

УДК 616.132-007.272-089

Л.О. Бокерия,

д.м.н., академик РАН, профессор, директор НЦССХ им. А.Н. Бакулева

Н.А. Чигогидзе,

к.м.н., заведующий отделением РХЭФМИЛиАНТ НЦССХ им. А.Н. Бакулева

И.Д. Схиртладзе,

научный сотрудник отделения РХЭФМИЛиАНТ НЦССХ им. А.Н. Бакулева

М.В. Мурадян,

научный сотрудник отделения РХЭФМИЛиАНТ НЦССХ им. А.Н. Бакулева

Н.Т. Одишария,

научный сотрудник отдела экспериментальных исследований НЦССХ им. А.Н. Бакулева

М.М. Тхагапсова,

аспирант отделения РХЭФМИЛиАНТ НЦССХ им. А.Н. Бакулева

L.O. Bockeria,

MD, academician of RAS, prof., director of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

N.A. Chigogidze,

PhD, head of the department of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

I.D. Skhirtladze,

researcher of the department of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

M.V. Muradyan,

researcher of the department of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

N.T. Odishariya,

researcher at the Department of experimental research of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

M.M. Tkhagapsova,

post-graduate of the department of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОККЛЮЗИОННЫХ ПОРАЖЕНИЙ СОСУДОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

RESULTS OF APPLICATION FOR THE TREATMENT OF BIOENGINEERING CONSTRUCTION FOR OCCLUSIVE VASCULAR DISEASES IN ANIMAL EXPERIMENTS

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Ираклий Давидович Схиртладзе, научный сотрудник отделения РХЭФМИЛиАНТ
Адрес: 119049, г. Москва, Ленинский пр-кт, д. 8, корп. 7
Телефон: 8 (499) 236-91-87
E-mail: irakli-skhirtladze@yandex.ru
Статья поступила в редакцию: 15.04.2015
Статья принята к печати: 25.04.2015

CONTACT INFORMATION:

Irakly Davidovich Skhirtladze, researcher of the department of the Scientific Center for Cardiovascular Surgery named after A.N. Bakulev
Address: 8/7 Leninsky ave., Moscow, 119049
Tel.: 8 (499) 236-91-87
E-mail: irakli-skhirtladze@yandex.ru
The article received: 15.04.2015
The article approved for publication: 25.04.2015

Аннотация. Цель исследования: изучить результаты применения в эксперименте на животных разработанной нами биоинженерной конструкции для лечения окклюзионных поражений сосудов. *Материалы и методы исследования:* биоинженерная конструкция представляет собой стент, в ребрах жесткости которого дополнительно предусмотрен, по меньшей мере, один резервуар с фиксированной в нем живой культурой клеток и питательной средой. Конструкция стента защищает живую культуру клеток от механического повреждения и позволяет сохранить данную культуру как до имплантации стента, так и после нее. Имплантация стентов подопытным животным (9 беспородных собак) выполнялась под внутривенным наркозом (тиопентал Na из расчета около 1 мг/кг веса), а также однократно внутриартериально вводили 0.2 мл 1%-го раствора гепарина. В семи экспериментах через 70 дней после проведения операций проводили повторную селективную ангиографию для оценки проходимости стентов, покрытых культивированными фибробла-

стами. Было отмечено хорошее позиционирование стентов без видимой деформации артерий и тромбозов дистального русла, при этом в течение 70 дней ни одна из собак не получала дезагрегационную или иную терапию. В двух экспериментах через 2 года после имплантации биоинженерной конструкции при ротационной аортографии с 3D-реконструкцией почечные артерии также проходимы, позиционирование стентов адекватное, признаков тромбоза дистального русла не выявлено. Дезагрегационная терапия этим двум животным в течение двух лет также не проводилась. После проведения ангиографии все экспериментальные животные были усыплены и у всех посмертно были забраны участки аорт с почечными артериями и почками. В просветах почечных артерий участки в местах установки стентов были эндотелизированы ровным слоем, на разрезе отчетливо представляется расположение ячеек стента относительно толщины стенки сосуда. Продольный разрез также подтверждает однородность эндотелизации просвета почечной артерии. Наблюдается гладкая блестящая поверхность эндотелия без видимых дефектов или кровоизлияний. *Заключение:* стенты, покрытые культивированными фибробластами, обладают рядом свойств, которые обеспечивают их преимущества перед известными изделиями, а в частности: хорошо фиксируют биоматериал; исходно не тромбогенны; стимулируют быструю и равномерную эндотелизацию стентированного участка сосуда; не приводят к рестенозам, т.к. не провоцируют воспалительных реакций в месте имплантации.

