

УДК: 616.13-77: 615.461  
DOI: 10.17802/2306-1278-2017-6-3-13-24

## МОДИФИКАЦИЯ RGD-ПЕПТИДАМИ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА: РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

**В. Г. МАТВЕЕВА, Л. В. АНТОНОВА, В. В. СЕВОСТЬЯНОВА, Е. А. ВЕЛИКАНОВА,  
Е. О. КРИВКИНА, Т. В. ГЛУШКОВА, Ю. И. ХОДЫРЕВСКАЯ,  
О. Л. БАРБАРАШ, Л. С. БАРБАРАШ**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия*

**Резюме.** Для придания поверхности полимерных сосудистых графтов функциональной активности использованы RGD-пептиды, являющиеся сайтами связывания с интегриновыми рецепторами клеток.

**Цель исследования.** Изучить влияние модификации RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона на проходимость, скорость и качество эндотелизации внутренней поверхности после имплантации графтов в брюшную часть аорты мелких лабораторных животных.

**Материалы и методы.** Графты диаметром 2 мм были изготовлены методом электроспиннинга из поликапролактона (PCL графты). Поверхность графтов была модифицирована RGD-пептидами посредством карбодиимидного связывания (PCL-RGD графты). До имплантации исследована морфология поверхности, физико-механические и вязкоэластические свойства PCL и PCL-RGD графтов. PCL (n=16) и PCL-RGD графты (n=16) имплантировали в брюшную аорту крыс на 1, 3, 6, 9 месяцев, с последующим изучением гистологической и иммунофлуоресцентной картины.

**Результаты.** Морфология поверхности и вязкоэластические свойства PCL и PCL-RGD графтов не имели существенных различий. Проподимость PCL-RGD графтов на всех сроках имплантации была на 50% выше по сравнению с PCL, а частота развития гранулематозного воспаления - в среднем, в 2 раза меньше. Присутствие на внутренней поверхности PCL-RGD графтов эндотелиальных клеток с фенотипом CD31+vWF+ зарегистрировано уже через 1 месяц имплантации, на PCL-графтах - через 3 месяца.

**Заключение.** Модификация PCL-графтов RGD-пептидами способствовала повышению проходимости графтов, более ранней эндотелизации внутренней поверхности, а также снижению выраженности гранулематозного воспаления.

**Ключевые слова:** сосудистые графты, модификация, RGD-пептиды.

## MODIFICATION BY RGD-PEPTIDES OF VASCULAR GRAFTS OF SMALL DIAMETER FROM POLYPAROLACTONE: EXPERIMENTAL STUDY RESULTS

**V. G. MATVEEVA, L. V. ANTONOVA, V. V. SEVOSTYANOVA, E. A. VELIKANOVA,  
E. O. KRIVKINA, T. B. GLUSHKOVA, YU. I. KHODYREVSKAYA,  
O. L. BARBARASH, L. S. BARBARASH**

*Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia.*

**Abstract.** To endow the luminal surface of the vascular grafts of functional, we applied arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-containing peptides, which are the ligands for integrins.

The aim to study the effect of modification of small-diameter vascular grafts from polycaprolactone on the patency, speed and quality of endothelization of the internal surface after implantation of grafts into the abdominal part of the aorta of small laboratory animals by the RGD peptides.

**Materials and methods.** Vascular grafts diameter 2 mm were fabricated of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) using electrospinning following optional conjugation with RGD peptides by the method of carbodiimide binding. The surface morphology, physical-mechanical properties of PCL and PCL-RGD grafts was studied before implantation. Either PCL and PCL-RGD grafts were implanted into abdominal aorta of rats for 1, 3, 6, or 9 months following explantation along with the adjacent aortic regions and further histological and immunofluorescence examination.

**Results.** We found that immobilization of RGD peptides at the luminal surface did not alter structure and

mechanical properties of PCL grafts. Primary patency of the RGD-treated grafts was 50% higher while the prevalence of inflammation was 2-fold lower compared to PCL grafts at all the time points. Moreover, we identified CD31+vWF+ cells at the luminal surface of RGD-PCL grafts as early as 1 month postimplantation in comparison with 3 months postimplantation in PCL grafts.

**Conclusion.** Immobilization of RGD peptides at the PCL grafts increases the primary grafts patency, induces rapid endothelialization and decreases granulomatous inflammation.

**Key words:** vascular grafts, modification, RGD-peptides.

## Введение

В настоящее время не существует идеального решения проблемы дефицита подходящих аутологичных кровеносных сосудов малого диаметра (<6мм), предназначенных для проведения операций по восстановлению кровотока в ишемизированных органах и тканях. Ведется активный поиск вариантов использования различных полимеров для создания протезов сосудов малого диаметра [1]. Однако почти все полимерные материалы, применяемые для создания искусственных сосудов, несут тромбогенный потенциал.

Наиболее предпочтительным и физиологичным вариантом повышения биосовместимости поверхности сердечно-сосудистых имплантатов является ее эндотелизация, обеспечивающая защиту от тромбообразования и гиперплазии неинтимы [2]. Эндотелизацию графтов возможно проводить *in vitro*, однако данный подход высокотехнологичный и требует много времени, поэтому его использование будет ограничено плановыми вмешательствами [3]. Для экстренной сердечно-сосудистой хирургии весьма перспективно применение биофункционализированных материалов, способных к быстрой спонтанной эндотелизации *in situ* [3].

Придание искусственной поверхности свойств внеклеточного матрикса (ECM) благодаря иммобилизации белков, являющихся сайтами для связывания с интегриновыми рецепторами клеток, позволяет улучшить клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и выживание клеток. В структуре большинства белков ECM присутствует пептидная последовательность аргинин – глицин – аспарагиновая кислота (RGD), которая определяет адгезионные свойства белков и представляет собой сайты клеточной адгезии. На мембране эндотелиальных и эндотелиальных прогениторных клеток (EC/EPC) широко представлены интегрины  $\alpha v \beta 3$  и  $\alpha 5 \beta 1$ , являющиеся рецепторами для RGD-последовательности [4]. Иммобилизация RGD-пептидов на поверхности полимера позволит создать сайты адгезии эндо-

телиальных клеток, повысить тромборезистентность и биосовместимость материала.

Ранее мы показали успешность конъюгирования RGD-пептидов с поверхностью графтов на основе поликапролактона (poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL) через карбодимид, который известен как метод химического перекрестного связывания нулевой длины [5]. Кроме того, в эксперименте *in vitro* доказано положительное влияние RGD-модификации на клеточную интеграцию [6].

