



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105343932 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510645170. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 01. 30

A61L 27/34(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61L 27/36(2006. 01)

60/898, 356 2007. 01. 30 US

A61L 27/54(2006. 01)

A61L 27/58(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61F 2/06(2013. 01)

200880007786. 2 2008. 01. 30

(71) 申请人 匹兹堡大学

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M·艾尔-库尔德 洪奕 L·索乐蒂

J·J·斯坦库茨 D·A·沃普

W·R·瓦格纳

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

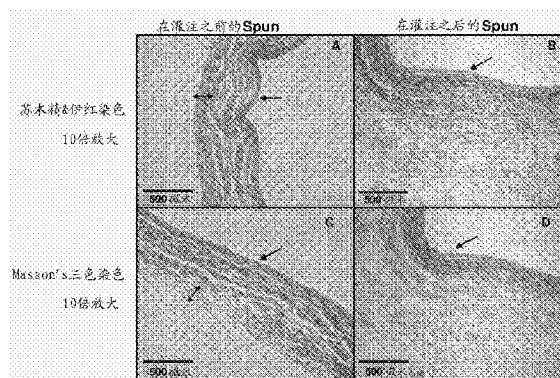
权利要求书2页 说明书63页 附图27页

(54) 发明名称

生物可消化性覆盖物及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种管状组织嫁接装置,其包括管状组织和位于所述管状组织周围的生物可消化性聚合物限制性的纤维矩阵。所述矩阵可以通过静电纺作用被置于所述的管状组织之上。在一种实施方式中,所述管状组织来自于静脉,例如隐静脉血管,其能够有效的用作动脉嫁接物,例如且并不局限于用在冠状动脉搭桥手术中。本发明还提供一种制备管状嫁接物的方法,所述方法包括在管状组织的周围边缘上沉积一种生物可消化性聚合物的纤维矩阵,从而制成一种管状组织嫁接装置。本发明还提供一种心脏搭桥方法,所述方法包括利用一种管状组织嫁接装置对冠状动脉进行搭桥,所述管状组织嫁接装置包括静脉和位于所述静脉周围的生物可消化性聚合物的限制性纤维矩阵。



1. 一种管状组织嫁接装置,包括

一种存活的管状组织结构,其具有环绕内腔的侧壁,侧壁具有一种外部表面,这种外部表面包括一系列的非圆横切面沿着存活的管状组织结构的长度部分发生至少部分改变,以及

一种静电纺沉积物形成基本上与存活的管状组织结构周围外部表面接触的一种或多种生物可消化聚合物纤维,所沉积的一种或多种生物可消化聚合物纤维形成一种限制性纤维基质,其具有固有的各向异性并且具有一种内部表面,所述内部表面沿着存活的管状组织结构的长度部分与存活的管状组织结构外部表面的一系列非圆横切面基本上相邻,并且限制性纤维基质也沉积在这长度部分上。

2. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述存活的管状组织结构是静脉。

3. 根据权利要求2中所述的装置,其中所述存活的管状组织结构是从隐静脉中获得的。

4. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种聚合物,所述的聚合物包括酯以及氨基甲酸酯键。

5. 根据权利要求4中所述的装置,其中所述包括酯以及氨基甲酸酯键的聚合物包括一种聚酯型聚氨酯。

6. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述存活的管状组织结构获自动脉,尿道,肠道,食道,输尿管,气管,支气管,输卵管,或者它们的组合。

7. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种来源于 α -羟基酸的聚合物。

8. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含内酯单体的聚合物。

9. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含碳酸连接键的聚合物。

10. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含氨基甲酸酯键的聚合物。

11. 根据权利要求10中所述的装置,其中所述一种或多种包含氨基甲酸酯键的聚合物包括聚亚安酯、聚酯型聚氨酯弹性体或者它们的组合。

12. 根据权利要求11中所述的装置,其中一种或多种包含氨基甲酸酯键的聚合物包括一种聚酯型聚氨酯弹性体。

13. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括酯连接键。

14. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种天然聚合物。

15. 根据权利要求1中所述的装置,其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括骨胶原。

16. 根据权利要求1中所述的装置,其进一步包括与所述限制性纤维基质相关联的一种或多种细胞、活性试剂或者它们的组合。

17. 根据权利要求1中所述的装置,其进一步包括一种选自下述中的一种或者多种

的试剂：非类固醇型抗炎药，抗生素，抗凝血因子，免疫抑制剂，糖肾上腺皮质激素，作用于免疫亲和素的药物，干扰素，肿瘤坏死因子（TNF）结合蛋白，紫杉烷（taxane），他汀类（statin），含氮氧化物供体，含氮氧化物前体，以及它们的任意组合。

18. 一种制备管状组织嫁接装置的方法，所述的方法包括：

提供一种管状组织，该管状组织具有环绕内腔的侧壁，侧壁具有包括一系列非圆横切面的外表面，这种外表面至少一部分沿着存活的管状组织结构的长度部分发生改变，以及

将一种沉积物静电纺在存活的管状组织结构的外表面上形成一种或多种生物可消化聚合物纤维，其中所沉积的一种或多种生物可消化聚合物的形成限制性纤维基质，其具有固有的各向异性并且具有一种内部表面，沿着存活的管状组织结构的长度部分与存活的管状组织结构外表面的一系列非圆横切面基本上相邻，并且限制性纤维基质也沉积在这长度部分上。

19. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种包含酯以及氨基甲酸酯键的聚合物。

20. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述存活的管状组织结构获自动脉，尿道，肠道，食道，输尿管，气管，支气管，输卵管或者它们的组合。

21. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种来源于 α -羟基酸的聚合物。

22. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含内酯单体的聚合物。

23. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含碳酸连接键的聚合物。

24. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种包含氨基甲酸酯连接键的聚合物。

25. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括酯连接键。

26. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括一种或多种天然聚合物。

27. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述一种或多种生物可消化聚合物纤维包括骨胶原。

28. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中所述存活的管状组织结构是隐静脉。

29. 根据权利要求 18 中所述的方法，其进一步包括与所述限制性纤维基质相关联的细胞、活性制剂或者它们的组合。

生物可消化性覆盖物及其应用

[0001] 本申请是 2008 年 1 月 30 日递交的申请号为 200880007786.2, 发明名称为“生物可消化性覆盖物及其应用”的分案申请。

[0002] 冠状动脉疾病能够导致心肌梗塞以及心肌缺血, 是当前世界范围内构成上述疾病发病率以及死亡率的头号原因。当前可以选择的治疗方法有经皮冠状动脉腔内成形术, 支架, 以及冠状动脉旁路嫁接 (CABG)。可以使用动脉导管或者静脉导管进行冠状动脉旁路嫁接, 并且其是最有效的以及应用最广泛的治疗冠状动脉狭窄的方法, 每年将进行将近 500,000 例冠状动脉旁路嫁接。除此之外, 每年将进行大约 80,000 例下肢搭桥手术。最频繁的用于进行搭桥手术的静脉导管是自生性隐静脉并且 95% 的外科医生会选择使用这样的嫁接物来完成这些搭桥手术。根据美国心脏协会 (the American Heart Association) 的数字, 在 2004 年里有 249,000 位患者进行了 427,000 例搭桥手术。这类手术的长期结果受到限制, 这归因于所述的嫁接导管或者吻合位点的闭塞, 所述的闭塞是内膜增生 (IH) 的结果, 其可以在几个月至几年的时间后发生。

[0003] 已经成功的研究出了小直径的合成血管嫁接物或者组织工程化的血管嫁接物, 并且动脉嫁接物 (例如, 内乳, 桡动脉, 或者胃网膜动脉) 的使用受到了这些导管的小尺寸、小直径以及可利用性的限制。尽管动脉静脉嫁接物 (AVG) 得以被广泛的应用, 但是它们的失效仍然是主要的问题: 有 12% 至 27% 的动脉静脉嫁接物会在第一年里发生闭塞, 并且随后每年有 2% 至 4% 的闭塞率。带有失效的动脉静脉嫁接物的患者将会死亡或者需要重新进行手术。

[0004] 在最初的五年里, 在全部的动脉静脉嫁接物失效的情况中内膜增生 (IH) 占到 20% 至 40%。几项研究已经确定, 内膜增生在所有成熟的动脉静脉嫁接物中都有一定程度的发生, 并且许多人将其认为是所述的静脉针对嫁接所产生的不可避免的应答。内膜增生的特征在于表型转化, 随后中层的以及外膜的平滑肌细胞 (SMC) 以及成肌纤维细胞发生脱黏附 (de-adhesion) 作用并且向它们增殖处的内膜发生迁移。在许多情况中, 这种应答能够导致器官狭窄并且经由所述嫁接物的血流减少。已经认为, 将静脉突然暴露于动脉循环的动态力学环境下可能引发内膜增生。

[0005] 作为旁路嫁接物被转置于动脉循环之中的静脉片段被暴露于增加的血流以及管腔内压力的状态下 (参见 Porter KE, Nydahl S, Dunlop P, Varty K, Thrush AJ, 以及 London NJ. 于 1996 年在 Cardiovasc Res. 《心脏血管研究》31(4):607-14 中发表的文章 The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia 《人类隐静脉嫁接内膜增生的体外流动模型的研究》), 并且在冠状动脉旁路嫁接 (CABG) 的情况中由于所述的静脉片段与跳动的心脏之间的接触而引发循环的室壁运动 (包括弯曲, 扭曲以及拉伸) (参见 Vorp DA, Severyn DA, Steed DL, 以及 Webster MW. 于 1996 年在 Am J Physiol 《美国生理学杂志》270(2Pt 2 第 2 部分):H787-95 中发表的文章 A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments 《用于进行灌流血管片段的循环扭曲以及延展的装置》)。由于静脉比动脉具有更加薄的室壁并且更加脆弱, 它们在所述的动脉循环中需要经受的压力显著的大于它们在所

述的静脉循环中通常经受到的压力。事实上, Liu 以及 Fung 已经证明,一旦重新建立起动脉流,所述动脉静脉嫁接物的平均周向室壁应力(CWS)可以达到静脉在正常情况下的平均周向室壁应力的140倍(参见Fuchs JC, Mitchener JS,以及Hagen PO. 于1978年在Ann Surg.《外科学年鉴》188(1):1-15中发表的文章Postoperative changes in autologous vein grafts《自身同源性静脉嫁接物的术后变化》)。周向室壁应力发生的这种剧烈的增加归因于所述的动脉静脉嫁接物在动脉压力下已经扩张到它的最大直径。所述的组织通过变厚来应答这种感知性的损伤,这被认为是一种将所述的压力还原至静脉水平的尝试。然而,这种应答是不受控制的并且可能过度代偿,引发器官狭窄,从而代替期望看到的所述静脉片段的变厚或者“动脉血化”。

