации полимера в растворе на структуру, прочность и эластичность полимерных матриц. PCL-графт с внутренним диаметром 2 мм с оптимальными свойствами имплантировали в брюшную аорту крысы сроком на 10 месяцев. Мониторинг проходимости графтов осуществляли с помощью ультразвукового исследования с доплерометрией каждые 2 месяца. Исследование эксплантированных кондуитов свидетельствовало о сохранении проходимости и клеточной инфильтрации стенок с образованием внеклеточного матрикса. Однако было отмечено образование анастомотического тромба в просвете исследуемого графта, что приводит к необходимости его дальнейшей антитромботической модификации.

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

OPTIMAL PARAMETERS OF ELECTROSPINNING FOR SMALL-DIAMETER POLYCAPROLACTONE VASCULAR GRAFT FABRICATION

Sevastyanova V.V., Golovkin A.S., Philipev D.E., Glushkova T.V., Borisov V.V.,
Burago A.YU., Barbarash L.S.

FSBI «Research institute for complex issues of cardiovascular diseases» SB RAMS,
Kemerovo, e-mail: sevastyanova.victoria@gmail.com

Currently tissue engineered small-diameter vascular grafts represent a promising alternative of autografts for bypass surgery. In this study, we investigate mechanical properties, morphology and fiber diameter of polycaprolactone vascular grafts obtained by electrospinning in various parameters. Additionally the influence of applied voltage and polymer concentration in solution on the structure, strength and elasticity of PCL scaffolds have been studied. Optimized PCL graft with inner diameter 2 mm was implanted in the rat abdominal aorta for 10 months. Graft patency was monitored by duplex Doppler ultrasound studies every 2 months. Results of explanted grafts evaluation showed patency, cell ingrowth and deposition of extracellular matrix. However, anastomotic thrombus in investigated graft was observed. Therefore, further antithrombotic modification of grafts is needed.

Keywords: tissue engineering, vascular graft, electrospinning, polycaprolactone

В настоящее время для хирургического лечения заболеваний, связанных с окклюзией кровеносных сосудов, большой интерес представляют тканеинженерные сосудистые графты [6]. Одним из перспективных подходов тканевой инженерии к созданию кровеносного сосуда является его выращивание на биodeградируемом полимерном графте *in vivo* [9]. Существуют различные методы изготовления полимерных сосудистых графтов. Однако выбор того или иного метода в значительной степени оказывает влияние на прочность и структуру конечного продукта. 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 вы-

сокопористой поверхностью из микро- и нановолокон [11].

Одним из методов, привлекающих внимание в решении данной проблемы, является электроспиннинг растворов и расплавов полимеров. Метод электроспиннинга позволяет изготавливать трехмерные высокопористые полимерные матриксы, состоящие из микро- и нановолокон [12]. Для электроспиннинга могут быть использованы природные деградируемые материалы, такие как коллаген, гиалуроновая кислота или фибриноген [2, 1, 7]. К сожалению, эти полимеры обладают низкой прочностью и чаще используются в качестве покрытий для синтетических сосудистых протезов. Синтетические же деградируемые полимеры, такие как большинство алифатических полиэстеров, сополимер молочной и гликолиевой кислот, а также производные карбонатов,

хотя и используются в качестве биоматериалов и систем доставки лекарственных препаратов, но достаточно быстро теряют механическую прочность в результате ускоренной биodeградации *in vivo* [13]. В отличие от упомянутых синтетических полимеров, поликапролактон (poly(ϵ -caprolactone) (PCL)) известен хорошими механическими свойствами, и механизм его деградации *in vivo* обусловлен медленным гидролитическим процессом, что делает этот материал наиболее приемлемым для изготовления сосудистых графтов [3].

Известно, что физико-механические свойства и поверхность материала, изготовленного методом электроспиннинга, напрямую зависят от множества параметров, связанных со свойствами полимера, растворителя, условий среды и самого процесса. Но особое влияние на морфологию и прочность оказывает изменение таких параметров как напряжение и концентрация полимера в растворе [8].

В связи с чем целью данной работы стало определение оптимальных параметров электроспиннинга для изготовления сосудистого графта, а также его испытания *in vivo* с помощью имплантации в брюшную аорту крыс.