## Цель исследования

Изучение влияния модификации RGD-пептидами сосудистых графтов малого диаметра из поликапролактона на проходимость, скорость и качество эндотелизации внутренней поверхности после имплантации графтов в брюшную часть аорты мелких лабораторных животных.

## Материалы и методы

### *Изготовление сосудистых графтов из PCL*

PCL графты диаметром 2 мм изготавливали на аппарате электроспиннинга Nanon-01A (MECC, Япония) из 14% раствора PCL (Sigma–Aldrich) в хлороформе при напряжении 15 kV, скорости подачи раствора 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора 150 мм, с использованием иглы 22G.

### *Модификация PCL графтов RGD-пептидами*

С целью активации полимерных поверхностей графты обрабатывали 10% этилендиамином (ЭДА) в 2-пропанол [7], промывали 0,3% Tween-20 и высушивали. Конъюгирование полимера с RGD-пептидами выполнено с помощью линкерного раствора карбодимиды. Синтез RGD-содержащей биомолекулы (лауриновая кислота-глицин-аргинин-глицин-аспарагиновая кислота-глицин-аминокапроновая кислота (LA-GRGDG-AHex) выполнен по методу, описанному ранее Sedaghati с соавт. [8]. RGD-пептиды были растворены до концентрации 0,2 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 0,05% Tween-20. Для конъюгации полимера с

RGD-пептидами графты обрабатывали линкерным раствором, промывали ФСБ и далее инкубировали с раствором RGD-пептидов, после этого полученные PCL-RGD графты промывали и высушивали.

#### *Изучение морфологии графтов*

Морфологию поверхности PCL и PCL-RGD графтов изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Япония). Предварительно осуществляли золото-палладиевое напыление образцов размером 0,5×0,5 см. Размер волокон и пор, а также пористость материала определяли по полученным изображениям с использованием программы ImageJ. Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение (mean (SD)).

#### *Оценка физико-механических свойств*

Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении сосудистого сегмента. В каждой группе было испытано по 6 образцов.

Прочность и упруго-деформативные свойства полимерных графтов PCL и PCL-RGD оценивали в условиях одноосного растяжения образцов на универсальной испытательной машине (Zwick/Roell, Германия). Прочность материала оценивали по максимальному напряжению при растяжении (МПа). Эластичность и жесткость материала оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (%), и модулю Юнга (МПа) соответственно. Модуль Юнга определяли в качестве касательной к кривой растяжения в области малых деформаций (0-5 % по оси абсцисс) для каждой группы, где выполнялся закон Гука, т.е. наблюдалась линейная зависимость напряжения от удлинения. Контролем служили подкожная вена нижней конечности и внутренняя грудная артерия (n = 6 для каждой контрольной группы), полученные от пациентов, подвергшихся аортокоронарному шунтированию после подписания ими информированного согласия. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом.

Измерение COMPLAINTности графтов проводили на оригинальной установке артериального пульсирующего потока крови с замкнутой системой циркуляции. Для перфузии в установке применяли гепаринизированную цельную кровь, смешанную с физиологическим раствором в соотношении 2:1. Участки PCL и PCL-RGD графтов длиной 50 мм (n = 6) подсоединяли по одно-

му к установке и погружали в ванну с 0,9% NaCl. Измерение растяжения стенки графтов проводили цветным дуплексным сканированием (Picus, Pie Medical Systems, США). Растяжение стенки рассчитывали, исходя из диаметров просвета каждого сегмента в конце систолы и диастолы. Использовали параметры пульсового давления 30, 60, 90 мм рт.ст.

Комплаентность (C) рассчитывали по формуле:

$$C (\%/мм.рт.ст \times 10^{-2}) = ((Ds - Dd) / Dd \times 104) / (Ps - Pd),$$

где P, D, s и d – давление, диаметр, систола и диастола соответственно.

#### *Имплантация графтов в брюшную аорту крыс*

Графты PCL (n=16) и PCL-RGD (n=16) имплантировали 6-месячным самцам крысам Wistar массой 400-450 г. Процедуры осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986). Животных вводили в наркоз изофлураном. Графты с внутренним диаметром 2 мм и длиной 10 мм, стерилизованные этиленоксидом, имплантировали в брюшную часть аорты крыс ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации. Крыс с имплантированными графтами выводили из эксперимента через 1, 3, 6 и 9 месяцев (n=4 в каждой группе). Графты выделяли с участками прилегающей аорты.

#### *Гистологическое исследование*

Образцы, фиксированные в формалине, дегидратировали в изопропанол, заключали в парафин (Electron Microscopy Sciences) и изготавливали поперечные срезы толщиной 5 мкм. После депарафинизации окрашивали раствором гематоксилина Харриса и 1% раствора эозина Y. Препараты изучали на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

#### *Иммунофлуоресцентное исследование*

Из замороженных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм и наносили на стекла, покрытые L-полилизинном. Блокировку неспецифического связывания проводили бычьим сывороточным альбумином (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ. На срезы наносили смесь неконъюгированных первичных антител к CD31 (ab119339, Abcam, Англия) и CD34 крысы (ab185732), или антитела к коллагену I (ab28028) и коллагену IV крысы (ab6586), или антитела к фактору фон Виллебранда (vWF), конъюгированные с FITC (ab8822) и инкубировали при температуре +4°C в течение ночи. Срезы с неконъюгированны-

ми первичными антителами инкубировали со смесью соответствующих вторичных антител конъюгированные с красителями AlexaFluor 568 (ab175473) и AlexaFluor 488 (ab150105), и докрашивали ядерным красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США). Готовые срезы заключали под стекло и анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

#### Статистический анализ

Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Для нормального распределения данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Данные, имеющие распределение, отличное от нормального, представлены в виде медианы (М) и 25 и 75% перцентилей. Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования

Графты изготавливали методом электроспиннинга, что позволяет имитировать архитектуру естественного внеклеточного матрикса и добиваться высокого отношения площади поверхности к объему [9]. При проведении сканирующей электронной микроскопии выявлено, что графты PCL и PCL-RGD обладали однородной, высокопористой структурой, образованной хаотично расположенными изогнутыми нитями (рис. 1 а, б). Пористость PCL и PCL-RGD образцов не различалась и определялась в пределах 50% (49,7 и 49,08%, соответственно). Однако средний диаметр волокон в модифицированных графтах повышался (PCL 2,03 (0,69)  $\mu\text{m}$ , PCL-RGD 2,46 (1,13)  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ), при этом достоверного изменения площади пор не отмечалось (mean (SD) PCL 23,59 (26,8), PCL-RGD 34,25 (47,75)  $\mu\text{m}^2$ ) (рис. 2).