[0006] 已经有人提出,动脉静脉嫁接物的增生性应答是“细胞休克 (cellular shock)”的直接结果,这种现象的发生是所述的动脉静脉嫁接物突然被暴露于动脉生物机械学环境中的结果(参见Angelini GD等人于1990年在J Thorac Cardiovasc Surg.《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》99(3):433-9中发表的文章Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts《猪动脉静脉旁路嫁接物中膨胀对于血小板以及白细胞的粘附的促进以及对于短期开放性的降低》;Campbell PA等人于1981年在Ann R Coll Surg Engl.《英国外科医生学院年鉴》63(4):257-60中发表的文章Vein grafts for arterial repair:Their success and reasons for failure《用于动脉修复的静脉嫁接物的成功及其失效的原因》;Campeau LJ等人于1984年在Mod Concepts Cardiovasc Dis.《心脏血管疾病的现代观点》53:59-63中发表的文章Natural history of saphenous vein aortocoronary bypass grafts《隐静脉主冠状动脉旁路嫁接物的自然历史》;Fuchs JC, Mitchener JS,以及Hagen PO. 于1978年在Ann Surg.《外科学年鉴》188(1):1-15中发表的文章Postoperative changes in autologous vein grafts《自身同源性静脉嫁接物的术后变化》;Huynh TT等人于1999年在J Vasc Surg.《血管外科学杂志》29(2):334-44中发表的文章Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts《实验性静脉嫁接物室壁张力以及剪切应力的改变对于酪氨酸激酶信号以及室壁的重新塑造的调节作用》;Liu SQ等人于1998年在Ann Biomed Eng.《生物医学工程学年鉴》26(1):86-95中发表的文章Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts《大鼠静脉嫁接物平滑肌细胞中的组织变化》;Ramos JR等人于1976年在Ann Surg.《外科学年鉴》183(3):205-28中发表的文章Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts《扩张静脉嫁接物与未扩张静脉嫁接物的组织学改变以及内皮变化》;Resnick N以及Gimbrone MA. 于1995年在The Faseb J.《美国实验生物学学会联合会官方出版物》9(10):874-82中发表的文章Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression《血液动力学力量是内皮基因表达的复杂调节剂》;Sumpio B于1993年发表的文章Hemodynamic forces and vascular cell biology《血液动力学力量以及血管细胞生物学》Austin:R.G Landes Company;Szilagyi DE等人于1973年在Ann Surg.《外科学年鉴》178(3):232-46中发表的文章Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes:Clinical, angiographic and histopathologic

observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis 《自生性静脉植入物作为动脉替代品的生物学改变：在动脉硬化症的股静脉-腿静脉手术中进行的临床观察，血管造影观察以及病例组织学观察》；以及 Zwolak RM 等人于 1987 年在 Journal of Vascular Surgery:Official Publication, the Society For Vascular Surgery 【and】 International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter 《血管外科学杂志：血管外科学学会与心脏血管外科学国际学会官方出版物，北美篇章》5(1)：126-36 中发表的文章 Kinetics of vein graft hyperplasia:Association with tangential stress 《与切线应力相关的静脉嫁接物增生的动力学》)。通过加入一种外部结构支撑（或者包封物）来防止动脉静脉嫁接物的急性膨胀表面上改善了所述静脉嫁接物的开放性（参见 Huynh TT 等人于 1999 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》中发表的文章；Cabrera Fischer EI 等人于 2005 年在 Artif Organs. 《人造器官》29(2)：122-30 中发表的文章 Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia 《向延伸的聚四氟乙烯股动脉搭桥中插入静脉袖套而达到的降低的弹塑性失调引发内膜增生的降低》；Ducaase E 等人于 2004 年在 Eur J Vasc Endovasc Surg. 《欧洲血管以及内皮血管外科学杂志》27(6)：617-21 中发表的文章 Interposition vein cuff and intimal hyperplasia:An experimental study 《一项关于插入静脉袖套以及内膜增生的试验研究》；Huynh TT 等人于 1999 年在 Surgery 《外科学》126(2)：127-34 中发表的文章 External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts 《外部支撑对于试验性静脉嫁接物的 g 蛋白表达以及受体偶联的调节》；Jeremy JY 等人于 2004 年在 J Thorac Cardiovasc Surg. 《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》127(6)：1766-72 中发表的文章 A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening 《一种抑制猪隐静脉嫁接物增厚的生物可吸收性（聚多糖），非限制性外部包封物》；Karayannacos PE 等人于 1978 年在 Ann Surg. 《外科学年鉴》187(2)：183-8 中发表的文章 Late failure in vein grafts:Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia 《静脉嫁接物的延迟失效：内皮下纤维肌性增生的调节因子》；Kohler TR 等人于 1989 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》9(2)：277-85 中发表的文章 The effect of rigid external support on vein graft adaptation to the arterial circulation 《适用于动脉循环中的静脉嫁接物的刚性外部支撑的作用》；Liu SQ 等人于 1999 年在 J Biomech. 《生物机械学杂志》32(11)：1165-75 中发表的文章 Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach 《通过使用生物机械学工程化方法在试验性静脉嫁接物中对单核细胞以及粒细胞的活化进行的部分预防》；Liu SQ 等人于 2002 年在 Biomech Model Mechanobiol. 《生物机械学模型的力学生物学》1(1)：17-27 中发表的文章 A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts 《由机械张力引发的原始细胞死亡对于试验性静脉嫁接物中的随后的细胞增殖的调节所产生的可能的作用》；Mehta D 等人于 1998 年在 Nat Med. 《自然医学》4(2)：235-9 中发表的文章 External stenting reduces long-term medial and

neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting《在猪动脉静脉旁路嫁接模型中外部支架对于长期的中层和新生内膜增厚的减少以及血小板衍生生长因子表达的降低》;Parsonnet V 等人于1963年在Arch Surg.《外科学档案》87:696-702中发表的文章New stent for support of veins in arterial grafts《用于支撑动脉嫁接物中的静脉的新的支架》;Vijayan V 等人于2004年在J Vasc Surg.《血管外科学杂志》40(5):1011-9中发表的文章Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath《利用聚多糖生物可降解性外部包封物对猪隐静脉嫁接物中的中层以及内膜增厚作用进行的长期降低》;以及Vijayan V 等人于2002年在Eur J Vasc Endovasc Surg.《欧洲血管以及内皮血管外科学杂志》24(1):13-22中发表的文章External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts《静脉嫁接物中的外部支撑以及对于新生内膜形成的预防》)。然而,由于受到一种或者多种基本原则的限制,这些先前的方法没能形成用于改善动脉静脉嫁接物的开放性的临床学上可行的手段。这些先前的方法全部利用了放置在外膜的覆盖物/包封物,所述的覆盖物/包封物是具有生物持久性的,和/或宽松的。

