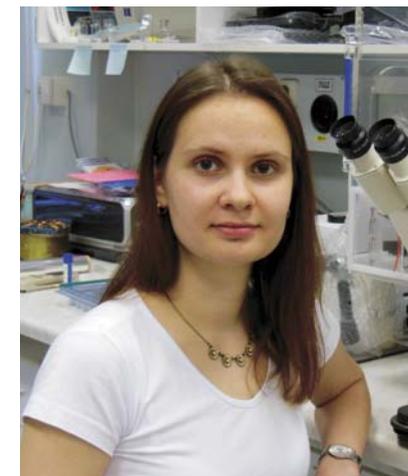
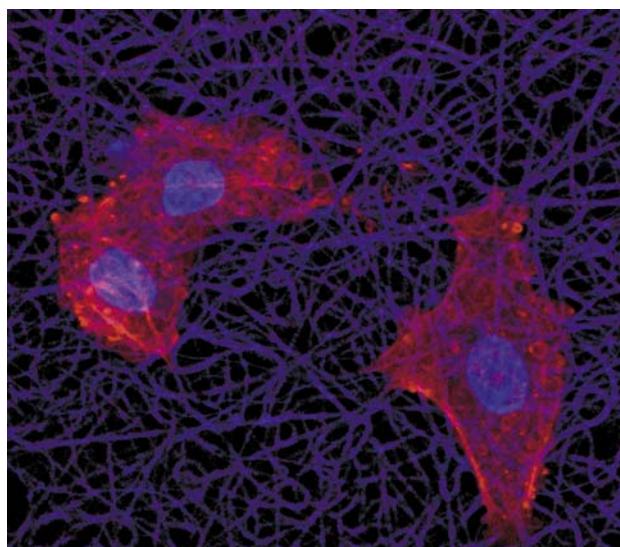


А. О. ЛЕБЕДЕВА, П. П. ЛАКТИОНОВ, В. В. ВЛАСОВ

# ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

## трехмерная «пластика» сосудов



ЛЕБЕДЕВА Алена Олеговна – аспирант, сотрудник лаборатории молекулярной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 3 научных работ



ЛАКТИОНОВ Павел Петрович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 79 научных работ и 15 патентов



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, доктор химических наук, профессор, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 200 научных работ и 9 патентов

*Неблагоприятная экологическая обстановка, малоподвижный образ жизни, несбалансированный рацион питания, стрессы – все эти факторы приводят к росту числа заболеваний кровеносной системы. Для лечения этих болезней зачастую необходима трансплантация – хирургическое вмешательство по замене тканей или даже целых органов. Однако современная медицина бывает не в силах помочь таким больным главным образом из-за нехватки донорского материала, проблемы тканевой совместимости и отсутствия подходящих искусственных протезов. Новые молекулярно-биологические подходы и методы клеточной инженерии позволили вплотную приблизиться к получению искусственных протезов, в том числе полимерных протезов кровеносных сосудов, по своим свойствам практически не отличающихся от природных аналогов*

**Ключевые слова:** электроспиннинг, тканевая инженерия, 3D матрицы, биосовместимые полимеры, нановолокна  
**Key words:** electrospinning, tissue engineering, 3D scaffolds, biocompatible polymers, nanofibers

© А. О. Лебедева, П. П. Лактионов, В. В. Власов, 2013

**Т**рансплантация органов и тканей – одна из насущных проблем современной медицины и, не в последнюю очередь, сосудистой хирургии. Мировая потребность в сосудах малого диаметра для аорто-коронарного шунтирования на сегодня составляет не менее 450 тыс. штук в год, и это не считая протезов для восстановления кровотока в нижних конечностях, аорто-почечного шунтирования и протезирования других артерий небольшого диаметра.

Для трансплантации используются донорские вены, ксенотенные протезы, изготовленные из сосудов животных, и, наконец, трансплантаты из синтетических полимерных материалов. При этом имплантаты природного происхождения имеют ряд существенных недостатков, среди которых проблемы, связанные с иммунологической совместимостью, изменением размеров трансплантата со временем и возможным несовпадением размеров трансплантата и заменяемого органа, а также трудности с получением и хранением донорского материала. Искусственные имплантаты лишены некоторых из этих недостатков и позволяют восстановить кровоток при значительном повреждении сосудов. Однако их применение, в свою очередь, чревато формированием очагов воспаления и стенозами (сужением просвета сосудов).

Имеющиеся на сегодня искусственные сосудистые имплантаты отличаются по механическим свойствам от природных сосудов; кроме того, они плохо интегрируются в ткани пациента и на их внутренней поверхности не формируется нормальный клеточный слой (эндотелий). Такие имплантаты не пригодны для протезирования сосудов малого (менее 6 мм) диаметра. Несмотря на немалый прогресс в создании материалов для протезирования сосудов за последние пятьдесят лет, таких как дакрон или политетрафторэтилен, возможности этих материалов на сегодняшний день практически исчерпаны.

Но «свет в конце тоннеля» виден: бурное развитие биохимических, молекулярно-биологических методов и методов клеточной инженерии позволили вплотную приблизиться к получению почти совершенных протезов органов. Например, в 2010 г. были созданы искусственные трахея и пищевод, состоящие из нескольких типов тканей и практически идентичные соответствующим органам (Curcio *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010). Технология создания таких протезов включает в себя получение трехмерного каркаса органа (скеффолда или матрикса), который затем «заселяют» стволовыми или соответствующими дифференцированными клетками.