В отличие от немодифицированных образцов матрикса, конъюгированные с RGD-пептидами, имели выпуклости на нитях полимера, хорошо заметные при большом увеличении (рис. 1 в).

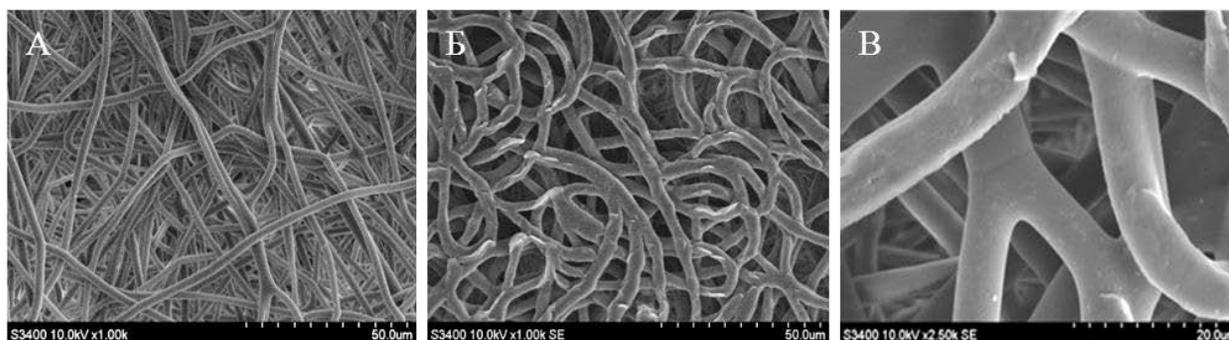


Рисунок 1. СЭМ внутренней поверхности полимерных графтов: А. PCL (ув.  $\times 1000$ ); Б. PCL-RGD (ув.  $\times 1000$ ); В. PCL-RGD (ув.  $\times 2500$ )

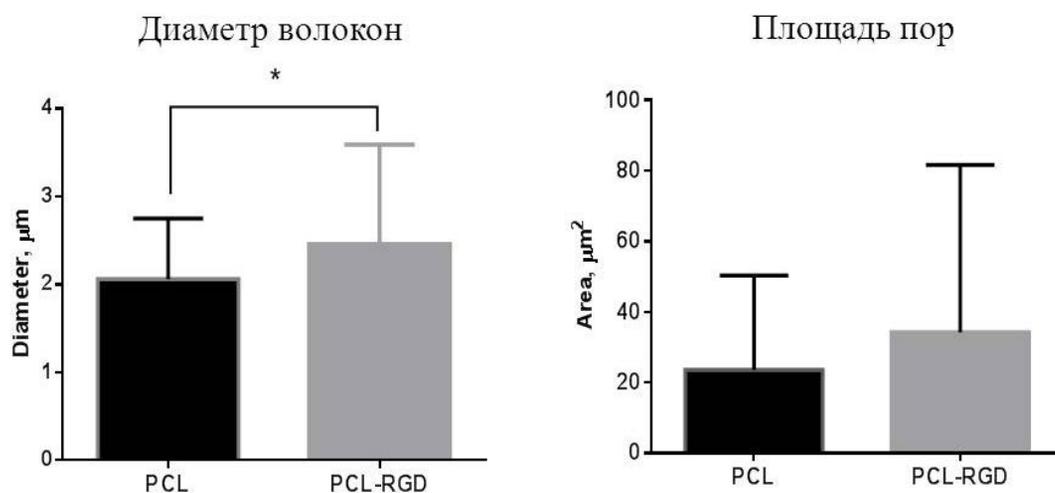


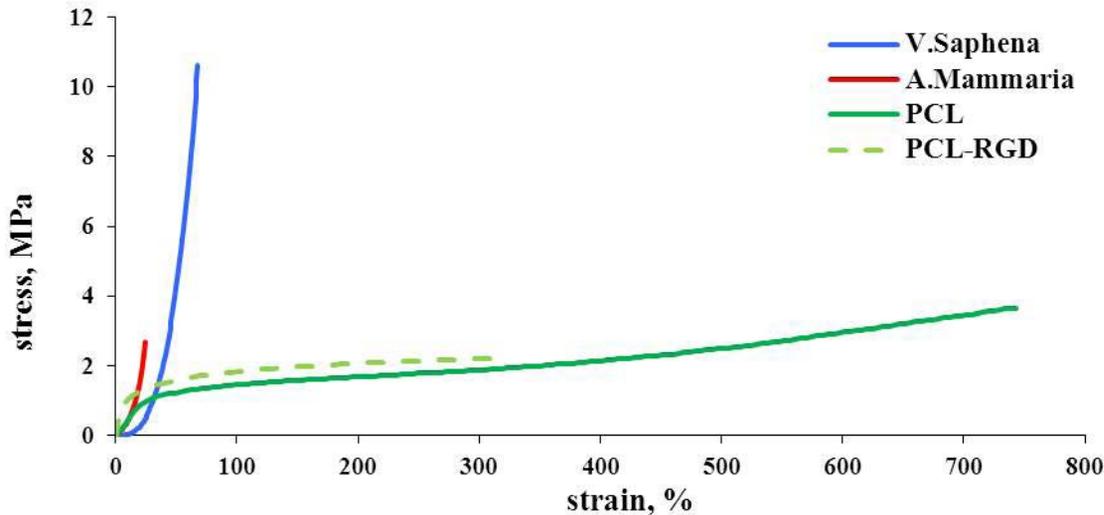
Рисунок 2. Диаметр волокон и площадь пор PCL и PCL-RGD графтов (mean(SD))

Данные неровности, предположительно, представляют собой иммобилизованные на поверхности RGD-биомолекулы. Таким образом, иммобилизация RGD-пептидов на графтах из PCL повышает толщину волокон, но существенно не изменяет пористость.

Изучение физико-механических свойств показало, что внутренняя грудная артерия (А.Маммариа), являющаяся «золотым» стандартом при операциях АКШ, имеет значительные

отличия по прочностным и упруго-деформативным свойствам от подкожной вены нижних конечностей (V.Saphena), которая также применяется при данном виде операций. Артерии значительно менее прочны и растяжимы, чем вены ( $p < 0,03$ ).