[0007] 生物机械学在内膜增生的形成中所起的作用

[0008] 内膜增生(IH)被定义为血管内层的厚度的增加,这通常是由于所述内膜中的细胞的数量和/或大小的增加而导致的,随后这些细胞引发了大块剂量的细胞外间质(ECM)的沉积。构成这种应答的所述细胞主要是来源于中层以及外膜的平滑肌细胞(SMC)。内膜增生的发生可能是生理学原因,在动脉导管的关闭过程中发生,也可能是病理学原因,是由于血管损伤所引起的。已经认为,将静脉突然暴露于动脉循环的动力学机械环境中可能引发动脉静脉嫁接物的内膜增生(参见Dobrin PB, Littooy FN, 以及Endean ED于1989年在Surgery《外科学》105(3):393-400中发表的文章Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts《在自生性静脉嫁接物中诱发内膜增生以及中层增厚的力学因素》)。然而,尽管已经表明周向室壁应力(CWS)水平的增加能够促进内膜增生的形成(参见Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, 以及Hagen PO于1999年在J Vasc Surg.《血管外科学杂志》29(2):334-44中发表的文章Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts《实验性静脉嫁接物室壁张力以及剪切应力的改变对于酪氨酸激酶信号以及室壁的重新塑造的调节作用》以及Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, 以及Gooch KJ于2005年在J. Biomech《生物机械学杂志》38(9):1760-9中发表的文章Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo《剪切应力以及压力对于隐静脉重塑的体外调节》),但剪切应力水平的增加趋向于对其进行调节(参见Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, 以及Hagen PO于1999年在J Vasc Surg.《血管外科学杂志》29(2):334-44中发表的文章Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts《实验性静脉嫁接物室壁张力以及剪切应力的改变对于酪氨酸激酶信号以及室壁的重新塑造的调节作用》;Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, 以及Gooch KJ于2005年在J. Biomech《生物机

械学杂志》38(9):1760-9 中发表的文章 Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo 《剪切应力以及压力对于隐静脉重塑的体外调节》;Goldman J, Zhong L, 以及 Liu SQ 于 2006 年在 Am J Physiol Heart Circ Physiol 《美国生理学杂志:心脏循环生理学》中发表的文章 Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress 《血液剪切应力对血管平滑肌细胞迁移的负性调节》;Jiang Z, Berceli SA, Pfahnl CL, Wu L, Goldman D, Tao M, Kagayama M, Matsukawa A, 以及 Ozaki CK 于 2004 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》40(2):345-50 中发表的文章 Wall shear modulation of cytokines in early vein grafts 《早期静脉嫁接物中细胞因子对于室壁剪切的调节》;Jiang Z, Wu L, Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, 以及 Berceli SA 于 2004 年在 American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 《美国生理学杂志:心脏循环生理学》286(1):H240-5 中发表的文章 A novel vein graft model:Adaptation to differential flow environments 《一种适于差流环境的新的静脉嫁接物模型》;以及 Morinaga K, Okadome K, Kuroki M, Miyazaki T, Muto Y, 以及 Inokuchi K 于 1985 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》2(3):430-3 中发表的文章 Effect of wall shear stress on intimal thickening of arterially transplanted autogenous veins in dogs 《室壁剪切应力对于狗的动脉移植自生性静脉的内膜增厚所产生的作用》)。Dobrin 等人对于这两种在表面上引起动脉静脉嫁接物的反向增生性应答的生物机械学因素进行了仔细的探究,并且指出,与剪切应力的增加对于内膜增厚的阻碍作用相比,周向压力的增加对于内膜增厚的促进发挥了更加主要的作用(参见 Dobrin PB, Littooy FN, 以及 Endean ED 于 1989 年在 Surgery 《外科学》105(3):393-400 中发表的文章 Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts 《在自生性静脉嫁接物中诱发内膜增生以及中层增厚的力学因素》)。在促进该项工作的另外一项研究中,Zwolak 等人提出生物机械学室壁应力对于动脉静脉嫁接物的动脉血化现象具有调节作用(参见 Zwolak RM, Adams MC, 以及 Clowes AW 于 1987 年在 Journal of Vascular Surgery:Official Publication, the Society For Vascular Surgery【and】International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter 《血管外科学杂志:血管外科学学会与心脏血管外科学国际学会官方出版物,北美篇章》5(1):126-36 中发表的文章 Kinetics of vein graft hyperplasia:Association with tangential stress 《与切线应力相关的静脉嫁接物增生的动力学》)。Jiang 等人已经证明,当不发生室壁张力的增加时,室壁剪切应力的增加将导致动脉静脉嫁接物中的增生性应答的降低(Jiang Z, Wu L, Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, 以及 Berceli SA 于 2004 年在 American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 《美国生理学杂志:心脏循环生理学》286(1):H240-5 中发表的文章 A novel vein graft model:Adaptation to differential flow environments 《一种适于差流环境的新的静脉嫁接物模型》)。Liu 等人进行的体内研究已经证明,借助一种持久性的聚四氟乙烯包封物的放置,通过降低动脉静脉嫁接物中的周向室壁应力的水平,可以降低所述的增生性应答(参见 Cabrera Fischer EI, Bia Santana D, Cassanello GL, Zocalo Y, Crawford EV, Casas RF, 以及 Armentano RL 于 2005 年在 Artif Organs 《人造器官》29(2):122-30 中发表的文章 Reduced elastic mismatch

achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia《向延伸的聚四氟乙烯股动脉搭桥中插入静脉袖套而达到的降低的弹塑性失调引发内膜增生的降低》;Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grotberg JB, 以及 Mok AP 于 1999 年在 J Biomech《生物机械学杂志》32(11): 1165-75 中发表的文章 Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach《通过使用生物机械学工程化方法在试验性静脉嫁接物中对单核细胞以及粒细胞的活化进行的部分预防》;以及 Liu SQ, Ruan YY, Tang D, Li YC, Goldman J, 以及 Zhong L 于 2002 年在 Biomech Model Mechanobiol.《生物机械学模型的力学生物学》1(1):17-27 中发表的文章 A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts《由机械张力引发的原始细胞死亡对于试验性静脉嫁接物中的随后的细胞增殖的调节所产生的可能的作用》)。从上述先前的研究中可以清楚的看出,动脉静脉嫁接物所存在的生物机械学环境对于内膜增生的形成起到了重要的作用。特别是,所述的周向室壁应力看来可以调节内膜增生的形成,而对这一现象进行控制则是本项研究中所描述的方法的焦点。