Скеффолды могут быть биологического либо синтетического происхождения. В первом случае используют донорский орган, который освобождают от всех клеток так, что от него остается только каркас из белков соединительной ткани – это делается для того, чтобы максимально уменьшить риск иммунологической несовместимости протеза и его будущего хозяина. Затем на таком каркасе «выращиваются» ткани из клеток реципиента (Badylak *et al.*, 2012). Однако у подобных имплантатов остается ряд недостатков, присущих донорским органам, включая риск, пусть и небольшой, иммунологической несовместимости.

Альтернативой могут служить полностью искусственные каркасные структуры, безопасные и обладающие уникальными свойствами благодаря новым композитным материалам и методам их изготовления.

## Электроспиннинг – море возможностей

На сегодня существует несколько методов изготовления трехмерных матриц из полимерных материалов, таких как формование (литье, прессование), фазовая сепарация, трехмерная печать и т. п.

В этом ряду особое положение занимает электроспиннинг – уникальная технология, позволяющая получать из растворов полимеров полимерные волокна толщиной от десятков нанометров до нескольких

Принципиальная схема устройства для электроспиннинга довольно проста. В нее входит источник высокого напряжения, капилляр или фильера – пластина с калиброванным отверстием, устройство для дозированной подачи раствора и коллектор, на котором накапливается полученный материал

### В ПРОТИВОБОРСТВЕ СИЛ

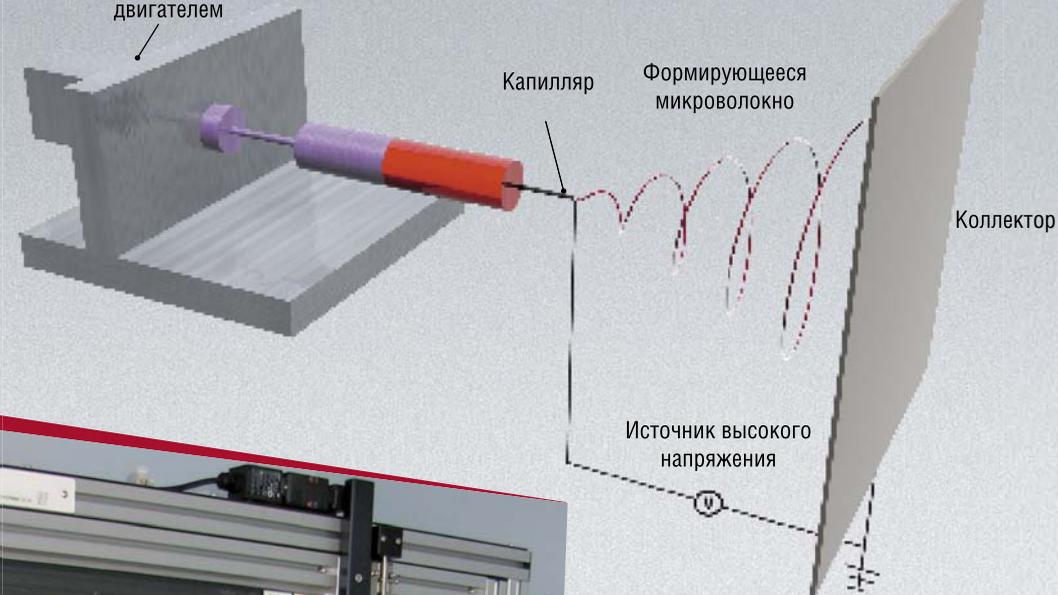
Прародителем метода электроспиннинга является процесс электрогидродинамического распыления жидкостей (электроспрей).

Суть его в том, что капли жидкости (или раствора полимера) истекают из дозирующего капилляра из резервуара, к которому подведено высокое напряжение, в результате чего на поверхности капли жидкости накапливается электрический заряд. Капля формируется в электростатическом поле, вектор которого направлен против силы поверхностного натяжения жидкости. При достаточно высоких значениях силы электрического поля капля начинает вытягиваться, образуя так называемый конус Тейлора. Если значение приложенного заряда на поверхности капли в два раза превысит рэлеевский предел, при котором сила кулоновского расталкивания зарядов на поверхности равна силе поверхностного натяжения, то конус Тейлора деформируется и распадется на множество капель.

После испарения растворителя из капель раствора образуются частицы. В отличие от полученных обычным механическим способом, такие частицы имеют меньший (микро- и нано-) размер, более гомогенны, практически не агрегируют, а их движение и распределение легко контролировать, варьируя напряженность приложенного электростатического поля. Изменяя напряженность поля и концентрацию полимера в растворе, можно получать частицы различного диаметра, а вводя в раствор полимера дополнительные компоненты, модифицировать свойства частиц.

В процессе электроспиннинга конус Тейлора не распадается на частицы, а формирует струю раствора, которая под действием электростатического поля направляется к электроду-коллектору, вытягиваясь и становясь тоньше. За то время, которое требуется струям раствора, чтобы достичь поверхности коллектора, растворитель испаряется, и на коллекторе осаждаются готовые полимерные волокна