По прочности PCL графты превосходят А.Маммариа, однако уступают V.Saphena ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, табл. 1). PCL графты более растяжимы по сравнению с нативными сосудами, при



**Рисунок 3. Механические свойства исследуемого материала, зависимость напряжения от удлинения**

этом они обладают большей жесткостью. Модификация PCL графтов RGD-пептидами снижала прочность образцов, делая их схожими с А.Маммариа. Снижение гиперэластичности (относительного удлинения ( $p < 0,05$ )) модифицированных RGD-пептидами PCL графтов также является положительным моментом. Однако мо-

дификация способствовала повышению жесткости полимерных каркасов ( $p < 0,05$ ).

Комплаентность представляет собой изменение объема структуры по отношению к изменению давления. Изучена комплаентность при различных показателях пульсового давления –

Таблица 1.

**Механические свойства PCL, PCL-RGD графтов и нативных сосудов**

Вид материала	Прочность, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга (Емод), МПа
А.Маммариа	2,48 (1,09-3,25)	29,86 (25,50-41,60)	2,34 (1,53-2,95)
V.Saphena	10,03 (7,83-12,13)*	76,9 (62,80-83,90)*	1,26 (0,84-1,75)
PCL	3,72 (3,35-4,51) */**	779,92 (743,35-802,31) */**	4,025 (3,52-5,71) */**
PCL-RGD	2,16 (1,76-2,56) **/#	318,04 (189,88-347,10) * **/#	16,2 (12,80-16,90) */**/#

Примечание: \* –  $p < 0,03$  различия с показателями А.Маммариа, \*\* –  $p < 0,03$  различия с V.Saphena, # –  $p < 0,05$  различия с показателями PCL графтов

низких (30 мм рт.ст), средних (60 мм рт.ст) и высоких (90 мм рт.ст). При низких показателях пуль-

сового давления комплаентность артерий ниже, чем вен, но выше комплаентности графтов (табл.

2). При среднем пульсовом давлении различия между венами, артериями и графтами уменьшались, а при высоком – нивелировались. В то же время комплаентность PCL, PCL-RGD графтов не различалась, что свидетельствовало об отсутствии влияния модификации RGD-пептидами на

вязко-эластические свойства графтов.

Таким образом, иммобилизация RGD-пептидов приводит к позитивным и негативным изменениям механических свойств сосудистых графтов из PCL, однако не оказывает влияния на комплаентность.

Таблица 2.

**Комплаентность (%/мм.рт.ст.\*10-2) PCL, PCL-RGD графтов и нативных сосудов**

Вид материала	С при 30 мм рт.ст.	С при 60 мм рт.ст.	С при 90 мм рт.ст.
A.Mammaria	18,3±12,8	8,9±7,3	3,5±1,1
V.Saphena	24,2±13,1	3,4±0,9	2,1±1,0
PCL	6,1±5,2	4,7±3,6	2,8±2,1
PCL-RGD	6,4±5,5	4,2±3,1	3,2±1,2

Для оценки влияния RGD-пептидов на проходимость графтов, эндотелизацию и процесс формирования сосудистой стенки использовали экспериментальную модель с протезированием брюшной аорты крысы [10]. В опытной и контрольной группах не отмечено смерти крыс от раннего тромбоза: животные дожили до положенного срока выведения из эксперимента, а имплантированные графты оставались проходимы.

Через 1 месяц имплантации внутренний просвет 100% PCL-RGD графтов оставался полностью проходим, тогда как в просвете 50% немодифицированных графтов выявлены пристеночные тромбы, перекрывавшие большую часть просвета графтов (рис. 4, табл. 3). В стенке

половины немодифицированных графтов вне зависимости от наличия или отсутствия в просвете пристеночного тромба выявлено воспаление по типу гранулематозного: большое количество гигантских многоядерных клеток инородного тела, макрофаги, фибробласты. В проходимых немодифицированных графтах на внутренней поверхности формировалась тонкая неоинтима в форме полулуния. Эндотелиоподобные клетки расположены на неоинтима единично и в группах. Клеточность стенок графтов умеренная, более выраженная в наружных 2/3. Гранулематозного воспаления не выявлено. В немодифицированных графтах с тромбом неоинтима отсутствовала.

Таблица 3.

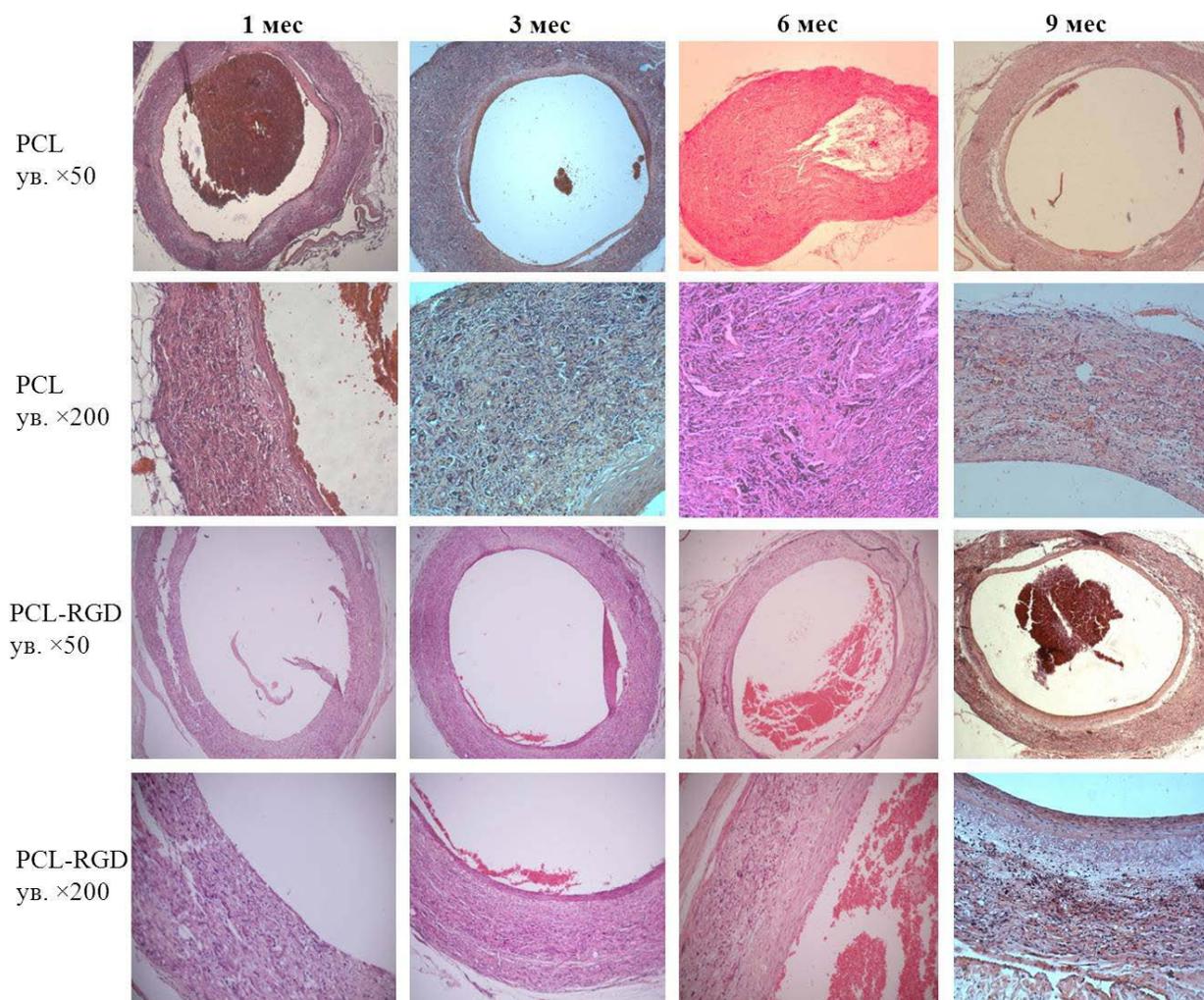
**Относительное количество проходимых графтов в группах на различных сроках имплантации**

