

УДК 57.089:616.1:677.494

НЕТКАНЫЕ СОСУДИСТЫЕ ПРОТЕЗЫ МАЛОГО ДИАМЕТРА НА ОСНОВЕ НАНОВОЛОКОН ИЗ АРОМАТИЧЕСКОГО ПОЛИИМИДА

© 2022 г. А.Е. Чирятева^{*,#}, Н.А. Завражных^{*}, П.В. Попрядухин^{*,**}, Г.Ю. Юкина^{*,***},
А.В. Кривенцов^{****}, Е.М. Иванькова^{**}, В.Е. Юдин^{*,**}

^{*}Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
ул. Политехническая, 29, Санкт-Петербург, 195251, Россия

[#]E-mail: chirateva.ae@gmail.com

^{**}Институт высокомолекулярных соединений РАН, Большой просп., 31, Санкт-Петербург, 199004, Россия

^{***}Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова,
ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, 197022, Россия

^{****}Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
ул. Академика Лебедева, 6Ж, Санкт-Петербург, 194044, Россия

Поступила в редакцию 02.12.2021 г.

После доработки 02.12.2021 г.

Принята к публикации 26.05.2022 г.

Одним из основных методов лечения сердечно-сосудистой патологии является хирургическая реконструкция сосудов, в том числе с использованием протезов на основе полимерных материалов; ведется разработка клинически приемлемого протеза малого диаметра. В данной работе протезы кровеносных сосудов диаметром 1.2 мм были получены методом электроформования из ароматического полиимида. Механические характеристики полученных протезов сравнимы с параметрами нативных сосудов крыс и человека. Протезы были имплантированы в брюшную часть аорты крыс на 1, 3 и 6 месяцев. В ходе эксперимента протезы проходимы, признаков образования аневризм и гиперплазии интимы не наблюдается, случаи тромбоза не зафиксированы. Морфологическое исследование показало образование на внутренней поверхности протеза неоинтимы, представленной эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем, и заключение протеза в соединительно-тканную капсулу. Протезы на основе нановолокон полиимида продемонстрировали высокую биосовместимость и тромборезистентность, что позволяет рекомендовать дальнейшее их исследование в качестве тканеинженерных сосудистых имплантатов.

Ключевые слова: тканевая инженерия, тканеинженерный сосудистый имплантат, полиимид, ПМ-ДАДФЭ, электроформование.

DOI: 10.31857/S0006302922040226, EDN: IVWSHU

По данным Всемирной организации здравоохранения заболевания сердечно-сосудистой системы занимают ведущую позицию среди причин смерти в мире [1]. Одним из основных методов лечения данной патологии, после медикаментозной терапии, является хирургическая реконструкция сосудов – протезирование или шунтирование.

В качестве материала, замещающего нативный сосуд, используют аутооттрансплантаты или синтетические протезы. Забор аутоматериала сосуда приводит к нарушениям кровоснабжения в ткане-доноре и дополнительной травматизации пациента; также на отдаленных сроках наблюдается дегенерация стенок аутооттрансплантата. К тому же в случае проведения повторных или множественных операций и наличия сопутствующих заболеваний количество аутологичного оперативного

материала естественным образом ограничивается [2].

Одной из главных проблем при пластике сосудов с использованием синтетических протезов остается протезирование артерий малого диаметра: 6 мм и менее. Ввиду раннего тромбообразования, гиперплазии неоинтимы в районе анастомозов и других факторов до настоящего времени не разработан клинически приемлемый протез малого диаметра, ведется активный поиск новых полимерных материалов и разработка методов получения протезов [3, 4].

Протезы кровеносных сосудов из полимерных материалов имеют ряд существенных преимуществ перед аутологичными: позволяют использовать все разнообразие искусственных и природных материалов биомедицинского назначе-

ния, варьировать механические характеристики и функционализировать поверхность. В частности, для задач тканевой инженерии сосудов применяют протезы на основе биорезорбируемых и нерезорбируемых трубчатых нетканых полимерных матриц.

При использовании протезов из биорезорбируемых полимеров необходима сопряженность во времени процессов биорезорбции и ремоделирования вновь формируемого сосуда, так как ухудшение механических свойств протеза в процессе резорбции приводит к гиперплазии неоинтимы, возникновению аневризм, а также иммунному ответу организма при высокой концентрации продуктов резорбции. Протезы из нерезорбируемых полимеров лишены части этих недостатков, что в перспективе способствует быстрому и эффективному восстановлению кровеносного русла.