Дозирующее устройство с шаговым двигателем



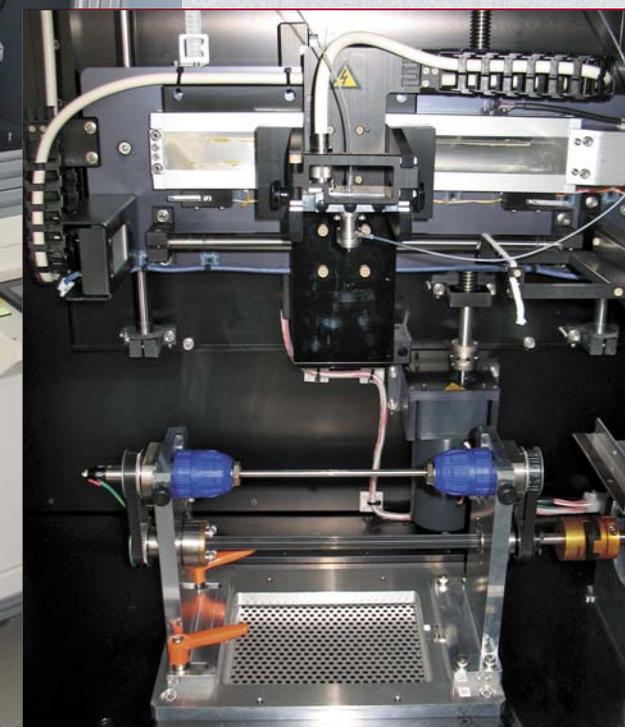
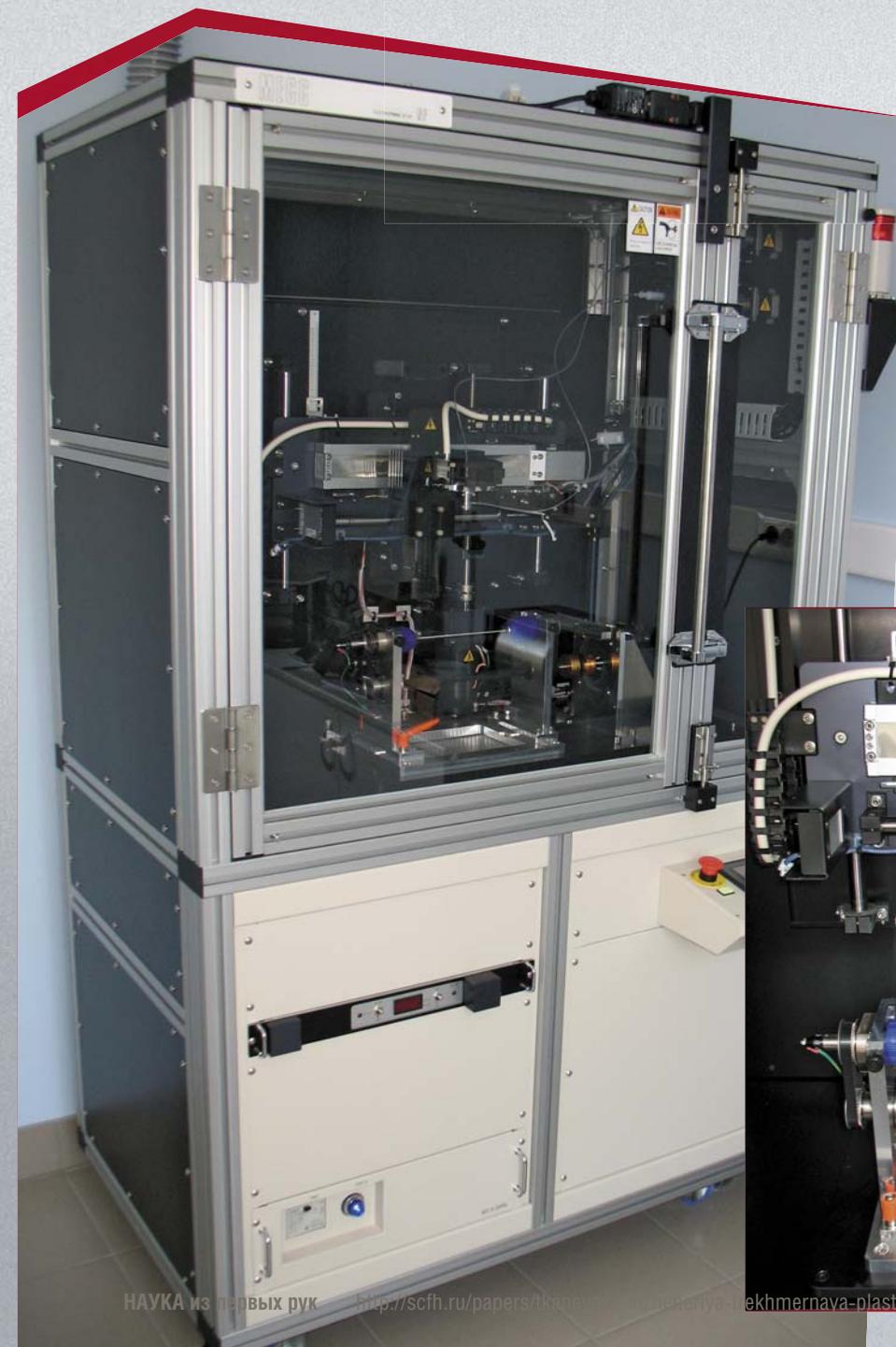
Капилляр

Формирующееся микроволокно

Коллектор

Источник высокого напряжения

Электрод-коллектор установки для электроспиннинга NF-103 (MECC, Япония), представляющий собой вращающийся стержень, предназначен для изготовления трубок с ориентированно-уложенным волокном. Установка снабжена подвижной консолью с коаксиальной фильерой для подачи растворов двух полимеров



**ЗАСЕКРЕЧЕНО НА 50 ЛЕТ**

Явление электроспрея было открыто еще в середине XVIII в., при этом уже тогда отмечалось, что при определенных условиях облаку распыленных капель предшествует струйное течение жидкости.

Почти на полтора столетия это открытие было забыто, но в XX в. электродинамическое распыление стали широко применять в технике, в том числе для получения монодисперсных аэрозолей, для распыления диэлектрических и криогенных жидкостей, прицельного нанесения ядохимикатов и полифункциональных покрытий, струйной печати и т. п.