Вид графта	% проходимых графтов			
	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
PCL	50	25	50	50
PCL-RGD	100	75	100	100

Через 3 месяца имплантации пристеночные тромбы обнаружены в 75% PCL и 25% PCL-RGD графтах (рис. 4, табл. 3). На фоне наличия тромба в просвете графтов неоинтима и эндотелиальный слой не формировались. В проходимых графтах на внутренней поверхности сформирована тонкая неоинтимальная выстилка, покрытая непрерывным слоем вытянутых эндотелиоподобных клеток в модифицированных графтах и группами клеток в немодифицированных. Вне зависимости от наличия или отсутствия тромба в просвете графтов гранулематозное воспаление

в стенке отмечено в 50% PCL и 25% PCL-RGD графтов.

Спустя 6 месяцев имплантации просвет 50% PCL графтов и 100% PCL-RGD графтов был свободен от тромбов, выстлан тонкой неоинтимой, покрытой монослоем эндотелиальных клеток, в модифицированных графтах и прерывистым слоем – в немодифицированных (рис. 4, табл. 3). Соответственно большая часть просвета 50% PCL – графтов была занята пристеночным реканализированным тромбом. Клеточность стенок 75% PCL графтов очень высокая за счет грануле-



**Рисунок 4. Результаты гистологического исследования explантированных PCL и PCL-RGD графтов: окраска гематоксилин-эозин**

матозного воспаления, которое в 25% привело к выраженной гипертрофии стенки графта. В PCL-RGD графтах гранулематозного воспаления не выявлено: стенка графтов равномерно заселена клетками, представленными фибробластами, макрофагами и единичными гигантскими многоядерными клетками инородного тела.

Через 9 месяцев имплантации 50% PCL графтов были полностью проходими, на внутренней поверхности отмечено формирование тонкой неоинтимы, покрытой слоем эндотелиоподобных клеток (рис. 4, табл. 3). В оставшейся половине PCL графтов обнаружены пристеночные организованные реканализированные тромбы, практически полностью перекрывавшие просвет данных графтов. Через 9 месяцев имплантации проходимость PCL-RGD графтов по-прежнему составила 100%. Внутренняя поверхность графтов выстлана тонкой неоинтимой, покрытой

слоем эндотелиоподобных клеток. Клеточные элементы в стенке немодифицированных и модифицированных графтов распределены равномерно и представлены фибробластами, макрофагами и единичными клетками инородных тел. Гранулематозного воспаления не выявлено.

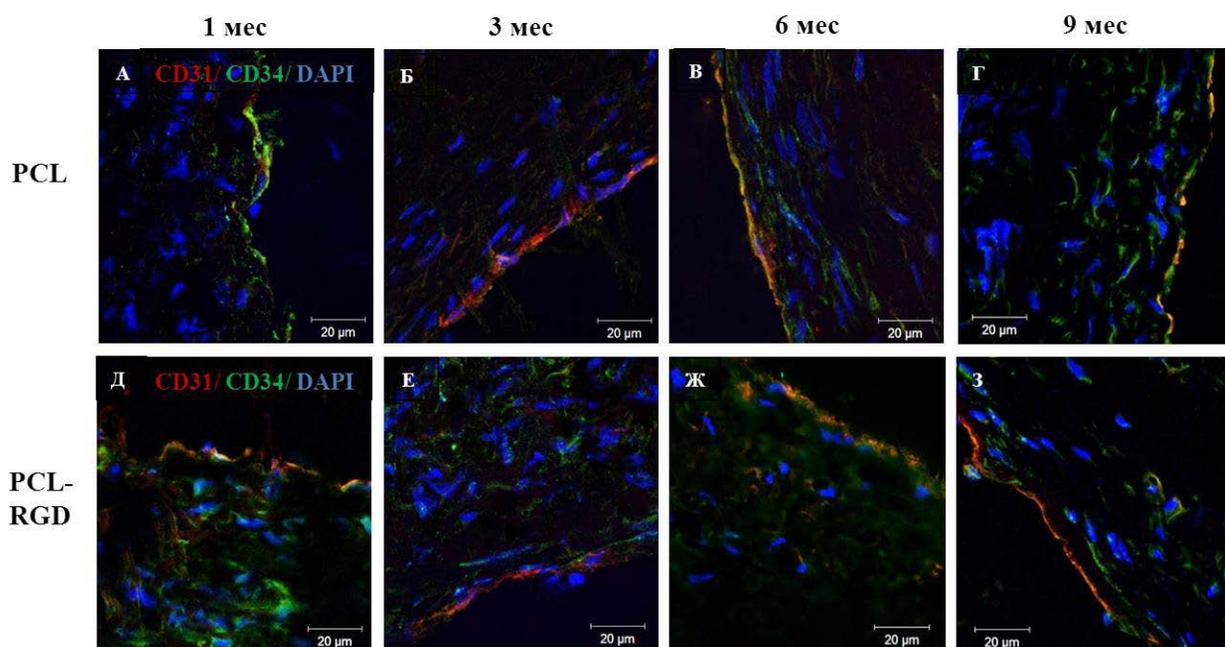
Пройодимость модифицированных RGD-пептидами графтов на всех сроках имплантации была в среднем на 50% выше по сравнению с немодифицированными, а частота развития гранулематозного воспаления в среднем в 2 раза меньше.