Одним из перспективных полимеров для получения матриц для протезирования кровеносных сосудов является полиимид. Благодаря своим механическим свойствам и биосовместимости полиимидные материалы получили широкое распространение в биомедицине в качестве компонентов имплантируемых микроэлектронных устройств, легочных мембран-оксигенаторов, систем хранения клеток, пакетов для низкотемпературного хранения крови [5, 6]. В эксперименте *in vitro* было показано отсутствие цитотоксичности ароматических полиимидов, что подтверждает перспективность использования этих материалов в сосудистой хирургии [7].

Одним из перспективных методов получения полимерных матриц, в том числе для сосудистых протезов, является метод электроформования (электроспиннинга), при котором из раствора или расплава полимера в электрическом поле высокого напряжения получают нетканый материал, состоящий из микро- и нановолокон. В процессе электроформования струя полимера с помощью инжекторного насоса подается через электрод-фильтру (иглу) в поле высокого напряжения, где в результате поляризации происходит деление на микроструи, отвердевающие в процессе дрейфа до принимающего электрода (коллектора). Волокна, осаждающиеся на коллектор, образуют волокнистый нетканый материал. Матрицы, полученные этим методом из биосовместимых полимеров, обладают пористой структурой, способствующей интеграции полученных на их основе протезов в организм реципиента, и стабильными деформационно-механическими свойствами в течение длительного времени [8].

Целью данной работы является исследование биосовместимости *in vivo* нетканой матрицы, полученной методом электроформования из ароматического полиимиды, для оценки возможности

ее использования в качестве тканеинженерного сосудистого протеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Традиционный способ получения пленочных и волокнистых полиимидных материалов из растворов полиамидокислоты обладает рядом недостатков, среди которых необходимость использования токсичных растворителей, нестабильность растворов во времени и высокая температура имидизации – реакции циклизации полиамидокислоты до химически инертного полиимиды [7]. В данной работе использованы более стабильные водорастворимые соли полиамидокислоты с пониженной температурой имидизации [9].

Получение материала. Для получения трубчатых пористых матриц использовали триэтиламонийную соль полиамидокислоты на основе пиромеллитового диангидриды и 4,4'-диаминодифенилового эфира (Sigma-Aldrich, Германия), растворенную в смеси этилового спирта и воды в соотношении 70/30 масс. %. Растворы соли полиамидокислоты с весовой концентрацией 10% перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре.

Матрицы получали методом электроформования на установке Nanon-01A (Mesc Co., Япония). Раствор полимера подавали через электрод-фильтру в электрическое поле высокого напряжения (25–30 кВ) с объемным расходом 0.5–1.0 мл/ч. Осаждение волокон происходило на цилиндрическом металлическом электроде диаметром 1.2 мм, вращающемся со скоростью 2500 об/мин на расстоянии 150 мм от фильтры. Матрицы далее подвергали термической имидизации в фиксированном на электроде состоянии в воздушной среде (нагрев до 250°C в течение 3 ч, выдерживание при 250°C в течение 30 мин). Полноту прохождения реакции циклизации полиамидокислоты и удаления триэтиламина (рис. 1) контролировали методом инфракрасной спектроскопии.

Микроструктуру полученных протезов изучали методом сканирующей электронной микроскопии в режиме регистрации вторичных электронов (Supra 55VP, Carl Zeiss, Германия) с предварительным нанесением платинового проводящего слоя. По микрофотографиям оценивали средний диаметр полученных волокон и поверхностную пористость материала.

Механические характеристики трубчатых протезов длиной 20 мм исследовали с помощью универсальной испытательной машины Instron 5943 (Instron, Великобритания). Регистрировали зависимость механического напряжения от деформации при растяжении матриц со скоростью