[0009] 与内膜增生相关的分子过程以及细胞过程

[0010] 一旦静脉感知到损伤,所述的增生性应答即开始进行,这种应答可以被描述成五个截然不同但相互关联的细胞过程:1) 外膜以及中层平滑肌细胞的表型转化,由具有低增生可能性的收缩性状态以及静态转化为具有高增生可能性的合成态;2) 平滑肌细胞的脱黏附或者与其他细胞以及所述的细胞外间质 (ECM) 之间的斑状黏附的改变;3) 平滑肌细胞从外层经由基底膜迁移至所述的内膜,这需要对斑状黏附进行选择性的重新集合 (reassembling),使得所述的细胞能够沿所述的细胞外间质进行移动;4) 增殖;以及 5) 组织的重塑,这反映出细胞外间质在组成上发生的变化,这种变化是由合成性平滑肌细胞分泌的骨胶原,弹性蛋白,纤连蛋白,等等,以及基质降解酶例如各种基质金属蛋白酶 (MMP) 所引发的。为了抑制动脉静脉嫁接物内膜增生的初始事件的发生,我们必须考虑到这五个步骤中的每一个。附图 1 表示的是用以描述与内膜增生相关的连锁事件的示意图。

[0011] 表型转化

[0012] 平滑肌细胞的表型转化是内膜增生的发病机理中的一个显著的特征。早在进行嫁接后的第二周就在所述的内膜中发现了含有丰富的经过修饰的平滑肌细胞的血小板。完全分化的成熟平滑肌细胞表现出低的代谢回转 (turnover),这可以由低的增值率以及凋亡率来证明。然而,在动脉损伤发生的 48 小时之后,15-40%的平滑肌细胞是有丝分裂的。这种功能性上的突然转变涉及到下述事实:平滑肌细胞可以存在于表型广谱中,涵盖完全的合成性到完全的收缩性。合成性的平滑肌细胞应答于规律的信号以及细胞因子,并且能够在细胞外间质中进行代谢回转以及生成生长因子。在另外一方面,收缩性平滑肌细胞应答于血管收缩信号并且调节血管的松紧状态 (tone)。在持续存在去分化类型的平滑肌细胞的条件下,由于合成性平滑肌细胞的迁移以及增殖,以及随后持续进行的细胞外间质的积累,包括 I 型胶原产物,动脉静脉嫁接物表现出新生内膜的形成。

[0013] 所述的平滑肌细胞的表型状态至少部分的受到机械力量的调节,这是通过对循环应力对于增殖以及 h-caldesmon 表达所产生的体外底物依赖性调节进行的观察来证明

的。体内研究同样表明了所述的平滑肌细胞表型的机械损伤的重要性。向中层进行的球囊扩张损伤表现出促进了平滑肌细胞的细胞外间质合成并且降低了 α 肌动蛋白的含量。几项报道已经证明,被转置于所述动脉循环中的静脉的新生内膜平滑肌细胞发生了表型的改变,这证实了下述观点:静脉环境向动脉环境的转变触发了表型的改变。进一步的证据来自于体外的器官培养研究,在这些研究中,例如,发现了循环应力对于保持在经过培养的大鼠的门静脉中的平滑肌细胞的收缩功能而言是必要的。Goldman 等人将大鼠的腔静脉暴露于动脉压力中(参见 Goldman J, Zhong L, 以及 Liu SQ 于 2003 年在 American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 《美国生理学杂志:心脏循环生理学》284(5):H1839-47 中发表的文章 Degradation of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch《静脉平滑肌细胞中的 α -肌动蛋白丝状结构的降解对于机械应力的应答》),这导致中层周向压力发生了大的变化并且伴随着平滑肌细胞丝状肌动蛋白覆盖的降低。显然的,涉及静脉嫁接的机械学环境的改变能够导致附壁平滑肌细胞的表型改变,这可能引发内膜增生的形成。

[0014] 对于合成性表型的指示包括出现高尔基体和粗面内质网数量的增加,以及丝状肌动蛋白数量的降低。完整的收缩体(contractile apparatus)的出现证明了收缩性表型的存在,它是通过收缩蛋白的表达以及大量的丝状肌动蛋白的存在来指示的,其中所述的收缩蛋白是例如 smoothelin(平滑肌细胞特异性蛋白),h-caldesmon,平滑肌肌球蛋白重链。

[0015] 脱黏附以及迁移

[0016] 细胞的脱黏附是所述的内膜增生级联中的最早的应答之一。这一过程指的是细胞对于所述的细胞外间质的黏附性从一种带有斑状黏附以及应力纤维的很强的黏附性状态向一种较弱的黏附状态的转变,其特征在于:在保持伸展的细胞形状的同时,进行斑状黏附以及应力纤维的重新构建。平滑肌细胞的脱黏附自然能够导致平滑肌细胞的迁移以及增殖,这将引发新生内膜的形成。