Материалы и методы исследования

Для изготовления сосудистых графтов использовали синтетический биodeградируемый полимер поликапролактон с молекулярной массой 80 000 (Sigma-Aldrich Co. LLC, США).

Изготовление сосудистых PCL-графтов. Сосудистые PCL графты диаметрами 2 мм и толщиной 100–120 мкм изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония). В работе изучали несколько режимов работы электроспиннинга: концентрации растворов полимера в хлороформе – 10%, 12%, 14% и 16%, напряжение на конце иглы 15 кВ и 25 кВ. Скорость подачи полимерного раствора составляла 1 мл/ч, расстояние до коллектора – 15 см, в качестве коллектора использовали вращающийся штифт диаметром 2 мм. Далее проводили сравнение изготовленных сосудистых графтов по показателям физико-механических свойств и морфологии.

Физико-механические свойства сосудистых графтов. Физико-механические испытания PCL-графтов проводили с использованием универсальной испытательной машины «Zwick/roell» – 2.5N (Германия) в соответствии с ГОСТ 270-75. Для точности измерений к образцам применяли предварительную нагрузку – 0,01 Н. Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении, упруго-деформативные свойства – по относительному удлинению до нарушения целостности образца и модулю упругости (Емод). Для оценки физико-механических свойств сосудистых графтов было исследовано в группе протезов из чистого PCL 80 образцов, по 10 в каждой серии.

Морфология сосудистых графтов. Для изучения диаметра волокон и поверхности на образцы PCL-

графтов наносили золотое токопроводящее покрытие толщиной в 30 нм и далее изучали на сканирующем электронном микроскопе S3400N (Hitachi, Япония).

Имплантация сосудистых графтов из PCL в аорту крыс. Графты диаметром 2 мм имплантировали в брюшную часть аорты крыс. Самцов крыс линии Wistar массой 400–450 г ($n = 5$) вводили в наркоз 3% изофлураном, далее операцию проводили при ингаляционном наркозе 1,5% изофлурана. Аорту выделяли и пережимали ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Проксимальный и дистальный анастомозы выполняли по типу «конец в конец» с использованием шовного материала 9-0. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания. Проксимальности графтов оценивали с помощью ультразвукового исследования с доплерометрией через 1, 3, 5, 7 и 10 месяцев после имплантации. Через 10 месяцев животных выводили из эксперимента, графт выделяли вместе с прилежащими участками аорты. PCL-графт и зоны анастомозов оценивали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилином-эозином и по Ван-Гизон.

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, а также непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и 25-ый и 75-ый процентилей ($25\% < M < 75\%$).

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку сосудистые графты устанавливаются в кровеносное русло, то важное значение имеют их физико-механические свойства. Проведенные испытания показали, что наибольшую прочность ($p < 0,05$) имели PCL графты из 14% раствора – 2,64 Н/мм² при 15 кВ и 3,09 Н/мм² при 25 кВ, а также образцы из 16% раствора полимера – 2,34 н/мм² при напряжении 15 кВ и 3,41 Н/мм² при 25 кВ (таблица). Наименьшую прочность продемонстрировали образцы из 10% PCL при 15 кВ – 0,34 Н/мм². При этом не наблюдалось достоверных отличий между графтами, изготовленными при 15 кВ и 25 кВ ($p > 0,05$).

Оценка упруго-деформативных свойств PCL графтов показала изменение эластичности материала с возрастанием концентрации полимера. Относительное удлинение при максимальном напряжении для графтов, изготовленных в режиме 15 кВ, возрастало от 108,97% для концентрации 10% до 669,17% и 564,72% для 14% и 16% растворов соответственно. Похожие различия наблюдались также между графтами, изготовленными при подаваемом напряжении

в 25 кВ. При этом не отмечали достоверных различий ($p > 0,05$) в относительном удлинении между графтами одной концентрации PCL, но изготовленными при разных значениях напряжения.

Также важной характеристикой для материала, имплантируемого в организм, является его упругость, то есть способность возвращать прежнюю форму после деформации. Упругость материала характеризует-

ся модулем Юнга. Результаты проведенного исследования не показали отличий по упругости материала между всеми группами сосудистых графтов из PCL ($p > 0,05$). Для образцов из высоких концентраций PCL 14 и 16% (15 кВ) среднее значение модуля Юнга в пределах физиологического давления составило 1,92 и 2,0 Н/мм² соответственно, а для образцов, изготовленных при 25 кВ, – 1,65 и 2,01 Н/мм².

