

УДК 577.359: 616.77

## ОЦЕНКА ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ В АРТЕРИЮ КРОЛИКА ПОЛИУРЕТАНОВОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА, ОБРАБОТАННОГО АЗОТНОЙ ПЛАЗМОЙ

© 2022 г. В.С. Чудинов\*, #, И.Н. Шардаков\*, В.В. Литвинов\*\*, Г.Г. Фрейнд\*\*, С.Ю. Солодников\*\*\*, В.В. Маслова\*\*\*\*

\*\*Пермский государственный медицинский университет, Петропавловская ул., 26, Пермь, 614990, Россия

\*\*\*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Комсомольский просп., 29, Пермь, 614990, Россия

\*\*\*\*Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток ФМБА России, ул. Свободы, 52, Санкт-Петербург, Красное село, 198320, Россия

#E-mail: chudinovsl@mail.ru

Поступила в редакцию 18.06.2022 г.

После доработки 12.07.2022 г.

Принята к публикации 13.07.2022 г.

Образцы сосудистых протезов синтезировали из полиуретана на основе полипропиленгликоля, терминированного 2,4-толуилдиизоцианатом. Внешняя и внутренняя поверхности имплантатов обрабатывались ионами азота высокой энергии 20 и 10 кэВ соответственно. В результате ионно-плазменной обработки на поверхностях имплантатов был сформирован активный гидрофильный углеродный нанослой. На внутреннюю и внешнюю поверхности образцов, обработанных ионно-плазменным методом, нанесен белок тропоэластина. Обработанные и необработанные плазмой образцы протезов были имплантированы в сонную артерию кроликов. После недели экспозиции проведена морфологическая оценка тканей, окружающих стенки внутрисосудистых протезов. Показано, что внутри всех протезов сформировались тромбы. Однако морфологическая картина тканей вокруг стенок имплантатов, обработанных плазмой, характеризуется ускоренной канализацией тромба и пролиферацией эндотелия со стороны интимы сосуда по сравнению с необработанными имплантатами.

*Ключевые слова:* биосовместимость, тромб, полиуретан, ионно-плазменная обработка, углеродный слой.

DOI: 10.31857/S0006302922060217, EDN: LMDZHX

В ангиохирургии актуальным вопросом остается применение протезов вен и артерий малого диаметра, т.к. это может быть обусловлено дефицитом собственных сосудов для замещения пораженных участков [1, 2]. Следует отметить, что синтетические материалы для имплантации всегда вызывают реакцию на инородное тело, которая проявляется хроническим воспалением с формированием вокруг имплантата фиброзной ткани или тромботических масс при соприкосновении материала с кровью [3, 4].

В сосудистой хирургии широко распространено использование имплантатов из политетрафторэтилена. Важно отметить, что в 89–99% случаев применения протезов из политетрафторэтилена в краткосрочном периоде использования, до одного месяца, проблемы с их проходимостью отсутствуют [5, 6]. Однако при долговре-

менном применении имплантатов из данных видов материалов статистика ухудшается, нарушается проходимость протезов по причине их тромбоза. Через три года применения этих имплантатов замена требуется в 31% случаев, а через пять лет – в 61% случаев [7, 8]. Еще в 1979 г. авторы работы [9] в наблюдениях за 362 имплантатами из растянутого политетрафторэтилена марки Gore-Tex, вживленными больным при операции бедренно-подколенного шунтирования, отметили проходимость протезов через три года лишь у 58% больных. Клинически применение синтетических эндопротезов сердечно-сосудистой системы вызывает опасность возникновения тромбозов и тромбоземболического синдрома, которые могут привести к смерти пациента. Наибольшая частота таких осложнений эндопротезирования сосудов наблюдается при таких достаточно распространенных сопутствующих заболеваниях как

сахарный диабет, злокачественные опухоли, а также при протезировании сосудов малого диаметра, менее 6 мм.