[0017] 尽管在细胞黏附性的调节中涉及到许多重要的蛋白,但我们将注意力集中在基质细胞蛋白(matricellular protein)以及细胞内黏附蛋白上,其中所述的基质细胞蛋白的功能是细胞基质相互反应的适配剂(adaptor)以及调节剂(参见 Bornstein P 于 1995 年在 J Cell Biol 《细胞生物学杂志》130(3):503-6 中发表的文章 Diversity of function is inherent in matricellular proteins:An appraisal of thrombospondin1 《基质细胞蛋白所固有的功能的多样性:对于血小板反应素 1 的评价》以及 Sage EH 与 Bornstein P 于 1991 年在 The Journal of Biological Chemistry 《生物化学杂志》266(23):14831-4 中发表的文章 Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. Sparc, tenascin, and thrombospondin 《调节细胞-基质相互反应的细胞外蛋白,富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白,固生蛋白 tenascin 以及血小板反应素》),而已经证明细胞内黏附蛋白停留在细胞黏着斑位点上(参见 Nikolopoulos SN 以及 Turner CE 于 2001 年在 The Journal of Biological Chemistry 《生物化学杂志》276(26):23499-505 中发表的文章 Integrin-linked kinase(ilk)binding to paxillin 1d1 motif regulates ilk localization to focal adhesions 《结合于桩蛋白 1d1 半族的整合素连接激酶对于整合素连接激酶在黏着斑上的定位的调节》以及 Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, 以及 Wu C 于 2003 年在 Cell 《细胞》113:37-47 中发表的文章 Migfilin and mig-2 link focal adhesions

to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation 《Migfilin 基因以及有丝分裂原诱导基因 -2 对于黏着斑与细丝蛋白以及肌动蛋白细胞骨架的连接,及其调节细胞形状的功能》)。固生蛋白 C(TN-C),血小板反应素 1,2(TSP),以及富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (SPARC) 属于基质细胞蛋白,其在细胞损伤的形成发展中表现出高度规律的表达 (参见 Murphy-Ullrich JE 于 2001 年在 J Clin Invest《临床研究杂志》107(7):785-90 中发表的文章 The de-adhesive activity of matricellular proteins:Is intermediate cell adhesion an adaptive state?《基质细胞蛋白的脱黏附活性:中间型细胞黏附是一种适应性的状态么?》)。有丝分裂原诱导基因 2(Mig-2) 以及整合素连接激酶 (ILK) 是细胞形状调节中涉及到的细胞内蛋白 (参见 Nikolopoulos SN 以及 Turner CE 于 2001 年在 The Journal of Biological Chemistry《生物化学杂志》276(26):23499-505 中发表的文章 Integrin-linked kinase(ilk)binding to paxillin 1d1 motif regulates ilk localization to focal adhesions《结合于桩蛋白 1d1 半族的整合素连接激酶对于整合素连接激酶在黏着斑上的定位的调节》以及 Tu Y,Wu S,Shi X,Chen K,以及 Wu c 于 2003 年在 Cell《细胞》113:37-47 中发表的文章 Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation 《Migfilin 基因以及有丝分裂原诱导基因 -2 对于黏着斑与细丝蛋白以及肌动蛋白细胞骨架的连接,及其调节细胞形状的功能》),并且也涉及到整合素介导的信号转导 (参见 Wu C 以及 Dedhar S 于 2001 年在 J Cell Biol《细胞生物学杂志》155(4):505-10 中发表的文章 Integrin-linked kinase(ILK)and its interactors:A new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes《整合素连接激酶 (ILK) 及其相互反应物:一种用于耦合胞外基质与肌动蛋白细胞骨架以及信号复合体的新的范例》)。固生蛋白 C(TN-C),血小板反应素 (TSP),以及富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (SPARC) 对于所述的细胞骨架以及斑状黏附所起到的作用基本上是难以区分的 (参见 Greenwood JA,Theibert AB,Prestwich GD,以及 Murphy_Ullrich JE 于 2000 年在 J Cell Biol《细胞生物学杂志》150(3):627-42 中发表的文章 Restructuring of focal adhesion plaque by pi 3-kinase.Regulation by ptdins(3,4,5)-p(3)binding to alpha-actinin《磷酸肌醇 3-激酶对于黏着斑的重新构造:结合于 α -辅肌动蛋白的 3-磷酸 3,4,5-磷脂酰肌醇的调节作用》以及 Murphy_Ullrich JE,Lightner VA,Aukhil I,Yan YZ,Erickson HP,以及 Hook M 于 1991 年在 J Cell Biol《细胞生物学杂志》115(4):1127-36 中发表的文章 Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin《作为选择的人固生蛋白的折叠结构域对于黏着斑完整性的去调节作用》)。然而,这三种蛋白分别具有独特的受体并且具有相类似的但是相互分别的信号途径,用以生成中间型黏附的状态,这一状态是细胞迁移的前兆 (参见 Murphy-Ullrich JE 于 2001 年在 J Clin Invest《临床研究杂志》107(7):785-90 中发表的文章 The de-adhesive activity of matricellular proteins:Is intermediate cell adhesion an adaptive state?《基质细胞蛋白的脱黏附活性:中间型细胞黏附是一种适应性的状态么?》)。有丝分裂原诱导基因 -2 以及整合素连接激酶也被暗含在细胞黏附作用中 (参见 Nikolopoulos SN 以及 Turner CE 于 2001 年在 The Journal of Biological Chemistry《生物化学杂志》276(26):23499-505 中发表的文章 Integrin-linked kinase(ILK)binding to paxillin