Для подтверждения эндотелиальной дифференцировки выстилающих внутреннюю поверхность графтов клеток и выяснения природы их источника было проведено флуоресцентное окрашивание поверхностных рецепторов CD34 и CD31. Выбор данных маркеров связан с тем, что на мембране циркулирующих в перифериче-

ской крови EPC присутствует CD34, после адгезии EPC и в процессе дифференцировки в зрелые эндотелиальные клетки экспрессия CD34 снижается и исчезает, параллельно с этим процессом появляется и повышается экспрессия рецепторов CD31 [11]. В исследовании CD31 являлся маркером эндотелиальных клеток на внутренней стенке имплантированных графтов, сочетание CD31 с CD34 выявляло степень зрелости EPC, докраска ядер клеток DAPI позволяла исключить из анализа тромбоциты. Проанализированы все участки имплантированных сосуди-

стых графтов, однако представлены результаты окраски средней части (средняя относительно анастомозов), поскольку именно этот участок характеризует привлечение EPC из кровотока и менее подвержен трансмиграции эндотелиальных клеток из зоны анастомозов (рис. 5).

В просвете средней части PCL графтов спустя 1 месяц имплантации зарегистрированы клетки с высокой экспрессией CD34 и слабой CD31, что характерно для начальной дифференцировки EPC в эндотелиальные клетки (рис. 5 А). В этот же срок имплантации внутренняя стенка



**Рисунок 5. Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. В данном рисунке и далее PCL-графты (А-Г); PCL-RGD-графты (Д-З). Окраска CD31 красная, CD34 зеленая, ядра синие (ув. ×630)**

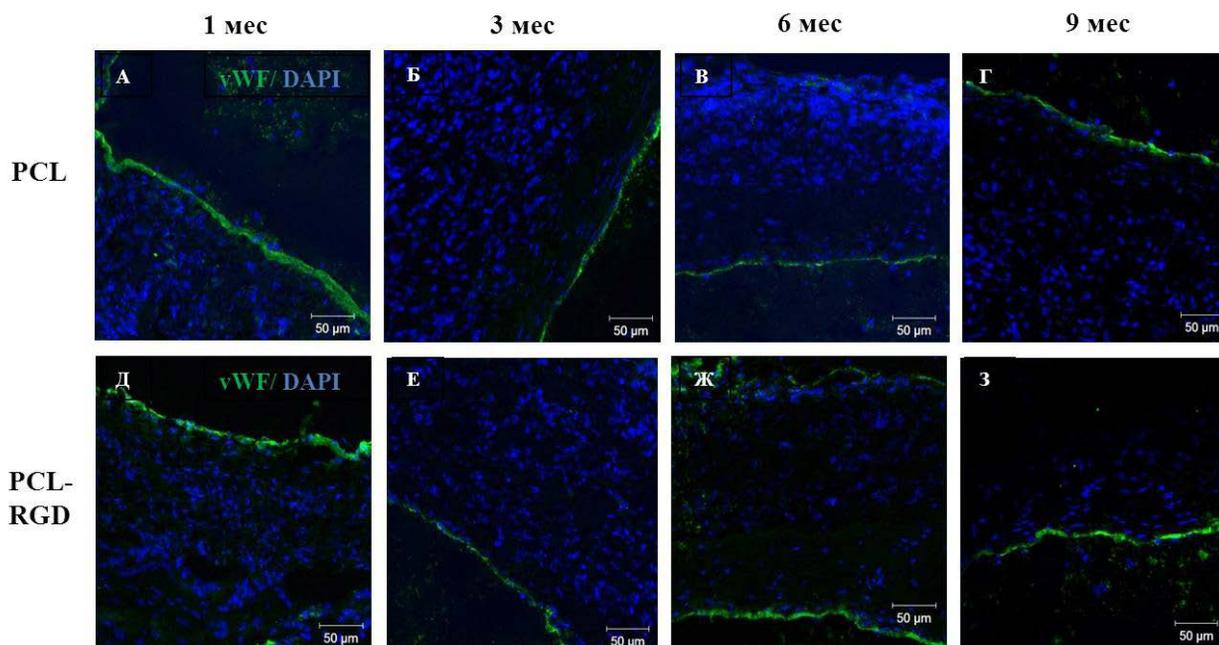
PCL-RGD графтов выстлана клетками с умеренной экспрессией CD31 и CD34, характерной для более зрелых эндотелиальных клеток (рис. 5 Д). Через 3, 6, 9 месяцев имплантации в просвете проходимых PCL и PCL-RGD графтов определяли клетки CD31+, соответствующие зрелым эндотелиальным (рис. 5 Б-Г, Е-З).

В случае наличия тромба в просвете графтов на любых сроках имплантации клетки CD34+ и CD31+ отсутствовали на поверхности графтов, но выявлены в rekanализированных участках тромба. Эндотелиальные клетки участвуют в гемостазе и постоянно синтезируют фактор фон Виллебранда (vWF), поэтому присутствие vWF является не только маркером эндотелиальных клеток на поверхности графтов, но и их функци-

ональной активности. На всех сроках имплантации в просвете графтов визуализировался vWF (рис. 6), что свидетельствует об удовлетворительной функциональности выстилающего просвет эндотелиального слоя.

Коллаген IV типа является важным компонентом базальной мембраны сосудов и определяет адгезию эндотелиоцитов, их подвижность и стабилизацию. Во всех имплантированных на различные сроки PCL и PCL-RGD графтов на внутренней поверхности присутствовал коллаген IV типа, который располагался достаточно равномерно (рис. 7). Значимых визуальных отличий в группах на разных сроках не зарегистрировано.

Коллаген I типа составляет основу соединительной ткани. В аорте располагается преиму-



**Рисунок 6.** Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. vWF зеленая окраска, ядра синие (ув.  $\times 200$ )

щественно в адвентиции, но некоторое количество присутствует в меди и интиме [12], (рис. 7 И). В эксплантированных графтах коллаген I типа слабо и непостоянно представлен в срединной части, при этом в данном спектре отмечена умеренная автофлуоресценция самого матрикса (рис. 7 Б, В, Е, Ж). Коллаген I типа присутствовал в адвентиции всех графтов.