Физико-механические свойства сосудистых графтов из PCL

Концентрация полимера	Напряжение, кВ	Прочность, МПа (25% < M < 75%)	Относительное удлинение, % (25% < M < 75%)	Емод, Н/мм ² (25% < M < 75%)
PCL 10%	15	0,30 < 0,34 < 0,40	108,97 < 108,97 < 120,35	0,74 < 0,74 < 1,05
	25	1,49 < 1,57 < 1,75	168,84 < 249,89 < 262,86	1,74 < 2,07 < 2,42
PCL 12%	15	2,15 < 2,35 < 2,44	315,42 < 478,48 < 739,36	1,42 < 1,81 < 2,33
	25	1,81 < 1,96 < 2,48	261,64 < 304,96 < 345,28	0,94 < 1,13 < 1,92
PCL 14%	15	2,40 < 2,64* < 2,81	589,16 < 669,17* < 849,14	1,41 < 1,92 < 2,13
	25	2,75 < 3,09** < 3,49	588,27 < 609,2** < 632,19	1,56 < 1,65 < 1,95
PCL 16%	15	2,27 < 2,34* < 2,88	488,63 < 564,72* < 632,65	1,90 < 2,00 < 2,84
	25	3,23 < 3,41** < 3,42	604,59 < 617,12** < 638,14	1,93 < 2,01 < 2,51

Примечания:

* – $p < 0,05$ по сравнению с PCL 10% при 15 кВ

** – $p < 0,05$ по сравнению с PCL 10% и 12% при 25 кВ.

Следует отметить, что средние показатели физико-механических свойств для биологических сосудистых протезов, изготовленных из грудной артерии крупного рогатого скота, составляют: прочность – 1,26 МПа, относительное удлинение – 95,9%, модуль Юнга – 0,28 Н/мм². Следовательно, сосудистые графты из PCL превосходят по прочности и эластичности сосудистым протезам, используемым для замещения пораженных артерий.

Полученные данные демонстрировали значительное влияние концентрации полимера в растворе на физико-механические свойства графтов. В то же время, напряжение, подаваемое на полимер при проведении электроспиннинга, не ока-

зывало существенного влияния на прочность и эластичность протезов. Хорошие прочностные и упруго-деформативные свойства имели сосудистые графты из 14 и 16% PCL.

Изучение PCL-графтов с помощью сканирующей электронной микроскопии показало изменение поверхности материала с увеличением концентрации полимера. Средний диаметр волокон при напряжении 15 кВ составил 446 нм, 1,78 мкм, 2,01 мкм, 2,74 мкм и при 25 кВ – 84 нм, 1,12 мкм, 2,62 мкм, 2,68 мкм для концентраций 10, 12, 14 и 16% соответственно (Рис 1). Полученные результаты свидетельствовали об увеличении диаметра волокна с возрастанием концентрации раствора PCL.

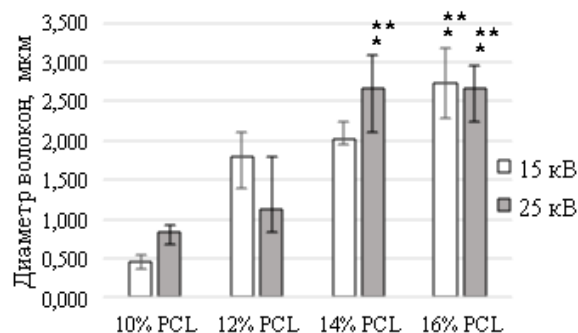


Рис. 1. Зависимость диаметра волокна от концентрации PCL при напряжении электроспиннинга 15 и 25 кВ

* – $p < 0,05$ относительно 10 и 12% PCL при 15 и 25 кВ

** – $p < 0,05$ относительно 14% PCL при 15 кВ

Кроме того, волокна из 10% раствора PCL имели большое количество утолщений, так называемых «бусин» как на образцах, изготовленных при напряжении 15 кВ, так и 25 кВ. В свою очередь в графтах из 12% полимера дефекты были менее выражены. А на образцах из 14% и 16% PCL утолщений и других ярко выраженных нарушений структуры волокон не наблюдалось. Полученные результаты согласуются с данными исследований процесса электроспиннинга, представленных в ряде работ. Концентрация оказывает влияние на вязкость и поверхностное натяжение раствора, поэтому при недостаточной концентрации полимера во время электроспиннинга формируются капли, которые при высыхании полимерной нити образуют утолщения на волокне [10]. Следовательно в данном исследовании оптимальную морфологию имели сосудистые графты из 14 и 16% PCL. При этом волокна с меньшим диаметром имели образцы, изготовленные при 15 кВ.