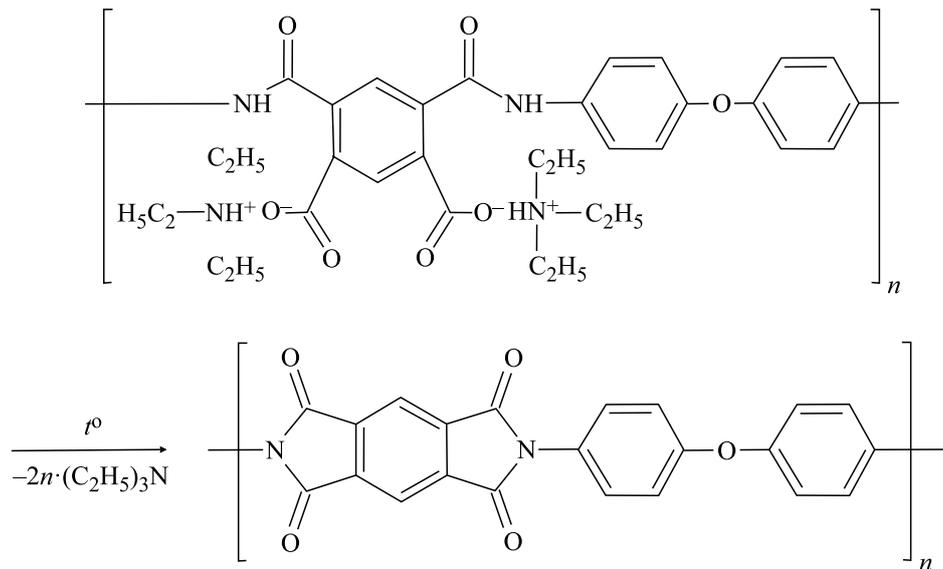


Рис. 1. Схема термической имидизации триэтиламмонийной соли полиаминокислоты с образованием полиимида.

10 мм/мин, вычисляли модуль упругости, прочность на разрыв и удлинение до разрыва.

Эксперименты на животных. В эксперименте *in vivo* использовали девять трехмесячных самцов крыс Wistar массой 200–250 г (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.). Животных оперировали под общей анестезией: 0.1 мл Zoletil 100 (растворенного в 20 мл физиологического раствора) и 0.0125 мл Rometar (20 мг/мл) на 0.1 кг массы тела интраперитонеально, однократно. Выполняли Y-образную лапаротомию, проводили мобилизацию инфраренального отдела аорты и ее протезирование матрицей с наложением восьми швов на каждый анастомоз. Использовали атравматические иглы с нитью Prolen 9-0. Антикоагулянты и дезагреганты не использовали. Проподимость сосудов оценивали классической методикой [10]. Операционную рану брюшной стенки послойно ушивали атравматическими иглами с нитью Prolen 4-0. В динамике оценивали общее состояние животных, цвет и температуру кожных покровов задних конечностей, двигательную активность.

Морфологическое исследование. Животных выводили из опыта через один, три и шесть месяцев. Оценивали проходимость аорты, состояние протеза и его морфологию. Для этого протезы с фрагментами нативной аорты иссекали и фиксировали в 10%-м нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7.4) не менее 24 ч, далее образцы обезжовивали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксили-

ном Майера и эозином («Биовитрум», Россия). Для визуализации коллагена соединительной ткани использовали окраску по методу Маллори (реактивы от «Биовитрум», Россия). Микроскопический анализ препаратов с поперечным сечением протеза проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Leica, Германия), используя окуляр с увеличением 10× и объективы с увеличением 4, 10 и 40×. Запись цифровых изображений выполняли с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-механические параметры трубчатых протезов зависят от условий процесса электроформования (продолжительности, рабочего напряжения, расстояния между электродами и др.). В данной работе использовали матрицы с толщиной стенки от 250 до 350 мкм. По данным, полученным с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 2), средний диаметр волокон и средний размер пор в поверхностном слое материала составляют соответственно 0.6 ± 0.2 мкм и 5.5 ± 1.5 мкм, что сравнимо с линейными размерами клеток, следовательно, возможна миграция клеток вглубь материала матрицы.

Прочность и модуль упругости полученных трубчатых протезов сравнимы с параметрами нативных сосудов крыс [11] и превосходят их для человека [12]. Модуль упругости составляет 14–19 МПа (против 17 МПа для крыс и 1.0 МПа для человека), а прочность на разрыв — 1.8–2.2 МПа (против 2.3 МПа для крыс и 0.7 МПа для человека). Удлинение до разрыва для полиимидных протезов также сравнимо с удлинением нативных