Что же касается волокон, то первые патенты на их получение из струи раствора, вводимого в пространство с сильным электрическим полем, были выданы в США еще в 1902 г. А в 1930—1940-е гг. были также зарегистрированы патенты на получение волокон из искусственного шелка, растворов каучука, эфиров целлюлозы и т. д. Тем не менее производство волокон этим методом не было освоено за рубежом вплоть до 1990-х гг. из-за невысокого качества и низкой конкурентной способности получаемой волокнистой продукции (Филатов и др., 2008).

Настоящий прорыв в этой области случился в конце 1930-х гг., когда молодые сотрудники лаборатории аэрозолей Научно-исследовательского физико-химического института им. Л. Я. Карпова (Москва) Н. Д. Розенблюм и И. В. Петрянов-Соколов при попытке получить методом электроспрея монодисперсные аэрозольные частицы нитроцеллюлозы из ее раствора в ацетоне натолкнулись на конкурирующий режим генерации волокон. В 1938 г. здесь были произведены первые маты из микроволокон – этот материал был предложен в качестве эффективного дымопоглощающего фильтра.

Уже через год было налажено промышленное производство «фильтров Петрянова», которые использовались как противодымные фильтры в противогазах. В связи с особой важностью областей применения волокнистых материалов технология их получения была засекречена на 50 лет (Филатов и др., 2008).

Фильтры сначала изготавливали из ацетата целлюлозы, а в дальнейшем и из других полимеров. Объем производства отечественных материалов, изготовленных методом электроспиннинга, в 1980-е гг. достигал 20 млн м<sup>2</sup> в год!

В настоящее время в связи с интересом мировой промышленности к наноматериалам и нанотехнологиям электроспрей и электроспиннинг оказались под пристальным вниманием научной общественности, а работы по получению новых волокнистых материалов сегодня ведутся в более чем 200 исследовательских институтах по всему миру.

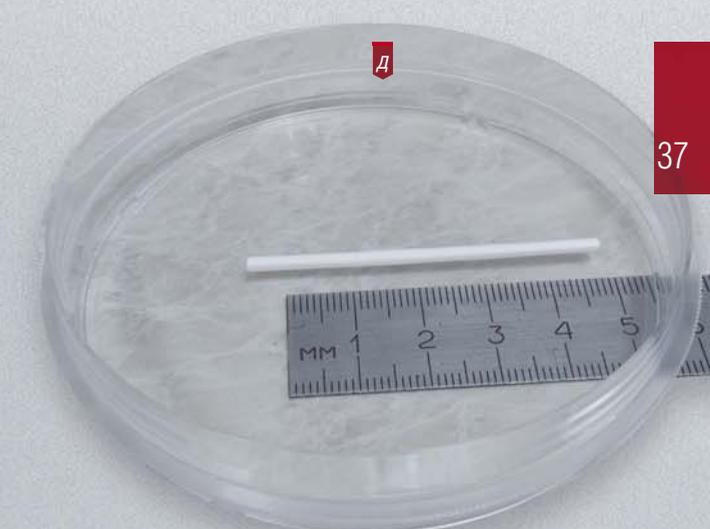
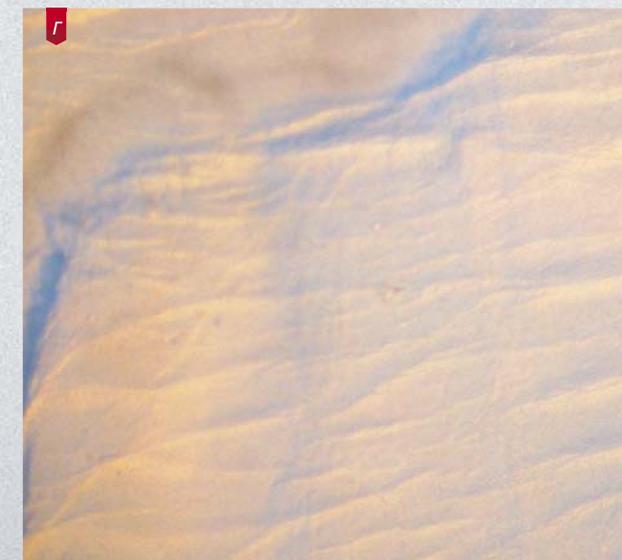
микрон, что невозможно сделать с помощью других методов изготовления нетканых материалов. Структуры, сформированные из таких волокон, обладают огромной площадью поверхности и высокой удельной прочностью, а с помощью различных способов укладки волокон можно получать анизотропные материалы разнообразной формы, с любыми значениями пористости и плотности.

В основе этой технологии лежит процесс электрогидродинамического распыления жидкостей (электроспрей), при котором жидкость, подаваемая на дозирующий капилляр, распыляется на мелкие капли под действием приложенного электрического поля. В случае использования раствора полимера могут получаться не только капли-частицы, но и волокна полимера (это и есть, собственно, электроспиннинг).

Выбор, по какому пути пойдет процесс, так же как и диаметр и структура получающихся волокон, будет зависеть от многих факторов: вязкости и электропроводности раствора, свойств растворителя, напряженности поля и т. п. В частности, степень однородности волокна и количество каплеобразных утолщений определяются концентрацией растворенного полимера (Fong, 2009). Поверхностное натяжение раствора также влияет на однородность волокон, а поскольку оно определяется в основном свойствами растворителя, именно он в первую очередь влияет на формирование ультраструктуры волокна. Несмотря на то что имеется немало работ по теории процесса, условия для производства материалов с определенными свойствами обычно подбираются эмпирически.

При помощи электроспиннинга можно создавать бесконечное множество структур, различных по составу и физическим свойствам. В самом простом варианте нить из одного раствора укладывают на плоский электрод-коллектор, получая неориентированный трехмерный матрикс. Но можно создавать и регулярные структуры (например, в виде сот и т. п.), используя управляемые коллекторы, такие как вращающийся барабан или диск. В последнем варианте образуется регулярно уложенный матрикс в виде плоского листа, нити или трубки. Варьируя скорость укладки, можно получать матриксы с разной плотностью, пористостью и прочностью.