Annotation. *Objective:* study of the application in experimental use of bioengineering construction for the treatment of occlusive vascular diseases. *Materials and methods:* bioengineering construction is a stent, in which the stiffeners further provided with at least one fixed reservoir therein living culture cells and culture medium. Bioengineering structure is a stent, in which the stiffeners further provided with at least one fixed reservoir therein living culture cells and culture medium. A stent implantation in experimental animals (9 mongrel dogs) was performed under intravenous anesthesia. In seven experiments, 70 days after the operation was carried out repeated selective angiography to assess the patency of stents coated with cultured fibroblasts. In two experiments 2 years after implantation bioengineering construction with rotary aortography with 3D-reconstruction of the renal arteries is also passable, adequate positioning of the stent, evidence of thrombosis of the distal bed is not revealed. Disaggregation treatment in these two animals for two years and was not performed. All experimental animals underwent angiography and were euthanized. The aortal parts with the renal arteries and kidneys were got after autopsy. The stented parts of renal arteries were endothelialized even layer. On a section, we could clearly see location of the stent cells relative to the vessel wall thickness. *Conclusion:* Stents coated with cultured fibroblasts, have several properties that provide them advantages over the known products, and in particular: good fix biomaterial; initially not thrombogenic; stimulate rapid and uniform endothelialization of the stented portion of the vessel; do not lead to restenosis, as do not provoke inflammatory reactions at the implantation site.

Ключевые слова. Каркас, стент, биополимерное покрытие, культивированные фибробласты.

Keywords. Frame, stent, biopolymer coating, cultured fibroblasts.

ВВЕДЕНИЕ

В структуре смертности населения экономически развитых стран продолжают лидировать болезни системы кровообращения, в особенности ишемическая болезнь сердца (ИБС). В нашей стране на долю болезней системы кровообращения среди всех случаев смертности составляет 57,1% (835,5 случаев на 100 000 населения), на долю ИБС при этом приходится 28,9% (422,4 случая на 100 000 населения) [1].

Несмотря на широкое внедрение чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ), клиническое применение технологии до настоящего времени опережает понимание механизмов действия баллонной дилатации и стентирования просвета сосуда [2]. При этом основным недостатком как транслюминальной баллонной ангиопластики (ТЛБАП), так и стентирования является процесс рестенозирования.

Рестеноз представляет собой многокомпонентный механизм, сочетающий стимуляцию факторов роста, пролиферацию с миграцией к интима гладкомышечных клеток и чрезмерной продукцией внеклеточного матрикса, пристеночное тромбообразование и эластическое ремоделирование сосудистой стенки [3-5].

Многогранность и сложность процесса рестенозирования стимулирует развитие индустрии изготовления стентов, способных уменьшить частоту осложнений после ЧКВ, особенно при окклюзирующих поражениях сосудов, которые выявляются у 20-30% больных ИБС и относятся к наиболее сложным формам поражения коронарного русла [6-11]. Это обуславливает поиск новых технологий для улучшения отдаленных клинических результатов после эндоваскулярного лечения.

Тенденция развития эндоваскулярного лечения ИБС многогранна. На сегодняшний день уже существуют стенты третьего поколения с биодеградируемым полимером на основе молочной кислоты. Проведенные рандомизированные исследования с 9-ти месячным отдаленным периодом продемонстриро Таким образом, создание стентов, несущих на себе антипролиферативные вещества, способные замедлить или остановить воспаление и рост неоинтимы позволит достигнуть оптимальных результатов реваскуляризации миокарда. Целью нашего исследования стало изучение результатов применения в эксперименте на животных разработанной нами биоинженерной конструкции для лечения окклюзионных поражений сосудов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанная биоинженерная конструкция содержит каркас и фиксированную к нему живую культуру клеток. При этом каркас биоинженерной конструкции может быть выполнен либо из металла, либо из полимерного материала. В одном из наиболее предпочтительных вариантов изобретения, каркас биоинженерной конструкции может быть выполнен в виде стента, в ребрах жесткости которого предусмотрены лунки с фиксированной культурой клеток. В соответствии с изобретением, живая культура клеток может быть фиксирована к каркасу при помощи биополимерного покрытия, которое выбрано, без ограничения перечисленным, из коллагенового, полилизинового или фибринового покрытия. Вышеупомянутая живая культура клеток предпочтительно включает аутогенные или аллогенные клетки, которые могут представлять собой фибробласты или мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