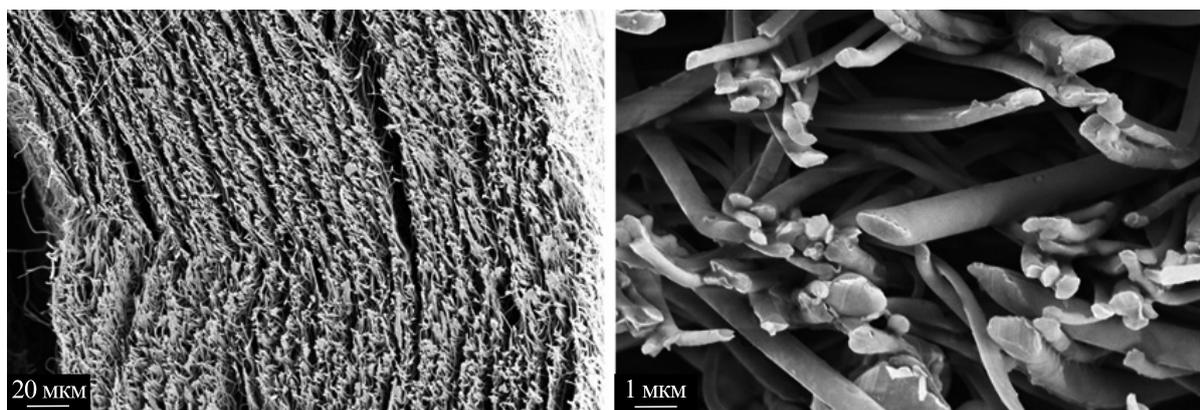


Рис. 2. Микрофотографии поперечного среза полиимидного протеза.

человеческих сосудов — 34% против 42% соответственно. Следует отметить, что протезы на основе полиимидов демонстрируют меньшую прочность, чем биорезорбируемые протезы сосудов аналогичного строения [11, 13]. Это можно объяснить необходимостью для биорезорбируемых протезов иметь значительный запас прочности, чтобы не допустить преждевременного разрушения, так как в процессе резорбции механические характеристики матрицы неизбежно ухудшаются.

Общее состояние и двигательная активность крыс-реципиентов описанных протезов вплоть до выведения из опыта не отличались от таковых интактных животных.

Через месяц после имплантации все протезы проходимы, аневризм не выявлено. Микроскопически в местах анастомозов наблюдается плавный переход интимы нативного сосуда на протез (рис. 3а–г). Большая часть неоинтимы представлена эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем. Однако в одном из трех случаев определяется участок с выраженным субэндотелиальным слоем, представленным сформированными коллагеновыми волокнами. На данном участке между протезом и неоинтимой наблюдаются обширные кальцинаты. Между волокнами протеза выявляется незначительное число клеток, в основном макрофаги и фибробласты. Снаружи протез покрыт соединительнотканной капсулой, в которой расположены полнокровные сосуды.

Через три месяца после имплантации два из трех протезов проходимы, аневризмы не выявлены. На данном сроке эксперимента вся внутренняя поверхность протеза выстлана неоинтимой, представленной эндотелием и тонким субэндотелиальным слоем. Весь объем стенки протеза заселен умеренным числом фибробластов и макрофагов. Между волокнами протеза определяются тонкие коллагеновые волокна. Снаружи протезы покрыты соединительнотканной капсулой с сосудами. Среди клеток соединительнотканной

капсулы, помимо фибробластов, выявляются гигантские многоядерные клетки инородных тел.

Через шесть месяцев после имплантации все протезы проходимы, аневризмы не выявлены. Микроскопически выраженная неоинтима представлена в основном коллагеновыми волокнами (рис. 3д,и). На границе между неоинтимой и матрицей в двух из трех случаев располагаются выраженные кальцинаты. Весь объем стенки протеза умеренно заселен фибробластами и макрофагами. Соединительнотканная капсула, окружающая протезы, представлена зрелыми коллагеновыми волокнами, в ней определяются полнокровные сосуды. На границе с внешней поверхностью наблюдаются гигантские многоядерные клетки инородных тел.

ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех экспериментах имплантация не сопровождалась значимым кровотечением сквозь стенку протеза или по линии анастомозов. На внутренней поверхности протезов в короткие сроки образуется сплошной монослой эндотелиальных клеток, уменьшающий риск тромбообразования. Гиперплазии интимы, сопутствующей развитию ишемии, не наблюдается даже в районе анастомозов, что является позитивным прогностическим признаком. Присутствие макрофагов и гигантских многоядерных клеток инородных тел в умеренном количестве говорит о средневыраженной реакции макроорганизма на инородное тело, что является проявлением типичной иммунной реакции. Однако обращает на себя внимание появление в ряде случаев кальцинатов на границе между формирующейся неоинтимой и протезом в районе анастомозов, возможной причиной которых может являться низкая скорость интеграции (врастания) тканей нативного сосуда в стенку протеза. Во всех экспериментах стенка сохраняла целостность, признаки появления аневризм не

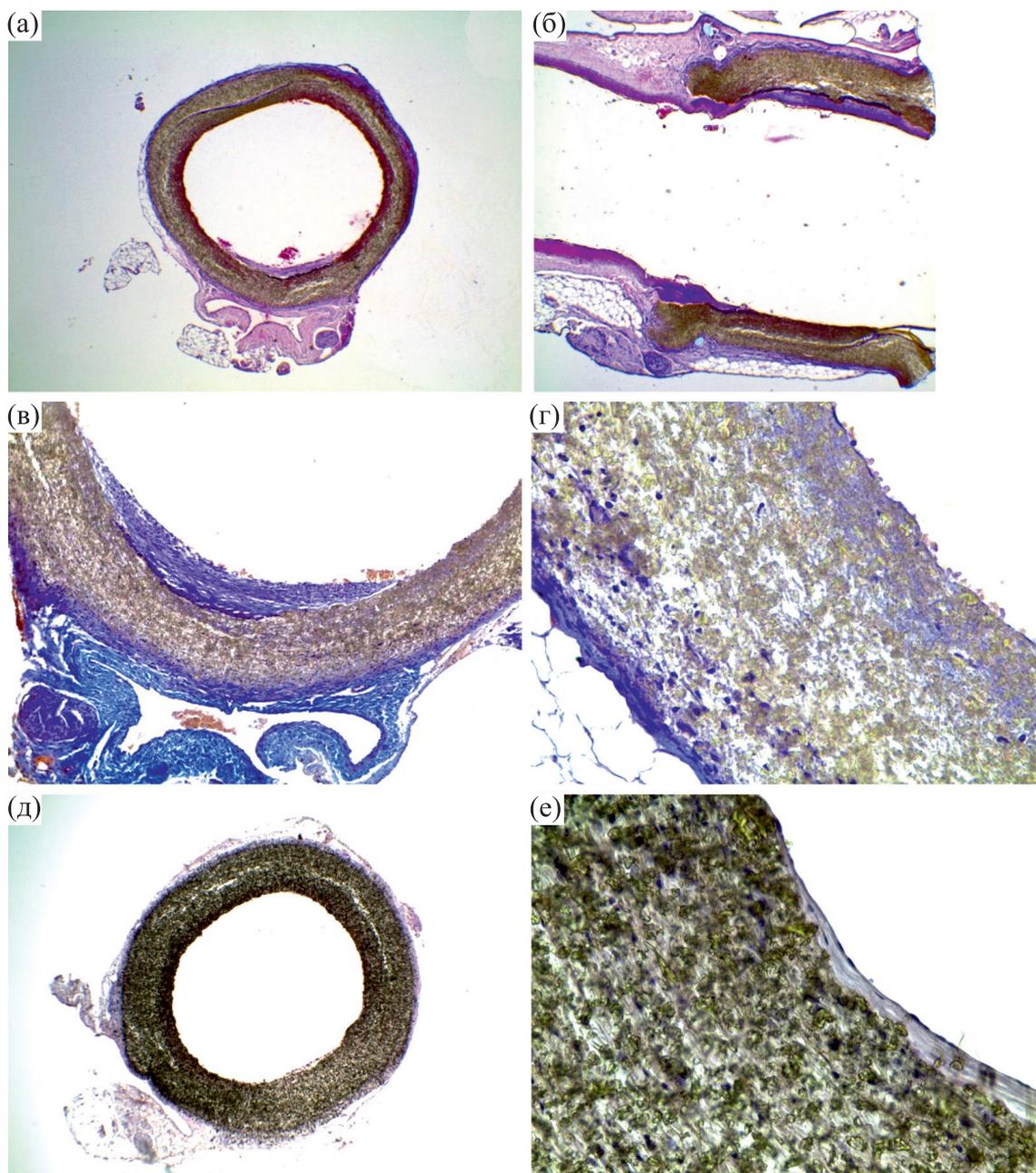


Рис. 3. Гистологические срезы полиимидных протезов: (а), (б), (в), (г) – через месяц после имплантации; (д), (е) – через шесть месяцев после имплантации. (а), (б), (д), (е) – Окраска гематоксилином и эозином; (в), (г) – окраска по методу Маллори. Увеличение общее: (а), (б), (д) – 4×; (в) – 10×; (г), (е) – 40×.