Ранее нами были проведены исследования взаимодействия белков и клеточных культур с углеродным нанослоем, сформированного обработкой ионами высокой энергии полиуретанов различных рецептур. Было продемонстрировано, что белки образуют ковалентную связь с гидрофильной углеродной поверхностью полиуретанов, образованной в результате плазменной обработки, что способствует улучшенной пролиферации эндотелиальных клеток на них [10, 11]. Образование ковалентной связи между адсорбированным белком и обработанной азотной плазмой поверхностью полимера обеспечивается наличием неспаренных электронов на краю углеродных кластеров в модифицированном ионным пучком поверхностном слое [12]. Неспаренные электроны в таких структурах могут длительное время (до года) находиться в активном состоянии по причине их стабилизации  $\pi$ -электронным облаком конденсированных полиароматических структур. Гидрофильность обработанной азотной плазмой поверхности позволяет сохранять каталитическую активность адсорбированных белков [13].

Процесс адсорбции белка аналогично происходит на модифицированной плазмой поверхности имплантата после его внедрения в живой организм. Важно отметить, что адсорбция белков на поверхности инородного тела является первым этапом взаимодействия организма и искусственного имплантата и влияет на дальнейшее развитие реакции организма на внедренный имплантат [14, 15]. На основании имеющихся результатов исследований предполагается, что реакция организма на внедрение имплантата, модифицированного азотной плазмой, будет отличаться от реакции после вживления имплантата без обработки. Это предположение было подтверждено нами в экспериментах с лабораторными животными. При подкожном внедрении образцов имплантатов в лабораторных крыс наблюдалась менее выраженная клеточная и тканевая реакция организма на полиуретаны после ионно-плазменной обработки при сравнении с необработанными [11, 16, 17].

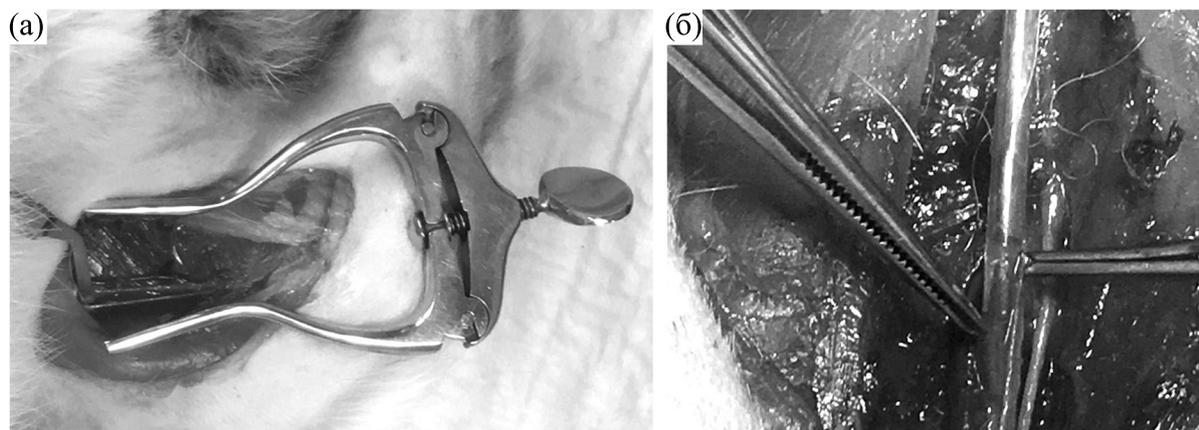
В данной работе мы продолжаем комплекс исследований полиуретанов, обработанных азотной плазмой, в экспериментах на животных на примере имплантации внутрисосудистого протеза в сонную артерию кролика с морфологической оценкой тромбообразования. Описанный далее эксперимент является предварительным и показывает целесообразность дальнейших исследований полимерных материалов, обработанных ионно-плазменным методом, для сердечно-сосуди-