При изготовлении биоинженерной конструкции можно выделить такие этапы, как [14]:

- выделение первичной культуры фибробластов из ткани донора и накопление биомассы клеточного материала;
- покрытие стента раствором коллагена и культивированными фибробластами кожи человека;
- инкубация стента, покрытого культивированными фибробластами, в среде культивирования;

Нанесение культуры клеток на биополимерное покрытие в предпочтительных вариантах изготовления изобретения осуществляется посредством инкубации каркаса с биополимерным покрытием в среде культивирования с культурой клеток.

Биоинженерная конструкция в контексте изобретения представляет собой конструкцию, выполненную из металла или полимерного материала, несущая не только опорную функцию, но и функцию доставки и жизненного обеспечения живой



Рис. 1. Культура фибробластов (указаны стрелками) на 3-и сутки культивирования. Микрофотография. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. об. 100, ок. 10

культуры клеток, трансплантируемых, например, в сосуды.

В частности, биоинженерная конструкция, представляет собой стент, в ребрах жесткости которого дополнительно предусмотрен, по меньшей мере, один резервуар с фиксированной в нем живой культурой клеток и питательной средой (рис. 1). Конструкция стента защищает живую культуру клеток от механического повреждения и позволяет сохранить данную культуру как до имплантации стента, так и после нее.

Имплантация стентов (рис. 2) подопытным животным (9 беспородных собак) выполнялась под внутривенным наркозом (тиопентал Na из расчета около 1 мг/кг веса), а также однократно внутриартериально вводили 0.2 мл 1%-го раствора гепарина.

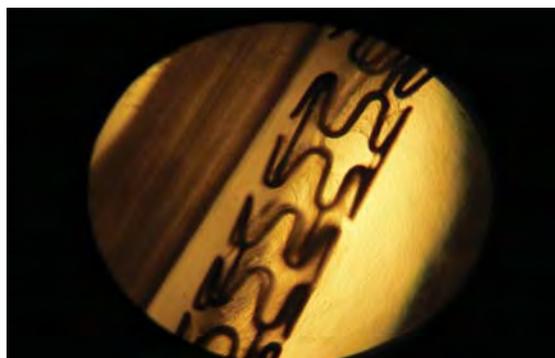


Рис. 2. Вид стента, покрытого культивированными фибробластами. Микрофотография. Ув. об. 5, ок. 10

Фиксацию стента, покрытого культивированными фибробластами, производили в стерильной рентген-операционной путем обжатия его на коронарном баллонном катетере размером 3,5*15 мм, в соответствии с данными селективной ангиографии почечной артерии экспериментального животного. Измерению подвергали проксимальные участки почечной артерии как слева, так и справа. Под рентгеноскопическим контролем по методике Сельдингера через бедренную артерию справа устанавливали артериальный интродьюсер (5F), через который проводили проводниковый катетер к устью правой почечной артерии, далее вводили коронарный проводник 0,014" в почечную артерию и через гемостатический клапан по проводнику проводили фиксированный на баллоне стент, покрытый культивированными фибробластами. Стент выводили за пределы просвета проводникового катетера и раскрывали на максимальном давлении в баллонном катетере 8 атм. в проксимальных сегментах почечных артерий. Баллонный катетер удаляли и производили ангиографический контроль проходимости артерии. Таким образом, были установлены стенты в шести экспериментах в правые почечные артерии, а в трех – в левую и правую почечные артерии (рис. 3а).