Размер волокна от десятков нанометров до нескольких микрометров имеет важное значение в создании тканеинженерных конструкций, так как волокна графта должны имитировать фибриллярные белки, входящие в состав внеклеточного матрикса, например коллаген. Волокна с меньшим диаметром образуют большую поверхность взаимодействия, что способствует лучшему прикреплению клеток, а также обеспечивает транспорт питательных веществ и удаление продуктов метаболизма. В то же время, волокна, имеющие наноразмеры, образуют очень мелкие поры и тем самым могут препятствовать инфильтрации материала клетками [10]. Вероятно, наиболее пред-

почтительными для клеток будут графты, состоящие из микроволокон. Но при этом их диаметр не должен превышать 2 мкм, так как клеткам необходимо иметь возможность ориентироваться вокруг волокон и прикрепляться к ним, а размер большинства клеток лежит в диапазоне 2–120 мкм [8, 4].

На основании результатов физико-механических испытаний и сканирующей электронной микроскопии можно заключить, что сосудистый PCL графт, изготовленный из 14% раствора полимера при 15 кВ, обладает высокой прочностью и эластичностью, и оптимальным диаметром волокна по сравнению с графтами, имеющими подобные физико-механические свойства, но сделанными в других режимах электроспиннинга. Данный сосудистый графт был выбран для проведения дальнейших исследований.

Сосудистые графты с внутренним диаметром 2 мм имплантировали в брюшную часть аорты крыс для оценки возможности их практического использования, функциональности, а также биосовместимости. Оптимизированные PCL графты продемонстрировали удобство в имплантации и прочное удерживание шовного материала. Результаты ультразвукового мониторинга через 1, 3, 5, 7 и 10 месяцев после имплантации демонстрировали проходимость всех протезов. При этом зоны проксимального и дистального анастомозов визуализировались лишь в срок до 2 месяцев после операции. В дальнейшем перепад диаметров протеза и нативной аорты нивелировался. За период наблюдения не было выявлено стенотических и аневризматических изменений, как самого графта, так и зон анастомозов.

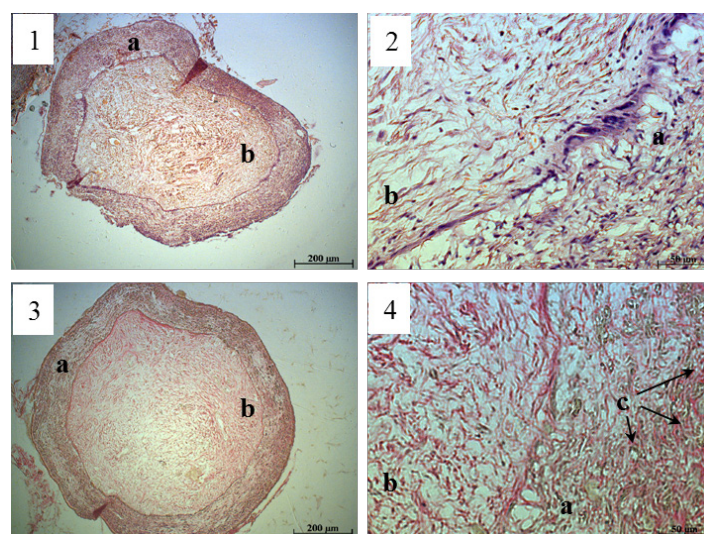


Рис. 2. PCL-графт, 10 месяцев после имплантации в брюшную аорту крысы. 1, 2 – окраска гематоксилин и эозин. 3, 4 – окраска по Ван-Гизон. а – стенка графта, б – тромб в зоне анастомоза, с – волокна коллагена

При макроскопическом исследовании эксплантированных графтов не было обнаружено кровотечений и видимых повреждений стенки. Это позволяет предположить, что графт из PCL не подвергается деформациям, обусловленным деградацией полимера, и способен функционировать в гемодинамических условиях *in vivo* достаточно длительное время. Гистологический анализ образцов показал наличие тромба в зоне анастомоза с его последующей организацией во всех случаях (рис. 2). Вероятной причиной тромбообразования может быть несоответствие диаметров графта и аорты, так как диаметр аорты крысы не достигает 2 мм, что приводит к нарушению гемодинамики в зоне анастомоза и образованию турбулентных потоков крови [5].