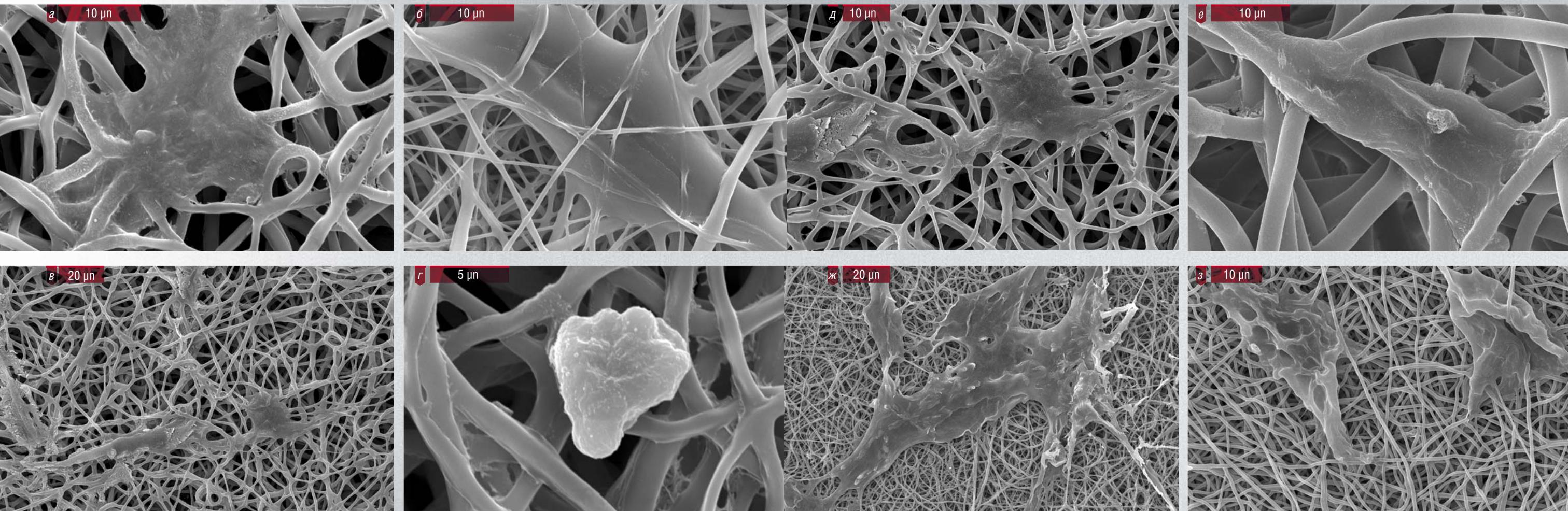
В более сложном варианте матриксы производят не из одного, а из двух или более типов волокон, используя одновременно или поочередно разные растворы полимеров. В результате формируется, соответственно, однородный либо слоистый матрикс. Такой подход позволяет получать более пористые или более прочные матриксы, а также матриксы, меняющие со временем свои свойства. Одним из интересных вариантов этой технологии является коаксиальный электроспиннинг, позволяющий получать коаксиальные, т. е. имеющие оболочку и ядро, волокна (частицы). В этих волокнах



Внутренняя поверхность синтетических сосудистых протезов, используемых в современной хирургической практике, очень грубая, сильно ворсистая и не способная поддерживать формирование нормального клеточного слоя в отличие от протезов, изготовленных методом электроспиннинга:

- а – вязаный протез «Intergard», покрытый коллагеном;
- б – вязаный протез из лавсана «Vascutek»;
- в – протез из тефлона «GoreTex»;
- г – протез из нейлона, изготовленный методом электроспиннинга;
- д – внешний вид сосудистого протеза из поликапролактона, изготовленного методом электроспиннинга.

Световая микроскопия. Фото А. Лебедевой



внутренний слой защищен от воздействия внешней среды, поэтому такие матриксы представляют собой перспективные средства доставки лекарств пролонгированного действия.

### Идеальная замена

Для электроспиннинга можно использовать растворы как синтетических полимеров, так и полимеров биологического происхождения. В качестве природных биополимеров используют фибриллярные белки животных (коллагены, эластин, фибрин), а также полисахариды растительного (например, целлюлоза и пектин) и животного происхождения (хитозан, гиалуроновая кислота и хондроитинсульфаты). При помощи электроспиннинга можно формировать волокнистые структуры не только из полимеров, но и липидов. Например, уже получены волокна из растворов лецитина, известного своей способностью образовывать мицеллярные и волокнистые структуры.

Из синтетических полимеров для этих целей используются в основном нейлон, поликапролактон, полилактид-ко-гликолид и их сополимеры. Материалы из нейлона деградируют в организме медленно, однако со временем