стой хирургии. В данной работе мы используем рецептуру полиуретанов с механическими свойствами максимально сходными с характеристиками мягких тканей [18].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для синтеза полиуретана на основе полипропиленгликоля-диизоцианата использовали компоненты фирмы Sigma-Aldrich (США). Полиуретан синтезировали из форполимера на основе полипропиленгликоля с концевыми гидроксильными группами, терминированными 2,4-толуилдиизоцианатом. Для отверждения форполимер смешивали с политетрагидрофураном в реакционном боксе при влажности 2–3% и температуре 23°C в течение 5 мин и наносили на стеклянные формы. Соотношение изоцианатных и гидроксильных групп составляло 100 : 35. Реакцию отверждения проводили в течение трех суток в заданных условиях, после чего полученный полиуретан отжигали в вакуумном термощкафу при температуре 120°C и давлении  $7 \cdot 10^{-2}$  миллибар. Затем форму с полиуретаном погружали в толуол до равновесного набухания полиуретана. Данный растворитель разрешен к применению в технологии медицинских имплантатов согласно документации FDA. После этого полиуретан отслаивали от стеклянной формы и сушили на воздухе до полного удаления растворителя, что детектировалось методом ИК-спектроскопии многократно нарушенного полного внутреннего отражения. После синтеза низкомолекулярные продукты удаляли из полиуретана с помощью набухания в гептане. Для отмывки полиуретанов после синтеза использовали деионизированную воду с удельным сопротивлением 18 МОм·см при 25°C, получаемую из системы Direct Q5 (Millipore, США). Полученный имплантат после отмывки в деионизированной воде сушили на воздухе. При сушке полиуретан защищали от попадания пыли.

Для эксперимента по установке в кровеносный сосуд полимерного протеза по описанной методике синтеза были подготовлены 4 полые трубки из полиуретана. Внешний диаметр трубок составлял 2 мм, толщина стенки 100 мкм и длина 10 мм. Два протеза не подвергали предварительной обработке, еще два протеза были обработаны в Университете Сиднея (Австралия) ионно-плазменным методом, адаптированным к использованию для изделий сложной формы, описанным в патенте [19]. Для ионно-плазменной обработки внешней стороны протеза использовали метод плазменно-иммерсионной ионной имплантации при энергии ионов 20 кэВ и времени обработки 800 с, что соответствовало флюенсу  $10^{16}$  ион/см<sup>2</sup>. Плазменную обработку внутренней стенки про-



**Рис. 1.** Внедрение внутрисосудистого имплантата в лабораторное животное: выделение тупым способом левой сонной артерии (а) и внедрение имплантатов в сосуд (б).

теза выполняли в течение 10 мин при амплитуде напряжения 10 кэВ и давлении в подводящей трубке 2 торр. После обработки протезы погружали в буферный раствор с белком тропоэластином в концентрации 100 мкг/мл при рН 7.0. Далее образцы высушивали, упаковывали и транспортировали в Пермь (Россия). Все четыре протеза перед операцией имплантации подвергали стерилизации в течение 10 мин ультрафиолетом облучением с длиной волны 254 нм в ламинарном боксе Lamsystems и погружали в фосфатно-буферный раствор с рН 7.4 до момента операции.

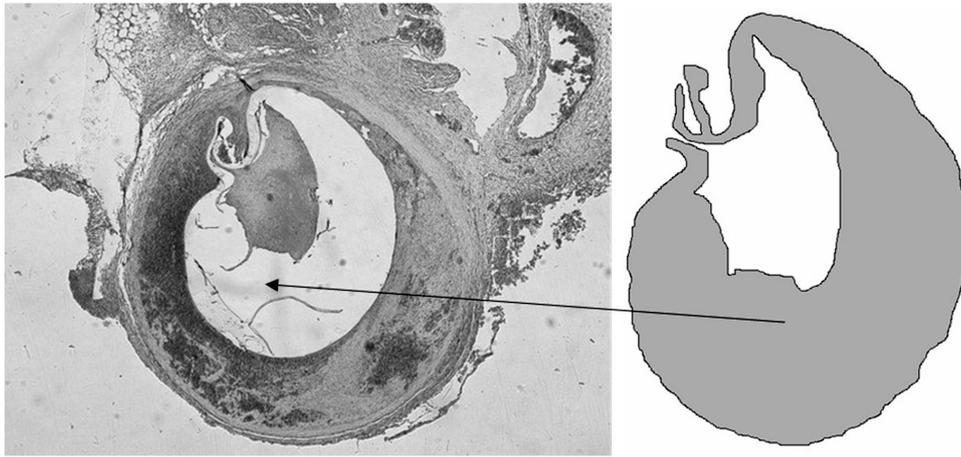
Эксперимент проводили на четырех кроликах породы Советская шиншилла. Кроликам № 1 и 2 из опытной группы был имплантирован сосудистый протез, внутренняя поверхность которого была обработана ионно-плазменным методом с последующим нанесением слоя белка тропоэластин. Кроликам № 3 и 4 из контрольной группы вживлены полиуретановые образцы имплантатов без ионно-плазменной обработки.