Рис. 3. Аортография (передне-задняя проекция):
Положение имплантированных стентов в почечных артериях:
 а) непосредственно после имплантации;
 б) через 70 дней после имплантации

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В семи экспериментах через 70 дней после проведения операций проводили повторную селективную ангиографию для оценки проходимости стентов, покрытых культивированными фибро-



Рис. 4. Ротационная аортография с 3D-реконструкцией: правая и левая почечные артерии проходимы, позиционирование стентов адекватное, без признаков тромбоза дистального русла

бластами (рис. 3б). Было отмечено хорошее позиционирование стентов без видимой деформации артерий и тромбозов дистального русла, при этом в течение 70 дней ни одна из собак не получала дезагрегационную или иную терапию. Артериальное давление до стентирования составляло в среднем 110/90 мм рт. ст., через 70 дней 110/80 мм рт. ст. В двух экспериментах через 2 года после имплантации биоинженерной конструкции при ротационной аортографии с 3D-реконструкцией почечные артерии также проходимы, позиционирование стентов адекватное, признаков тромбоза дистального русла не выявлено (рис. 4). Дезагрегационная терапия этим двум животным в течение двух лет также не проводилась.

После проведения ангиографии все экспериментальные животные были усыплены и у всех по-смертно были забраны участки аорт с почечными артериями и почками (рис. 5а). В просветах почечных артерий участки в местах установки стентов были эндотелизированы ровным слоем (рис. 5б), на разрезе отчетливо представляется расположение ячеек стента относительно толщины стенки сосуда. Продольный разрез также подтверждает однородность эндотелизации просвета почечной артерии. Наблюдается гладкая блестящая поверхность эндотелия без видимых дефектов или кровоизлияний.

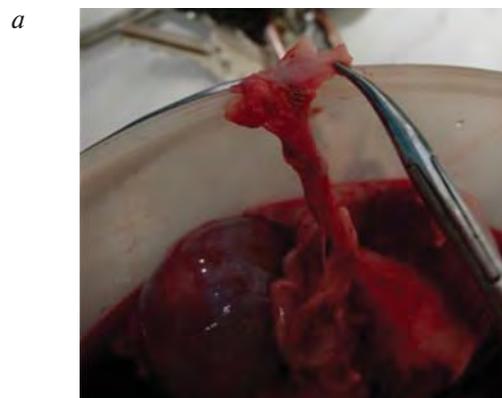


Рис. 5. Фрагмент аорты с почечными артериями, макропрепарат:
 а) участок аорты с почечными артериями и почками;
 б) просвет почечной артерии в месте установки стента

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Абсолютное большинство исследователей в мире считают проблему рестеноза самой актуальной в эндоваскулярном лечении ИБС [15].

Широкое применение стентов показало, что их постоянное присутствие в сосуде является источником тромбоза, хронического воспаления и пролиферации неоинтимы, приводящие к рестенозу. Постоянно присутствующий в сосуде стент ослабляет геометрию сосуда, а полимер, используемый в качестве основы для локальной доставки лекарств, может вызывать раздражение сосуда, эндотелиальную дисфункцию, гиперреактивность сосуда и хроническое воспаление в месте имплантации [16].

Основной целью при разработке описанной нами биоинженерной конструкции было создание эффективного средства для лечения больных, страдающих окклюзионными заболеваниями сосудов.

Основной задачей изобретения является устранение побочных эффектов при стентировании сосудов, сокращение сроков лечения ишемической болезни сердца и сосудов, а также уменьшение смертности от острой сердечно-сосудистой недостаточности.

Проведенные нами эксперименты показали, что стенты, покрытые культивированными фибробластами, обладают рядом свойств, которые обеспечивают их преимущества перед известными изделиями, а в частности: хорошо фиксируют биоматериал; исходно не тромбогенны; стимулируют быструю и равномерную эндотелизацию стентированного участка сосуда; не приводят к рестенозам, т.к. не провоцируют воспалительных реакций в месте имплантации.

Таким образом, у разработанной нами биоинженерной конструкции имеются важные преимущества, которые делают стенты, покрытые культивированными фибробластами, перспективными для дальнейших испытаний и внедрения в клиническую практику.

Следует отметить, что описанные здесь примеры и варианты изобретения являются иллюстративными и не предназначены для ограничения данного изобретения. В пределах настоящего изобретения специалисты различных областей будут иметь возможность вносить изменения и модификации, которые, тем не менее, будут соответствовать сущности изобретения и подпадать под его объем с учетом технических особенностей изготовления.