Стенка графта во всех случаях была полностью инфильтрирована макрофагами и миофибробластами. При этом участков острого воспаления не наблюдалось. Клеточная инфильтрация сопровождалась деградацией полимера и накоплением межклеточного вещества, о чем свидетельствуют волокна коллагена и эластина, расположенные по всей толщине и длине графта. Наличие структурных компонентов на PCL-графте, характерных для кровеносного сосуда, свидетельствует о формировании новой сосудистой стенки.

Заключение

Проведенные в данной работе исследования по оптимизации параметров электроspinning для создания сосудистого графта из PCL показали, что лучшими свойствами обладает протез, изготовленный из 14% полимера при 15 кВ.

Результаты эксперимента *in vivo* демонстрировали заселение стенок PCL-графта, изготовленного методом электроspinning, клетками с образованием новой ткани. Способность графта функционировать достаточно длительный период – до 10 месяцев, делает его перспективной основой для выращивания кровеносных сосудов. Тем не менее, учитывая возможное образование тромбов в зонах анастомоза, необходима антитромботическая модификация протеза, а также подбор оптимальной экспериментальной модели с использованием животных с более крупными кровеносными сосудами, чтобы исключить перепад диаметра в зоне анастомоза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00050) в ФГБУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН.

Список литературы/References

1. Arrigoni C. The effect of sodium ascorbate on the mechanical properties of hyaluronan-based vascular constructs // *Biomaterials*. – 2006. № 27. – P. 623–630.
2. Boland E.D. Electrospinning collagen and elastin: Preliminary vascular tissue engineering // *Frontiers in bioscience*. – 2004. № 9. – P. 1422–1432.
3. Bolgen N. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions // *Journal of biomaterials science. Polymer edition*. – 2005. № 16. – P. 1537–1555.
4. Freitas Jr. R. Nanomedicine, volume I: basic capabilities. – Georgetown: Landes Bioscience, 1999 – 509 p.
5. Kapadia M.R., Popowich D.A., Kibbe M.R. Modified prosthetic vascular conduits // *Circulation*. – 2008. – № 117. – P. 1873–1882.
6. Kurobe H. Concise review: tissue-engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present, and future // *Stem cells translational medicine*. – 2012. Vol. 1, № 7. – P. 566–571.
7. Miller D.C. Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features // *Biomaterials*. – 2004. № 25. – P. 53–61.
8. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review // *Tissue engineering*. – 2006. Vol. 12, № 5. – P. 1197–1211.
9. Schantz J.T., Chim H., Whiteman M. Cell guidance in tissue engineering: SDF-1 mediates site-directed homing of mesenchymal stem cells within three-dimensional polycaprolactone scaffolds // *Tissue engineering*. – 2007. Vol. 13, № 11. – P. 2615–2624.
10. Sill T.J., von Recum H.A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials*. – 2008. № 29. – P. 1989–2006.
11. Stevens M.M., George J.H. Exploring and engineering the cell surface interface // *Science*. – 2005. № 310. – P. 1135–1138.
12. Teo W., Inai R., Ramakrishna S. Technological advances in electrospinning of nanofibers // *Science and technology of advanced materials*. – 2011. № 12. – P. 1–19.
13. Zhang J. Engineering of vascular grafts with genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells on poly (propylene carbonate) graft // *Artificial organs*. – 2006. № 30. – P. 898–905.

Рецензенты:

Григорьев Е.В., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово;

Иванов С.В., д.м.н., заведующий лабораторией реконструктивной хирургии мультифокального атеросклероза ФГБУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН, г. Кемерово.

Работа поступила в редакцию 25.08.2014.