выявлены, что свидетельствует о стабильности упругих свойств материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биосовместимость протезов на основе микроволокон ароматического полиимида обуславливается не только химической инертностью полимера, но и заключением протеза в соедини-

тельнотканную капсулу и формированием неоинтимы на внутренней поверхности. Сохранение проходимости сосуда в течение длительного времени подтверждает тромборезистентность обсуждаемых протезов.

Полученные результаты дают основание рекомендовать сосудистые протезы, полученные методом электроформования из ароматического полиимида, для дальнейшего их исследования в

качестве тканеинженерного сосудистого имплантата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-73-30003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Re-*

gion, 2000–2016 (2018). URL: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/

2. Г. И. Попов, П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина и др., *Цитология*, **62** (1), 38 (2020).
3. P. C. Begovac, R. C. Thomson, J. L. Fisher, et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **25** (5), 432 (2003).
4. N. K. Awad, H. Niu, U. Ali, et al., *Membranes (Basel)*, **8** (1), 1 (2018).
5. R. D. Rusu, M. D. Damaceanu, and P. C. Constantin, *Intelligent Polymers for Nanomedicine and Biotechnologies*, Ed. by M. Aflori (Taylor & Francis, Boca Raton, 2018).
6. D. Serbezeanu, T. Vlad-Bubulac, D. Rusu, et al., *Materials (Basel)*, **12** (19), 1 (2019).
7. P. Starr, C. M. Agrawal, and S. Bailey, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **104** (2), 406 (2016).
8. W. Lu, J. Sun, and X. Jiang, *J. Mater. Chem. B*, **2** (17), 2369 (2014).
9. V. M. Svetlichnyi, G. V. Vaganov, L. A. Myagkova, et al., *Russ. J. Appl. Chem.*, **93** (1), 35 (2020).
10. R. Acland, *Surgery*, **72** (5), 744 (1972).
11. P. V. Popryadukhin, G. I. Popov, G. Y. Yukina, et al., *Int. J. Biomater.*, **2017**, 1 (2017).
12. П. И. Бегун и П. Н. Афонин, *Моделирование в биомеханике*, под ред. Л. А. Савина (Высшая школа, М., 2004).
13. В. Н. Александров, А. В. Кривенцов, Е. В. Михайлова и др., *Вестн. Рос. воен.-мед. академии*, **2** (58), 120 (2017).

Small Diameter Nonwoven Vascular Prostheses Based on Aromatic Polyimide Nanofibers

A.E. Chiriateva*, N.A. Zavrazhnykh*, P.V. Popryadukhin*, **, G.Yu. Yukina*, ***,
A.V. Kriventsov****, E.M. Ivankova**, and V.E. Yudin*, **

*Peter the Great St. Petersburg State Polytechnic University, Polytechnicheskaya ul. 29, Saint Petersburg, 195251 Russia

**Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoy prosp. 31, Saint Petersburg, 199004 Russia

***Pavlov First St. Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6-8, Saint Petersburg, 197022 Russia

****Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, Saint Petersburg, 194044 Russia

One of the main methods of treating cardiovascular pathology is surgical reconstruction of blood vessels, including the use of polymer-based prostheses; a clinically acceptable small diameter prosthesis is under development. In this work, vascular prostheses with a diameter of 1.2 mm were fabricated by electrospinning of aromatic polyimide. The mechanical characteristics of new prostheses were comparable to the parameters of native vessels in rats and humans. The prostheses were implanted into the abdominal aorta of rats for 1, 3 and 6 months. During the experiment, the prostheses were permeable; no signs of aneurysm or intimal hyperplasia were observed, there were no symptoms of thrombosis. Morphological analysis showed the formation of neointima with endothelium and thin subendothelial layer on the inner surface of the prostheses, and the formation of connective tissue encapsulating the prostheses. Prostheses based on polyimide nanofibers have demonstrated high biocompatibility and thromboresistance, thereby prompting further research exploring polyimide nanofibers-based prostheses as tissue-engineered vascular implants.

Keywords: tissue engineering, tissue-engineered vascular implants, polyimide, PM-ODA, electrospinning