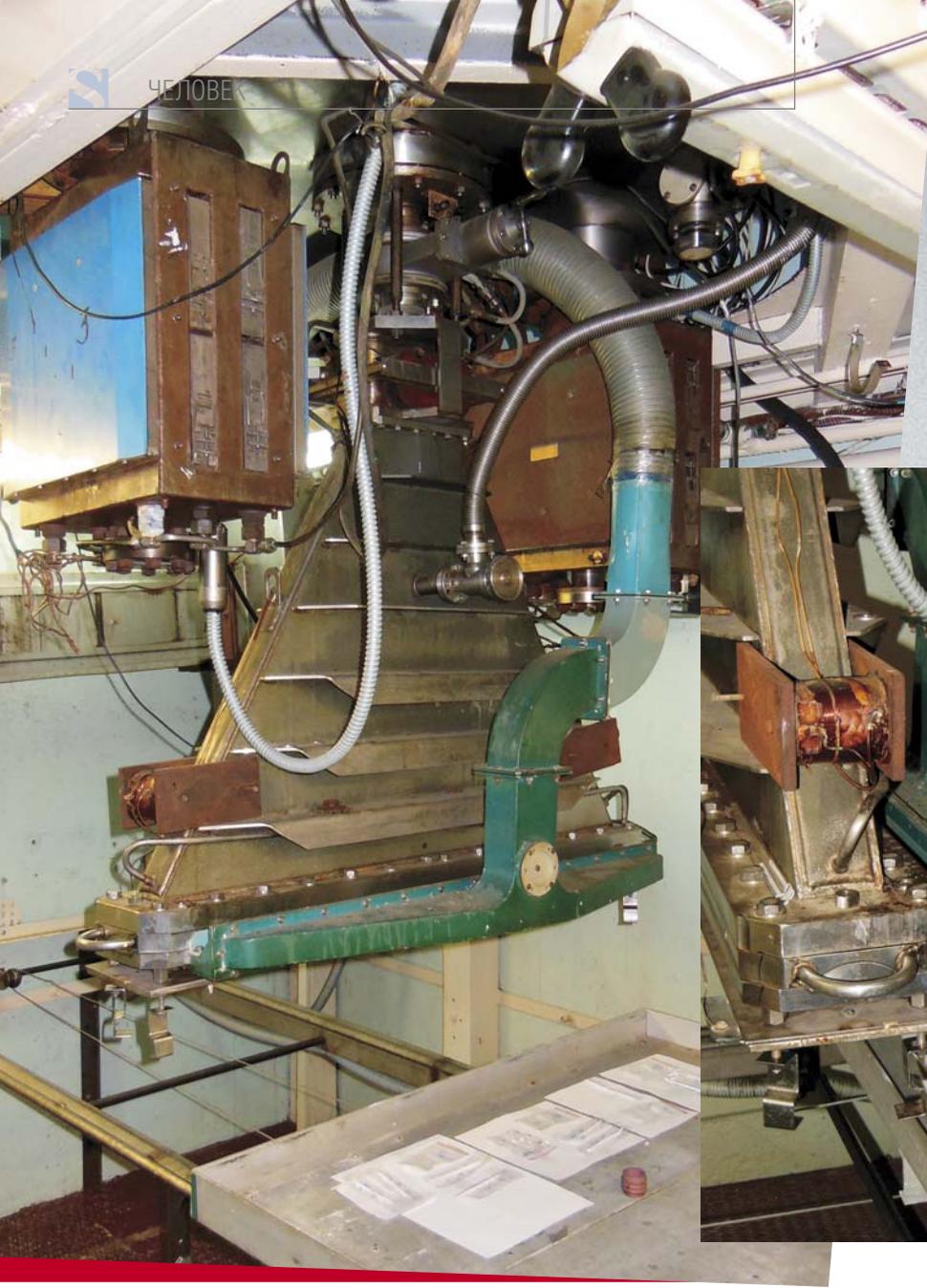
На поверхности матриксов, приготовленных из разных полимерных материалов методом электроспиннинга, успешно культивируются первичные эндотелиальные клетки (а – г) и фибробласты человека (д – з): а и д – матрикс из поликапролактона; б и в – матрикс из поликапролактона +10 % желатина; в и ж – матрикс из полилактид-когликолида; г и з – матрикс из нейлона-6. Сканирующая электронная микроскопия. Фото Н. Рудиной

теряют упругость. Изделия из более стабильного поликапролактона в зависимости от степени полимерности материала сохраняют свою стабильность от года до трех лет. Материалы из биоразлагаемого полилактид-когликолида имеют разную скорость деградации и могут сохраняться в организме в течение нескольких месяцев. Этот полимер оптимален для производства трансплантатов, которые должны рассасываться в организме: именно его часто используют для изготовления шовных материалов (например, «Викрил»).

В основной полимерный раствор при изготовлении биологических матриксов могут быть введены и дополнительные низко- и высокомолекулярные вещества, например, антибиотика, цитостатики, стимуляторы клеточного размножения, другие лекарственные средства. Такой материал, влияя на клеточное окружение трансплантата, будет «управлять» процессом реорганизации и регенерации вокруг него окружающей ткани, стимулировать или, напротив, подавлять прорастание клеток, ингибировать воспаление, инфекцию.

Доказано, что полимерные матриксы, изготовленные методом электроспиннинга, можно с успехом использовать для регенерации разных типов тканей. Так, в экспериментах на клеточных культурах они эффективно поддерживали рост клеток хрящевой, соединительной, мышечной и даже нервной тканей, а в экспериментах на животных было доказано, что они обладают высокой биологической совместимостью, не вызывают воспаления и эффективно замещаются нормальной тканью (Agarwa, 2009; Liu, 2010).

Но можно ли использовать метод электроспиннинга для изготовления протезов сосудов разного диаметра? Как известно, материал сосудистого имплантата должен отвечать определенным требованиям. Он должен сохранять механическую прочность и размеры при разных видах нагрузки; быть пористым, чтобы обеспечивать поступление внутрь матрикса питательных веществ, но при этом избирательно проницаемым в отношении клеточных элементов крови, циркулирующих в просвете сосуда.



Для повышения прочности и увеличения жесткости заготовки для протезов, полученные методом электроспиннинга, облучали потоком быстрых электронов на установке ИЛУ-6 лаборатории промышленных ускорителей ИЯФ СО РАН. Фото: А. Лебедевой



40 Большое значение имеет оптимизация состава внешнего и внутреннего слоев сосудистого протеза – это необходимо для поддержания популяции клеток нужного фенотипа. Внутренняя поверхность стенки сосудов должна быть пригодна для адгезии (прилипания) и пролиферации (размножения) клеток эндотелия, а внешняя – обеспечивать формирование мышечного слоя. Наконец, заготовки сосудов должны быть удобны для манипуляции и не вызывать механического раздражения и воспалительной реакции.