Перед операцией всем животным вводили 0.05 мл гепарина и 0.1 мл 1%-го атропина. Операцию по вживлению сосудистых протезов выполняли под общим наркозом препаратом «Золетил» в дозе 8 мг/кг внутримышечно. После введения животного в наркоз место операции выбривали машинкой для стрижки животных. Скальпелем разрезали кожный покров, тупым способом выделяли левую сонную артерию (рис. 1а), на которую для остановки кровотока накладывали две сосудистые клипсы. В дистальном конце выделенного сосуда заточенной инъекционной иглой вскрывали оболочку сосуда и в просвет сосуда пинцетом вводили имплантаты (рис. 1б). На сосудистый дефект наносили два шва нитями PROLEN 007, для дополнительной герметизации артерии использовали сульфакрилатный клей. Снимали клипсы и визуально контролировали

восстановление кровотока в сосуде. Операционную рану ушивали шовным материалом «Викрил» 4/0. Швы обрабатывали 3%-й перекисью водорода. После операции животным вводили изотонический раствор хлорида натрия (20 мл) подкожно, внутримышечно вводили фуросемид в дозировке 0.5 мл, дексаметазон — 0.5 мл, сульфамфоксаин — 0.5 мл, цефтриаксон — 100 мг. Продолжительность операции составляла 42–45 мин. Наблюдение за животными проводили непрерывно в течение шести часов, далее выполняли ежедневный ветеринарный осмотр в течение семи суток.

Эвтаназию животных проводили под наркозом «Золетил» в дозе 10 мг/кг. Извлеченные части сонной артерии с имплантатом разрезали поперек на две части и фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина.

Обработку препаратов внутрисосудистых имплантатов проводили по общепринятой методике. Срезы на микротоме делали с обеих сторон анастомоза и по середине исследуемого кровеносного сосуда, окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки зрелости фибрина применяли методики окраски по Зербино (оранжевый, кислотный красный, водный голубой). Зрелость фибрина оценивали в зависимости от сроков его образования. «Молодым» характеризовали фибрин, волокна которого окрашиваются в желто-оранжевый цвет, сроки его образования составляют 0–6 ч; «зрелым» называли фибрин, окрашиваемый в красный цвет, сроки его образования 6–24 ч; «старым» — фибрин, окрашиваемый в синий цвет, сроки его образования более 24 ч. На готовых гистологических срезах оценивали общую морфологическую картину, сохранную площадь просвета артерии, состав и зрелость структурных компонентов сформированного тромба.



**Рис. 2.** Кролик № 1, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с модифицированной поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.

Для подсчета площади поперечного сечения восстановленного кровотока делали микрофотографии с помощью цифровой оптической системы микроскопии (Nigoh, Япония). Снимки обрабатывали с помощью программного пакета «Image J». Всего исследовали по четыре поперечных среза сонной артерии кролика, содержащей имплантат.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе ежедневного мониторинга состояния животных после оперативного вмешательства у всех четырех кроликов не выявлено нарушений в поведении, кожных покровах и питании.

**Модифицированные плазмой имплантаты.** При анализе опытного образца тканей кролика № 1 обнаружено, что тромботические массы рыхлые, характеризуются нитями фибрина и эритроцитами. Наблюдается тромб небольших размеров, на фоне которого встречаются пучки фибробластов. В тромботических массах преобладают волокна «зрелого» и «старого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч. Со стороны интимы отмечается пролиферация эндотелия, замещение тромботических масс соединительной тканью. Также наблюдается наличие крупных полостей — канализация тромба, в части полостей отмечается эндотелизация-реваскуляризация (рис. 2).

В тканях, окружающих имплантат кролика № 2, отмечается выраженная полиморфноклеточная инфильтрация сосудистой стенки (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы). Просвет сосуда выполнен тромбом с выраженными признаками организации и средними полостями канализации (рис. 3). В тромботических массах

преобладает «старый» фибрин, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч.