Кроме того, возможности использования биоинженерной конструкции в перспективе довольно широки: устранение стриктур пищевода, мочеточников, маточных труб, протоков поджелудочных желез, уменьшение угрозы кровотечения при син-

дроме портальной гипертензии, предотвращение неравномерности строения неоинтимы в послеоперационном периоде, а особенно — предотвращение зарастания дистальных анастомозов и неравномерного покрытия неоинтимой длинных сосудистых протезов.

Список литературы

1. Бокерия Л.А., Гудкова Р.Г. Сердечно-сосудистая хирургия — 2008. М. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2009.
[Bockeria L.A., Gudkova R.G. Cardiovascular Surgery — 2008. М. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery. 2009.]
2. Бабунашвили А.М., Иванов В.А. Применение коронарного стентирования в зависимости от клинической картины ИБС и типа атеросклеротического поражения коронарного русла. М. 2000.
[Babunashvili A.M., Ivanov V.A. Application of coronary stenting in the clinical picture of an atherosclerotic coronary heart disease and type of coronary lesion. М. 2000.]
3. Haundenschild C.C. Pathobiology of restenosis after angioplasty // *Am. J. Med.* 1993; 94: 40-44.
4. Holmes D., Fitzgerald P., Goldberg S. et al. The PRESTO (Prevention of restenosis with tranilast and its outcomes) protocol: a double-blind, placebo-controlled trial // *Am. Heart J.* 2000; 139: 23-31.
5. Mintz G.S., Popma J.J., Pichard A.D. et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study // *Circulation.* 1996; 94: 35-43.
6. Бокерия Л.А., Алесян Б.Г. Руководство по рентгенэндоваскулярной хирургии сердца и сосудов. М. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2007.
[Bockeria L.A., Alekyan B.G. Guidelines for endovascular surgery of the heart and blood vessels. М. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery. 2007.]
7. Осиев А.Г. Факторы риска и предикторы успеха чрескожных коронарных вмешательств у больных с хроническими окклюзиями коронарных артерий // *Патология кровообращения и кардиохирургия.* 2004; 4: 4-8.
[Osiev A.G. Risk factors and predictors of success of percutaneous coronary intervention in patients with chronic coronary artery occlusion // *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya.* 2004; 4: 4-8.]
8. Di Mario C., Werner G.S., Sianos G. et al. European perspective in recanalisation of chronic total occlusions (CTO): consensus document from the EuroCTO Club // *Eurointerv.* 2007; 3: 30-43.
9. Grantham J.A., Marso S.P., Spertus J. et al. Chronic total occlusion angioplasty in the United States // *JACC Cardiovasc. Interv.* 2009; 2(6): 479-486.
10. Prasad A., Rihal C.S., Lennon R.J. et al. Trends in outcomes after percutaneous coronary intervention for chronic total occlusions: 25 years experience from the Mayo Clinic // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49(15): 1611-1618.

11. Stone G.W., Kandzari D.E., Mehran R. et al. Percutaneous Recanalisation of Chronically Occluded Coronary Arteries: A Consensus Document: Part I // *Circulation*. 2005; 112: 2364-2372.
 12. Chevalier B. et al. Randomized controlled trial between biolimus-eluted Nobori and paclitaxel-eluted Taxus coronary stents // *Eurointervention*. 2007; 2: 426-434.
 13. Waksman R. Biodegradable Stents: They do their job and disappear // *J. Invasive. Cardiol*. 2006; 18 (2): 70-74.
 14. Схиртладзе И.Д., Мурадян М.В., Тхагапсова М.М., Чигогидзе Н.А. Экспериментальное обоснование применения биоинженерной конструкции для лечения окклюзионных поражений сосудов // *Клиническая физиология кровообращения*. 2014; 2: 48-53.
 15. Beatt K., Serruys P., Rensing B. Restenosis after coronary angioplasty: New standarts of clinical studies // *J. Am. Coll. Cardiol*. 1990; 15(2): 491-498.
 16. Virmani R., Farb A., Guagliumi G., Kolodgie F. Drug-eluting stents: Caution and concerns for long-term outcome // *Coron. Artery Dis*. 2004; 15: 313-318.
- [Skhirtladze I.D., Muradyan M.V., Tkhagapsova M.M., Chigogidze N.A. Experimental justification of the use of bioengineering construction for occlusive vascular diseases treatment // *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrashcheniya*. 2014; 2: 48-53.]