Сосуды, изготовленные методом электроспиннинга, полностью отвечают всем перечисленным требованиям. В частности, в отличие от используемых сегодня плетеных, вязаных или изготовленных из пористого

материала политетрафторэтиленовых протезов сосудов они имеют намного более гладкую поверхность, на которой может формироваться клеточный слой.

### Проверка на прочность

Технология изготовления протезов кровеносных сосудов методом электроспиннинга довольно проста. В качестве электрода-коллектора используется металлический стержень нужного диаметра, на который и укладывается волокно. После окончания процесса с электрода снимается готовая трубка – заготовка протеза. Подобные протезы, изготовленные из поликапролактона, полидиоксанона, шелка, коллагенов и эластина,

уже испытаны на лабораторных животных, хотя до применения в клинической практике еще не дошли (Boland, 2004; Garg, 2011).

В России разработкой и исследованиями протезов, созданных методом электроспиннинга, занимаются в московском Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А. Н. Бакулева РАМН и в сибирских научных учреждениях: Институте химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН (Новосибирск), Новосибирском НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина и НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН (Кемерово).

В ИХБФМ СО РАН были протестированы на способность поддерживать адгезию и пролиферацию клеток восемь типов матриц из синтетических полимеров (нейлона, поликапролактона и полилактид-ко-гликолида), а также их смесей с биологическими полимерами. Оказалось, что фибробласты – одни из основных клеток соединительной ткани, хорошо прикрепляются ко всем полимерным матрицам, а на матрице из нейлона размножаются даже в отсутствие дополнительных ростовых факторов. Более чувствительными к типу материала оказались клетки эндотелия, выстилающие внутреннюю поверхность сосудов, которые хорошо размножились на матрице из полилактид-ко-гликолида с добавками желатина и фактора роста.

К механической прочности сосудистых протезов предъявляется ряд жестких требований. Такие протезы должны быть устойчивыми к длительной циклической нагрузке, аналогичной той, которой протез подвергается в организме, быть устойчивыми к передавливанию и перегибу, а также хорошо стыковаться со стенками сосуда пациента.

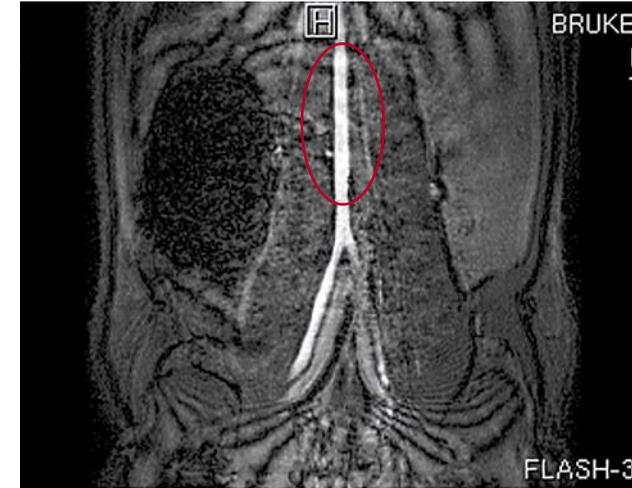
Очевидно, что устойчивость к подобной нагрузке с сохранением формы и размера может быть реализована только в том случае, если эта нагрузка лежит в области упругих деформаций материала. Это означает, что после снятия нагрузки материал должен возвращаться в исходное состояние без остаточной деформации

Механические свойства протезов исследовались в Центре коллективного пользования «Механика» при Институте гидродинамики им. М. А. Лаврентьева СО РАН (Новосибирск). Для динамических испытаний протезов сосудов был изготовлен стенд, состоящий из резервуара с избыточным давлением и двух программно-управляемых клапанов, последовательное включение которых позволяет имитировать давление в кровеносной системе. Результаты испытаний показали полное отсутствие остаточной деформации нейлоновых протезов после 100 тыс. нагрузочных циклов с перепадом давления 150 мм рт. ст.

Другой важной характеристикой протезов сосудов, вшивающихся в сосуд реципиента, является их



41 Материалы для протезирования, полученные методом электроспиннинга, прошли испытания на прочность на разрывной машине Zwick/Roell Z100 в Центре коллективного пользования «Механика» ИГиЛ СО РАН. Фото А. Лебедевой



На МРТ-изображении брюшной аорты крысы, сделанном в SPF-виварии ИЦИГ СО РАН, виден участок с вшитым протезом.  
Авторы А. Акулов и А. Ромащенко

прочность на прорыв ниткой. Проведенные испытания показали, что и эта величина удовлетворяет всем требованиям и составляет 260 кг-силы на один шов. Требованиям соответствовала и пористость протезов, от которой зависит величина кровопотери и которая была оценена по просачиванию воды через стенку протеза при избыточном давлении, соответствующем нормальному верхнему кровяному давлению человека.

Высокая устойчивость к передавливанию и перегибам у сосудистых протезов большого диаметра обычно достигается за счет их гофрирования. Однако такое техническое решение неприменимо для протезов малого диаметра, потому что в складках гофры будут формироваться застойные зоны, что приведет к воспалению и стенозу.