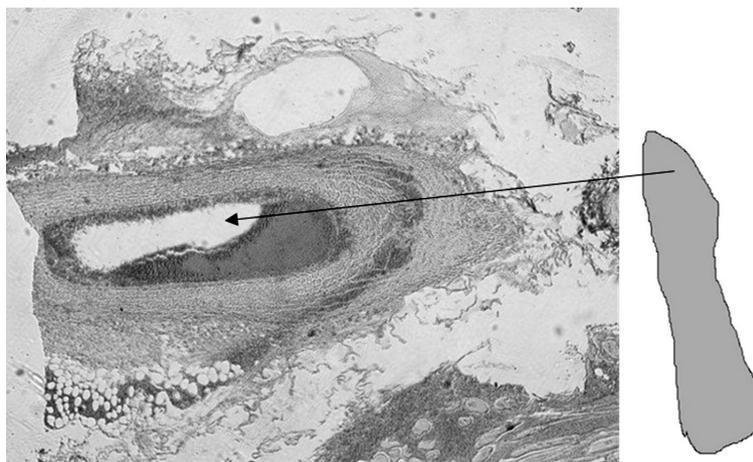
**Необработанные контрольные имплантаты.** Окружающие имплантат ткани кролика № 3 характеризуются формированием нескольких мелких полостей, выстланных эндотелием вблизи интимы сосуда. В просвете сосуда наблюдается крупный смешанный тромб с каналом средних размеров (рис. 4). В тромботических массах преобладают волокна «молодого» и единичные волокна «зрелого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 12 до 18 ч. В отдельных участках отмечается пролиферация интимы сосуда.

У кролика № 4 в просвете сосуда наблюдается крупный тромб, в одном из участков которого видна полость — канализация (рис. 5). В тромботических массах преобладают волокна «зрелого» фибрина, что указывает на сроки образования тромба от 18 до 24 ч. Отмечается слабая пролиферация интимы и формирование щелевидной полости. Вблизи интимы сосудов локализуются небольшие фокусы соединительной ткани, свидетельствующие об организации тромба.

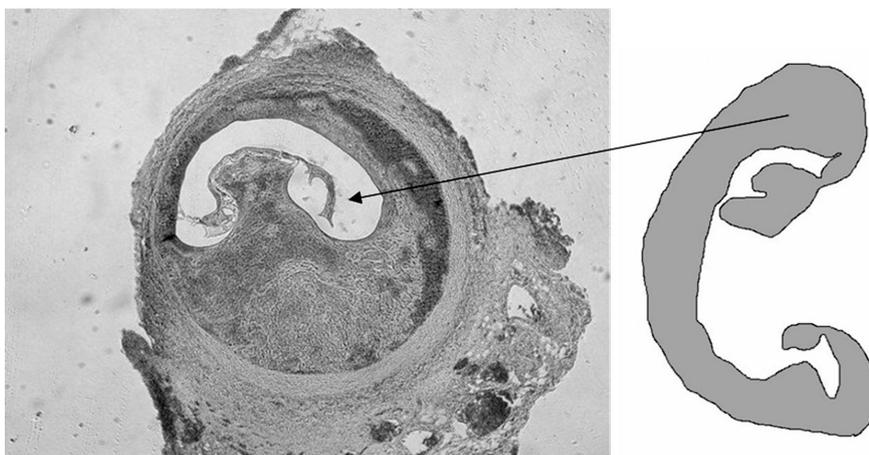
На рис. 6 представлен график средних значений площади поперечного сечения восстановленного кровотока в полости сосудов животных с имплантатами без обработки плазмой и обработанных ионно-плазменным методом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

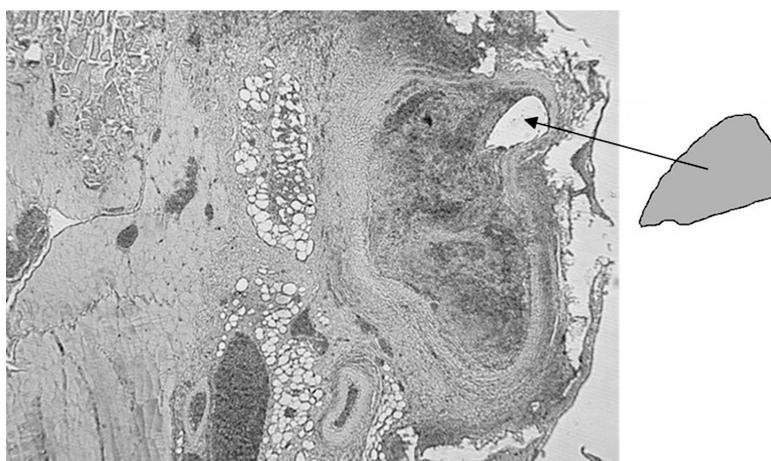
По результатам гистологического исследования в группе животных с необработанными полимерными имплантатами наблюдалась типичная картина тромбообразования на поверхности контактирующего с кровью инородного тела. Просвет сосуда был выполнен тромботическими массами со слабой пролиферацией эндотелия инти-