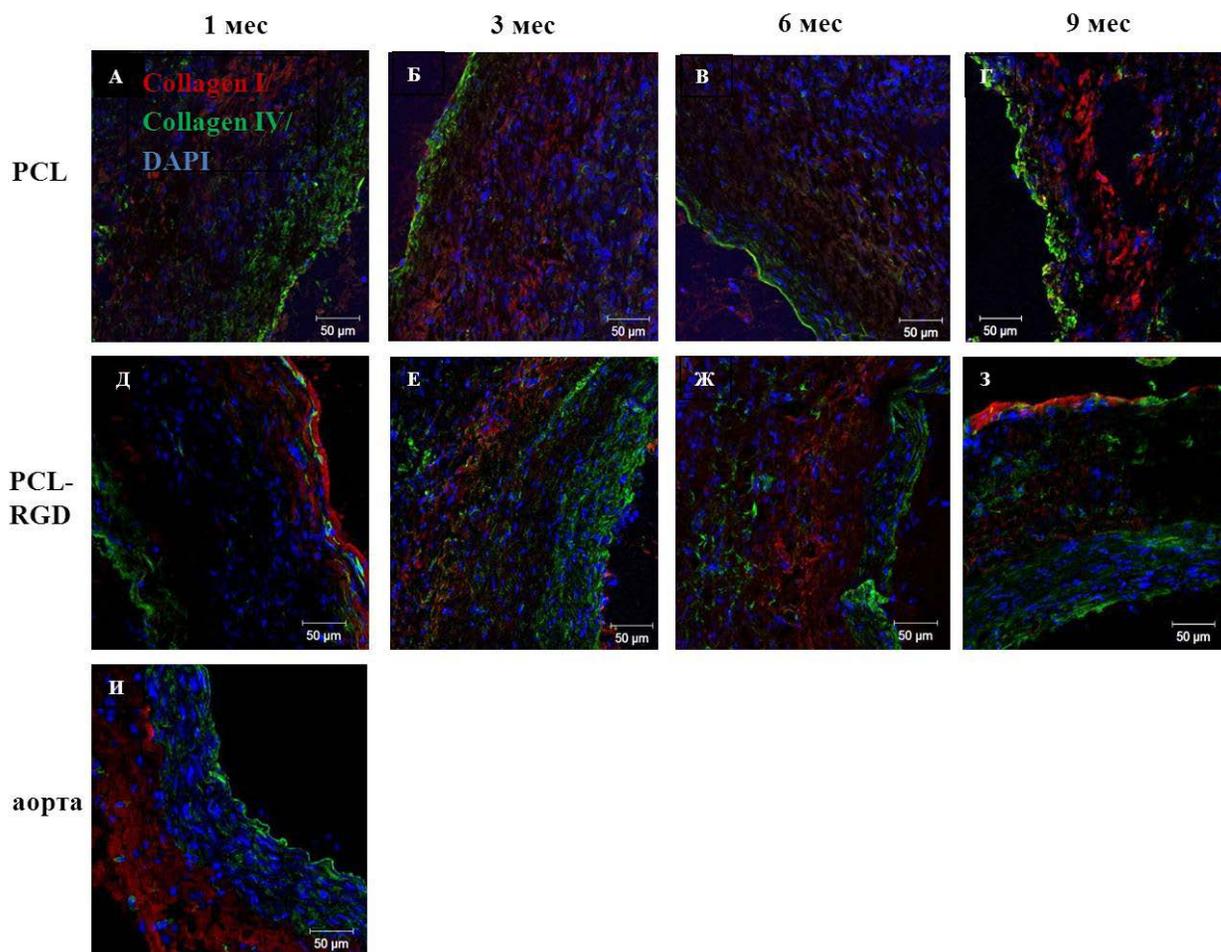
### Обсуждение

Для иммобилизации различных пептидов к поверхности полимеров используют агрессивные химические реагенты, которые могут существенно повлиять на структуру и физико-механические свойства полимерного волокна. Выбранный метод карбодиимидного связывания для модификации RGD-пептидами графтов на основе PCL, полученных методом электроспиннинга, позволил сохранить структуру, при этом вызвал положительные (снижение гиперэластичности) и отрицательные (повышение жесткости) изменения механических характеристик. Для сосудистых протезов комплаентность является крайне важным показателем, в котором находят отражение механические свойства, в частности жесткость конструкции. В нашем исследовании изменения механических свойств модифицированных графтов не оказали влияния на комплаентность, что

является критерием отсутствия значимых негативных последствий модификации.

Местная реакция организма на имплантацию определяется многими факторами: химическими, физическими и биосовместимыми свойствами материала, из которого изготовлено изделие; вектором действия модифицирующего агента; особенностями зоны локации изделия в организме. Поликапролактон, из которого изготовлены графты, представляет собой гидрофобный полимер с высокой молекулярной массой, провоцирующий данными своими качествами усиленную работу моноцитарно-макрофагальной системы, направленную на фагоцитоз и расщепление PCL [13]. Длительная и непродуктивная работа макрофагов в этом направлении приводит к появлению большого количества гигантских многоядерных клеток инородного тела, представляющих собой не что иное, как объединение нескольких функционально активных тканевых макрофагов. Длительное персистирующее воздействие чужеродного материала на фоне неэффективного фагоцитоза данного материала способно провоцировать развитие хронического гранулематозного воспаления [14].

Особенностью тканевой реакции на имплантацию и последующую биорезорбцию полимерных немодифицированных графтов из PCL явилось развитие хронического гранулематозного



**Рисунок 7. Фотографии срезов проходимых сосудистых графтов различных сроков имплантации. Окраска коллаген I – красный, коллаген IV – зеленый, ядра синие (ув. ×200)**

воспаления в стенке графтов в половине и более случаев (в зависимости от срока имплантации). На фоне воспаления стенка графтов утолщалась, а среди клеточных элементов преобладали макрофаги и большое количество гигантских клеток инородного тела. В некоторых случаях выраженность гранулематозного воспаления приводила к сужению просвета графтов до щелевидного, препятствовала формированию в стенке графтов полноценной новообразованной ткани, что в последующем неизбежно приведет к процессам склерозирования и не позволит сформировать нормальные сосудистые слои (интима, медиа, адвентиция) и их клеточное наполнение. Модификация поверхности PCL графтов RGD-пептидами в среднем в 2 раза снизила частоту развития гранулематозного воспаления в стенке графтов, что может быть связано с повышением биосовместимости поверхности модифицированных сосудистых графтов за счет наличия сайтов для связывания с интегриновыми

рецепторами клеток, участвующих в формировании здоровой новообразованной ткани [15].