Для повышения прочности и увеличения жесткости протезов новосибирские исследователи облучали их пучком электронов высокой энергии на ускорительной установке ИЛУ-6 в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН. Как известно, облучение материалов приводит к их химической модификации, что отражается на физико-механических свойствах. Оказалось, что при облучении полимеров из поликапролактона и нейлона дозой 25–100 кГр (для сравнения – обычная доза при стерилизации продуктов питания не превышает 30 кГр) увеличивается модуль упругости материала и, следовательно, повышается его жесткость. Если же облучение протеза проводить через «маску» со сквозным рисунком из поглощающего излучение материала, то можно сформировать в составе протеза отдельные районы с повышенной жесткостью, что предотвратит передавливание сосудов.

Таким образом, все испытания полимерных матриц, изготовленных методом электроспиннинга новосибирскими специалистами, показали их потенциальную пригодность для производства сосудистых протезов. Однако наиболее достоверную информацию о поведении протеза в кровяном русле можно получить только после его трансплантации в живой организм.

Общепринятой экспериментальной моделью для подобного исследования является протезирование брюшной аорты белых лабораторных крыс породы Wistar. Протезирование сосуда диаметром 1,5–2,0 мм представляет собой непростую задачу даже для специалистов. С этой проблемой успешно справились хирурги из ННИИПК СО РАН: во время операции по замене брюшной аорты на протез из поликапролактона они наложили 13(!) швов, чтобы соединить концы крошечного двухмиллиметрового протеза и еще более тонкого сосуда.

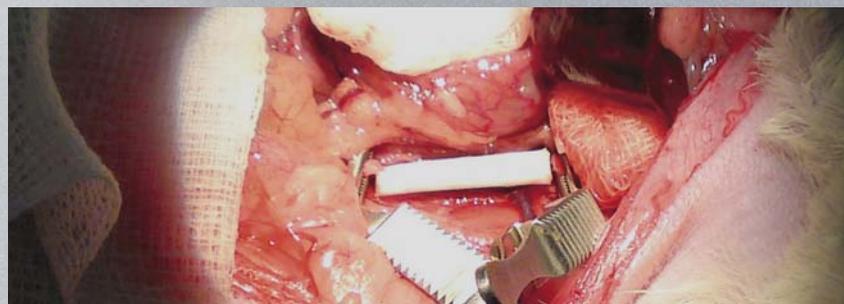
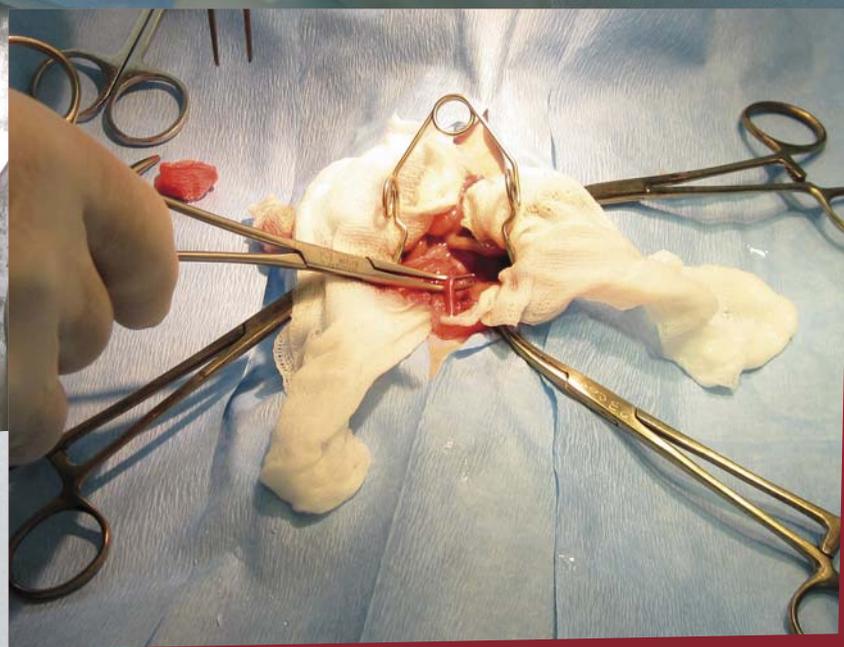
После операции животное быстро поправилось, что свидетельствует о нормальном функционировании сосудистого протеза. Это было подтверждено и объективными прижизненными инструментальными исследованиями, проведенными на МРТ-томографе SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Данные магнитно-резонансной ангиографии показали, что в протезе не наблюдается стенозов или аневризм, а скорость кровотока в нем не отличается от таковой в нормальной брюшной аорте крысы.

Помимо сосудистых имплантатов, с помощью электроспиннинга в Новосибирске был также создан композитный протез гиалинового хряща, представляющий собой «стопку» листов, на которых культивируются хондробласты. Такую «стопку» можно фиксировать в месте повреждения при помощи нетоксичного фотополимеризуемого геля.

Что же касается протезирования самих сосудов, то и в этой области можно выделить новое перспективное направление исследований. Ученые планируют заселять полимерные матрицы клетками эндотелия будущего хозяина протеза, которые, в свою очередь, будут получать из хозяйских фибробластов через фазу недифференцированных стволовых клеток... Но это уже темы для будущих публикаций.

#### Литература

Филатов И. Ю., Филатов Ю. Н., Якушкин М. С. Электроспиннинг волоконистых материалов на основе полимерных микро- и нановолокон. История, теория, технология, применение // Вестн. МИТХТ им. М. В. Ломоносова. 2008. Т. 3 (5). С. 3–18.



Хирурги из НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина успешно трансплантировали протез из поликапролактона, изготовленный в ИХБФМ СО РАН в брюшную аорту крысы породы Wistar. Подвиг Левши после этого не кажется таким уж удивительным: ноги-то у блохи были железные, а вот попробовал бы он сшить маленький эластичный протез с мягким и ускользящим из поля зрения живым сосудом...  
Фото И. Поповой (ННИИПК)