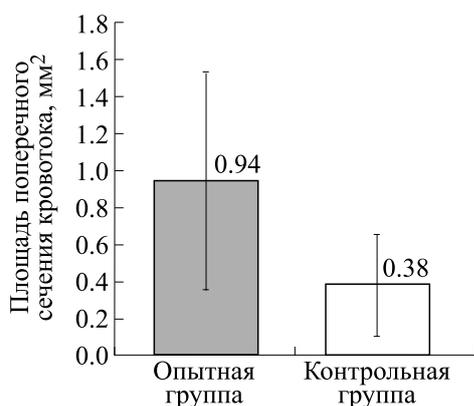
**Рис. 3.** Кролик № 2, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с модифицированной поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.



**Рис. 4.** Кролик № 3, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с немодифицированной плазмой поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.



**Рис. 5.** Кролик № 4, гистологический срез тканей в сосудистом протезе с необработанной плазмой поверхностью (окраска гематоксилином и эозином) и контуры полости кровотока.



**Рис. 6.** Результаты гистологического исследования реканализации тромба в образцах протезов сосудов опытной (обработанной плазмой) и контрольной (не обработанной плазмой) групп животных.

мы и небольшим количеством щелевидных полостей. Наблюдалась медленно протекающая канализация тромба без его выраженной организации, что говорит о затяжном процессе тромбообразования.

В опытной группе животных с протезами сосудов, обработанными ионно-плазменным методом и с нанесенным белковым слоем тропоэластина, сформированные тромботические массы в просвете были меньших размеров по сравнению с группой контроля. Со стороны интимы наблюдалась пролиферация эндотелия и замещение тромботических масс соединительной тканью с выраженной канализацией тромба.

Образование тромбов и в опытной, и в контрольной группах обусловлено малыми диаметрами имплантатов и отсутствием антикоагулянтной терапии в послеоперационный период. Однако данная модель эксперимента создает наиболее подходящие условия для развития тромбообразования с возможностью оценки реакции организма на имплантацию искусственно-го сосудистого протеза.

Из оценки полученных результатов следует, что опытная группа характеризуется ускоренной канализацией и васкуляризацией тромба. Площадь участков для кровотока у опытной группы в два с половиной раза превышает размер таких участков у контрольной группы.

## ВЫВОДЫ

По результатам морфологических исследований тканей, окружающих стенки сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию кроликов, выявлено, что внутри всех протезов, как обработанных ионно-плазменным методом, так и необработанных, сформировались тромбы.

При этом в опытной группе (с обработанными азотной плазмой имплантатами) канализованные участки кровотока по площади сечения в два с половиной раза превышают размеры у контрольной группы (необработанные имплантаты). Также со стороны интимы опытная группа характеризуется более выраженной пролиферацией эндотелия по сравнению с контрольной. На основании предварительного эксперимента по имплантации лабораторным животным сосудистых полиуретановых протезов, обработанных азотной плазмой, можно сделать вывод о возможности применения искусственных полиуретановых протезов с ионно-плазменными методами обработки. Для дальнейших исследований требуется отработать оптимальные режимы ионно-плазменной обработки, условия хранения и вживления имплантата, разработать протокол послеоперационной антикоагулянтной терапии, провести новые эксперименты с целью статистического подтверждения результата.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарности исследователям А.В. Кондюрину и И.В. Кондюриной из «Эвингар Сайнтифик», проф. М. Билек, проф. Д. Маккензи и проф. А. Вайсу Университета Сиднея за разрешение работать в их лабораториях и предоставленный белок тропоэластин.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Пермского края (проект № 20-48-596014), а также Государственного задания ИМСС УрО РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Хирургические вмешательства, содержание, питание и эвтаназия животных соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. J. Veith, C. M. Moss, S. Sprayregen, et al., *Surgery*, **85** (3), 253 (1979).
2. Г. И. Попов, П. В. Попрядухин, Г. Ю. Юкина и др., *Цитология*, **62** (1), 38 (2020).