Модификация RGD-пептидами способствовала увеличению проходимости графтов в среднем на 50%, что, в определенной мере, связано с повышением скорости заселения графтов ЕРС и их дифференцировки в зрелые, функционально активные эндотелиальные клетки. Гемопоетическое происхождение клеток, покрывающих внутреннюю поверхность средней части всех видов графтов, имплантированных сроком на 1 месяц, подтверждает высокая и умеренная экспрессия на мембране CD34. Через 1 месяц имплантации на внутренней поверхности немодифицированных графтов присутствовали незрелые ЕРС клетки CD31–CD34+vWF+, в то же время на поверхности PCL-RGD графтов клетки отличались более зрелым фенотипом CD31+, CD34+, vWF+.

Эндотелиальные клетки синтезируют различные белки ЕСМ, такие как ламинин, фибро-

нектин, коллаген IV типа [16]. По литературным данным, уровень продукции эндотелиальными клетками коллагена IV типа и vWF характеризует их ангиогенную активность [17, 18], поскольку последовательные стадии ангиогенного каскада зависят от возрастающей секреции коллагена типа IV, а vWF повышает выработку ангиогенных факторов. Поэтому синтез коллагена IV типа и vWF клетками вновь образованного эндотелиального слоя является показателем не только удовлетворительной функциональной активности, но и высокого ангиогенного потенциала.

Таким образом, модификация RGD-пептидами не оказывает значимых негативных последствий на физико-механические свойства сосудистых графтов из поликапролактона, способствует активному привлечению эндотелиальных и прогениторных клеток к внутренней поверхности полимерных графтов, раннему формированию функционально состоятельного эндотелиального монослоя, что отражается в повышении проходимости графтов, а так же способствует формированию полноценной ткани *de novo* на основе биodeградируемых трубчатых каркасов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Kurobe H., Maxfield M.W., Breuer C.K., Shinoka T. Concise review: tissue engineered vascular grafts for cardiac surgery: past, present and future. *Stem Cells Trans Med.* 2012; 1(7): 566-571
2. Hoenig M.R., Campbell G.R., Campbell J.H. Vascular grafts and the endothelium. *Endot.* 2006; 13: 385-401
3. Li S., Sengupta D., Chien S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2014; 6(1): 61-76
4. Матвеева В.Г., Антонова Л.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Пептидные последовательности, имитирующие внеклеточный матрикс, – перспективный способ биофункционализации сердечно-сосудистых имплантатов. *Молекулярная медицина*, 2016;14(6): 19-26.  
Matveyeva V.G., Antonova L.V., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Peptidnyye posledovatel'nosti, imitiruyushchiye vnekletochnyy matriks – perspektivnyy sposob biofunktsionalizatsii serdechno-sosudistyx implantatov. *Molekulyarnaya meditsina*, 2016;14(6): 19-26 (In Russ.)
5. Antonova L.V., Seifalian A.M., Kutikhin A.G., Sevostyanova V.V. et al. Bioabsorbable bypass grafts biofunctionalised with RGD have enhanced biophysical properties and endothelialisation tested in vivo. *Frontiers in Pharmacology.* 2016; 7(136): 1-10. Doi: 10.3389/fphar.2016.00136
6. Matveeva V.G., Seifalian A.M., Antonova L.V., Velikanova E.A. et al. Biofunctionalization of polycaprolactone scaffolds with RGD peptides for the better cells integration. *AIP Conference Proceedings.* 2016; 1760: 020048-1- 020048-5. doi: 10.1063/1.4960267
7. Zhang H., Hollister S. Comparison of bone marrow stromal cell behaviors on poly(caprolactone) with or without surface modification: studies on cell adhesion, survival and proliferation. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2009; 20(14): 1975-1993
8. Sedaghati T., Jell G., Seifalian A. Investigation of Schwann cell behaviour on RGD-functionalised bioabsorbable nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *N Biotechnol.* 2014; 31(3): 203-213
9. Антонова Л. В., Матвеева В. Г., Барбараш Л. С. Использование метода электроспиннинга в создании биodeградируемых сосудистых графтов малого диаметра: Проблемы и решения (обзор). *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2015; 3: 12-22.  
Antonova L.V., Matveeva V.G., Barbarash L.S. Electrospinning and biodegradable small-diameter vascular grafts: problems and solutions (review). *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2015;(3):12-22. (In Russ.) DOI:10.17802/2306-1278-2015-3-12-22
10. Swartz D.D., Andreadis S.T. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24(5): 916-925
11. Hager G., Holnthoner W., Wolbank S., Husa A.M., et al. Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material. *Cytotherapy.* 2013; 15(11): 1426-1435. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.018
12. Panagiotis Berillis. The Role of Collagen in the Aorta's Structure. *The Open Circulation and Vascular J.* 2013; 6: 1-8
13. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксикапролактонатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии. *Бюллетень сибирской медицины.* 2012; 1: 128-134.  
Antonova L.V., Nasonova M.V.,

Kudryavtseva Y.A., Golovkin A.S. Potential for polyhydroxyalkanoates and polycaprolactone copolymer use as tissue-engineered scaffolds in cardiovascular surgery. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2012;11(1):128-134. (In Russ.) DOI:10.20538/1682-0363-2012-1-128-134

14. Струков А.И., Кауфман О.Я. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. Москва. Медицина. 1989. 184 с.

Strukov A.I., Kaufman, O.YA. Granulematoznoye vospaleniye i granulematoznyye bolezni. Moskva. Meditsina. 1989. 184 s.

15. Stupack D. G. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1021–1030. doi:10.1038/sj.cdd.4401658

16. Anderson D.E., Hinds M.T. Extracellular

matrix production and regulation in micropatterned endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 427(1): 159-164. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.034

17. Bahramsoltani M., Slosarek I., De Spiegelaere W., Plendl J. Angiogenesis and collagen type IV expression in different endothelial cell culture systems. *Anat Histol Embryol*. 2014; 43(2): 103-115. doi: 10.1111/ahe.12052

18. Zanetta L., Marcus S.G., Vasile J., Dobryansky M. et al. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2000; 85(2): 281-288

*Статья поступила 29.06.2017*

*Для корреспонденции:*

**Антонова Лариса Валерьевна**

Адрес: 650002, г. Кемерово,

Сосновый бульвар, д. 6

Тел. +7 (3842) 64-38-02,

E-mail: antolv@kemcardio.ru

*For correspondence:*

**Antonova Larisa**

Address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, 650002,

Russian Federation

Тел. +7 (3842) 64-38-02,

E-mail: antolv@kemcardio.ru