3. И. В. Попова, А. О. Степанова, Д. С. Сергеевичев и др., Патология кровообращения и кардиохирургия, **19** (4), 63 (2015).
4. M. S. Lord, W. Yu, B. Cheng, et al., *Biomaterials*, **30** (28), 4898 (2009).
5. Л. А. Бокерия, М. Б. Темрезов и В. И. Коваленко, *Анналы хирургии*, № 2, 5 (2010).
6. C. Devine and C. McCollum, *J. Vasc. Surg.*, **40** (5), 924 (2004).
7. P. Klinkert, P. N. Post, P. J. Breslau, et al., *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **27** (4), 357 (2004).
8. I. J. Rychlik, P. Davey, J. Murphy, et al., *J. Vasc. Surg.*, **60** (2), 506 (2014).
9. H. Haimow, F. Giron, H. J. Haimow, et al., *Arch. Surg.*, **114** (6), 673 (1979).
10. В. С. Чудинов, И. В. Кондюрина, И. Н. Шардаков и др., *Биофизика*, **63** (3), 444 (2018).
11. V. Chudinov, I. Kondyurina, V. Terpugov, et al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **440**, 163 (2019).
12. Б. Рэнби и Я. Рабек, *Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров*, под ред. Н. М. Эмануэля (Мир, М., 1978).
13. С. Т. Н. Гран, N. J. Nosworthy, A. Kondyurin, et al., *RSC Adv.*, **3**, 23604 (2013).
14. W. J. Hu, J. W. Eaton, T. P. Ugarova, et al., *Blood*, **98** (4), 1231 (2001).
15. *Биосовместимость*, под ред. В. И. Севастьянова и М. П. Кирпичникова (Медицинское информационное агентство, М., 1999).
16. В. С. Чудинов, И. В. Кондюрина, В. Н. Терпугов и др., *Мед. техника*, № 4, 19 (2020).
17. V. S. Chudinov, I. N. Shardakov, V. V. Maslova, et al., *In AIP Conf. Proc.*, **2167**, 020055 (2019).
18. I. Kondyurina, S. G. Wise, A. K. Y. Ngo, et al., *Biomed. Mater.*, **12** (4), 045002 (2017).
19. И. Н. Шардаков и В. С. Чудинов, Патент РФ № 2721280 (2020).

## **Assessment of Thrombus Formation during Implantation of a Polyurethane Vascular Prosthesis Treated with Nitrogen Plasma in the Rabbit Artery**

**V.S. Chudinov\*, I.N. Shardakov\*, V.V. Litvinov\*\*, G.G. Friend\*\*,  
S.Yu. Solodnikov\*\*\*, and V.V. Maslova\*\*\*\***

*\*Institute of Continuous Media Mechanics, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,  
ul. Akademika Koroleva 1, Perm, 614013 Russia*

*\*\*Perm State Medical University, Petropavlovskaya ul. 26, Perm, 614990 Russia*

*\*\*\*Perm National Research Polytechnic University, Komsomolsky prosp. 29, Perm, 614990 Russia*

*\*\*\*\*St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums, FMBA of Russia,  
ul. Svobody 52, Krasnoe Selo, St. Petersburg, 198320 Russia*

Samples of vascular prostheses were made of polyurethane synthesized with polypropylene glycol terminated by 2,4-toluene diisocyanate. The outer and inner surfaces of the implants were treated by nitrogen ions with high energy of 20 keV and 10 keV, respectively. As a result of ion-plasma treatment, a hydrophilic active carbon nanolayer was generated on implant surface. Tropoelastin protein was attached to the inner and outer surfaces of the samples subjected to ion-plasma treatment. Prostheses that were and were not exposed to plasma were implanted in the rabbit carotid arteries. One week after carotid implantation, morphology of tissues surrounding the walls of the implanted vascular prostheses was assessed. It was shown that thrombus formation occurred on all the prostheses which had been implanted. However, the morphological pattern of tissues around the walls of plasma-treated implants is characterized by accelerated thrombus canalization and endothelial cell proliferation of intima as opposed to that around the walls of untreated implants.

*Keywords: biocompatibility, thrombus, polyurethane, ion-plasma treatment, carbon layer*