ldlmotif regulates ilk localization to focal adhesions《结合于桩蛋白ldl半族的整合素连接激酶对于整合素连接激酶在黏着斑上的定位的调节》以及Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K,以及Wu C于2003年在Cell《细胞》113:37-47中发表的文章Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation《Migfilin基因以及有丝分裂原诱导基因-2对于黏着斑与细丝蛋白以及肌动蛋白细胞骨架的连接,及其调节细胞形状的功能》)。具体的,已经表明有丝分裂原诱导基因-2参与了细胞基质黏附与肌动蛋白细胞骨架的连接,并且调节细胞形状(参见Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K,以及Wu C于2003年在Cell《细胞》113:37-47中发表的文章Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation《Migfilin基因以及有丝分裂原诱导基因-2对于黏着斑与细丝蛋白以及肌动蛋白细胞骨架的连接,及其调节细胞形状的功能》)。近来的研究已经指明,整合素连接激酶在整合素介导的信号转导中起到媒介剂(mediator)的作用(参见Wu c于1999年在Journal of Cell Science《细胞科学杂志》112(Pt 24第24部分):4485-9中发表的文章Integrin-linked kinase and pinch:Partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction《整合素连接激酶与pinch蛋白:调节细胞-胞外基质间相互作用以及信号转导的伙伴》)。此外,在黏着斑的保持过程中同时需要有丝分裂原诱导基因-2以及整合素连接激酶(参见Nikolopoulos SN以及Turner CE于2001年在The Journal of Biological Chemistry《生物化学杂志》276(26):23499-505中发表的文章Integrin-linked kinase(ilk)binding to paxillin ld 1 motif regulates ilk localization to focal adhesions《结合于桩蛋白ldl半族的整合素连接激酶对于整合素连接激酶在黏着斑上的定位的调节》以及Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K,以及Wu c于2003年在Cell《细胞》113:37-47中发表的文章Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation《Migfilin基因以及有丝分裂原诱导基因-2对于黏着斑与细丝蛋白以及肌动蛋白细胞骨架的连接,及其调节细胞形状的功能》)。通过检查固生蛋白-C(TN-C),血小板反应素(TSP),富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC),有丝分裂原诱导基因-2(Mig-2),以及整合素连接激酶(ILK)的水平变化,我们确信能够对于存在于所述的静脉片段内的平滑肌细胞的黏附状态做出结论。附图2中表示的是用于描述固生蛋白-C(TN-C),血小板反应素(TSP),富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC),有丝分裂原诱导基因-2(Mig-2),以及整合素连接激酶(ILK)在细胞内的位置的示意图。

[0018] 平滑肌细胞的体内迁移的一个先决条件是周围基质蛋白的降解。基质金属蛋白酶(具体的,基质金属蛋白酶-1,基质金属蛋白酶-2,以及基质金属蛋白酶-9)可以选择性的降解所述的血管细胞外间质(ECM)中的各种组分(参见Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon_Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E,以及Libby P于1994年在Circulation Research(Online)《循环研究(在线)》75(1):181-9中发表的文章Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion《利用细胞因子刺激性人类血管平滑肌细胞合成胞外基质消化所需的酶的补体》;Newby AC, Southgate KM,以及Davies MG于1994年在Basic Res Cardiol《心脏病学的基础研究》89(增刊

1):59-70 中发表的文章 Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis 《在动脉硬化症发病机理中的胞外基质降解金属蛋白酶》;Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickinson T, Thompson MM, 以及 London JM 于 2002 年在 J. Vasc. Surg. 《血管外科学杂志》36:150-7 中发表的文章 Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration 《辛伐他汀经由对平滑肌细胞的增殖以及迁移的抑制作用抑制人类隐静脉新生内膜的形成》;以及 Southgate KM, Davies M, Booth RF, 以及 Newby AC 于 1992 年在 Biochem J. 《生物化学杂志》288(Pt1 第 1 部分):93-9 中发表的文章 Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation 《在兔大动脉平滑肌细胞的增殖中涉及到的胞外-基质-降解金属蛋白酶》)。已经证明基质金属蛋白酶 (MMP) 对于动脉损伤的形成而言是至关重要的,这是通过其对平滑肌细胞的迁移的调节来实现的。基质金属蛋白酶,它们的激活剂(膜型-1 基质金属蛋白酶)(参见 Lafleur MA, Holloenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, 以及 Edwards DR 于 2001 年在 Biochem J. 《生物化学杂志》357(Pt 1 第 1 部分):107-15 中发表的文章 Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-mmp-2) by thrombin is membrane-type-mmp-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63kda active species 《在人类脐静脉内皮细胞中利用凝血酶对基质金属蛋白酶酶原-2(pro-mmp-2) 的活化作用是膜型基质金属蛋白酶依赖性的,并且生成一种独特的 63kda 的活性种类》),以及它们的抑制剂(具体的,是金属蛋白酶组织抑制剂-1,金属蛋白酶组织抑制剂-2,金属蛋白酶组织抑制剂-3,以及金属蛋白酶组织抑制剂-4)之间的平衡关系决定了细胞外间质的降解水平(参见 Meng X, Mavromatis K, 以及 Galis ZS 于 1999 年在 Exp Mol Pathol 《试验分子病理学》66(3):227-37 中发表的文章 Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair 《人类隐静脉嫁接物的机械应力能够诱发与血管组织的损伤以及修复相关基质降解酶的表达以及活化》)。许多项研究已经表明,基质金属蛋白酶 (MMP) 以及金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 在内膜增生的早期阶段对应答于改变的血液动力学环境以及血管损伤起到了重要的作用(参见 George SJ, Baker AH, Angelini GD, 以及 Newby AC 于 1998 年在 Gene Ther. 《基因治疗》5(11):1552-60 中发表的文章 Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits metalloproteinase activity and neointima formation in human saphenous veins 《人类隐静脉中的金属蛋白酶-2 组织抑制剂的基因转移对于金属蛋白酶活性以及新生内膜形成的抑制》;George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, 以及 Baker AH 于 1998 年在 Hum Gene Ther. 《人类基因治疗》9(6):867-77 中发表的文章 Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein 《在人类隐静脉中所述的人类金属蛋白酶组织抑制剂-1 基因的腺病毒介导的基因转移对平滑肌细胞的迁移以及新生内膜的形成所起到的抑制作用》;以及 Lijnen HR, Soloway P, 以及 Collen D 于 1999 年在 Circ Res. 《循环研究》85(12):1186-91 中发表的文章 Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial

neointima formation after vascular injury in mice 《基质金属蛋白酶-1 组织抑制剂对于小鼠静脉损伤后的动脉新生内膜的形成的削弱作用》)。例如,在经历过 6 小时的动脉血液动力学灌注之后,人类隐静脉中的基质金属蛋白酶-2 以及基质金属蛋白酶-9 的表达增加了(参见 Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, 以及 Galis ZS 于 2000 年在 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 《动脉硬化症,血栓症以及血管生物学》20(8): 1889-95 中发表的文章 *Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo* 《动脉血液动力学环境对于人类隐静脉体外灌注的早期影响》)。对于人类隐静脉的其他器官培养研究已经表明,在动脉环境下,基质金属蛋白酶-9 的产量增加并且基质金属蛋白酶-2 的活性增强(参见 Porter KE, Thompson MM, Loftus IM, McDermott E, Jones L, Crowther M, Bell PR, 以及 London NJ 于 1999 年在 *Eur J Vasc Endovasc Surg* 《欧洲血管以及内皮血管外科学杂志》17(5):404-12 中发表的文章 *Production and inhibition of the gelatinolytic matrix metalloproteinases in a human model of vein graft stenosis* 《在人类静脉嫁接物器官狭窄模型中的液化明胶基质金属蛋白酶的生产以及抑制》;Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, 以及 London JM 于 2002 年在 *J. Vasc. Surg.* 《血管外科学杂志》36:150-7 中发表的文章 *Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration* 《辛伐他汀经由对平滑肌细胞的增殖以及迁移的抑制作用抑制人类隐静脉新生内膜的形成》;以及 George SJ, Zaltsman AB, 以及 Newby AC 于 1997 年在 *Cardiovasc Res.* 《心脏血管学研究》33(2):447-59 中发表的文章 *Surgical preparative injury and neointima formation increase MMP-9 expression and MMP-2 activation in human saphenous vein* 《在人类隐静脉中外科学预备性损伤以及新生内膜的形成对于基质金属蛋白酶-9 的表达的增加以及基质金属蛋白酶-2 的活性的增加》)。已经证明超广谱基质金属蛋白酶抑制剂例如辛伐他汀能够抑制这一模型中的新生内膜的形成(参见 Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, 以及 London JM 于 2002 年在 *J. Vasc. Surg.* 《血管外科学杂志》36:150-7 中发表的文章 *Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration* 《辛伐他汀经由对平滑肌细胞的增殖以及迁移的抑制作用抑制人类隐静脉新生内膜的形成》;以及 Porter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, 以及 Thompson MM 于 1998 年在 *Br J Surg.* 《英国外科学杂志》85(10):1373-7 中发表的文章 *Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis* 《马立马司他在人类静脉嫁接物器官狭窄模型中对于新生内膜增厚的抑制作用》)。

[0019] 机械力量可以通过对上述因素的直接调节来影响平滑肌细胞的脱黏附以及迁移。例如,与静态对照相比,被暴露于脉冲压力中的静脉平滑肌细胞中的基质金属蛋白酶-1 的表达是升高的(参见 Redmond EM, Cahill PA, Hirsch M, Wang YN, Sitzmann JV, 以及 Okada SS 于 1999 年在 *Thrombosis&Haemostasis* 《血栓症与止血法》81(2):293-300 中发表的文章 *Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: The role of urokinase and matrix metalloproteinase* 《脉冲压力对于血管平滑肌细胞的迁移所起到的作用:尿激酶以及基质金属蛋白酶的作用》),同时被暴露于循环应力中

的小鼠平滑肌细胞中的基质金属蛋白酶-2 mRNA 的水平是升高的（参见 Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, 以及 Schieffer B 于 2003 年在 *Circulation Research* 《循环学研究》92(11):80-6 中发表的文章 Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via nad(p)h oxidase-derived reactive oxygen species 《机械应力通过来源于 nad(p)h 氧化酶的活性氧组分增强 mRNA 的表达以及基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 酶原的释放》)。在经过培养的来自于人类隐静脉的平滑肌细胞中, 当被暴露于单轴向固定应变力中时, 基质金属蛋白酶-2 以及基质金属蛋白酶-9 的转录以及蛋白的水平升高, 但将被暴露于单轴向循环应变力中时, 上述水平是降低的（参见 Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, 以及 Galis ZS 于 2003 年在 *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 《美国生理学杂志: 心脏循环生理学》284(5):H1778-84 中发表的文章 Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells 《单轴向应变力对于由人类血管平滑肌细胞所生成的基质降解酶的上调节作用》)。已经证明成纤维细胞的循环应变力能够增加膜型-1 基质金属蛋白酶的水平（参见 Tyagi SC, Lewis K, Pikes D, Marcello A, Mujumdar VS, Smiley LM, 以及 Moore CK 于 1998 年在 *J Cell Physiol* 《细胞生理学杂志》176(2):374-82 中发表的文章 Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells 《心脏成纤维细胞中应力诱导的模型基质金属蛋白酶以及组织血纤维蛋白溶酶原激活剂》）【166】并且降低金属蛋白酶组织抑制剂-1 的水平（参见 Yamaoka A, Matsuo T, Shiraga F, 以及 Ohtsuki H 于 2001 年在 *Ophthalmic Research* 《眼科学研究》33(2):98-101 中发表的文章 Timp-1 production by human scleral fibroblast decreases in response to cyclic mechanical stretching 《人类巩膜成纤维细胞为应答于循环机械应力而导致的金属蛋白酶组织抑制剂-1 的产量的减少》)。除此之外, 已经表明, 平滑肌细胞的迁移受到剪切应力诱导的内皮细胞 (EC) 信号的调节（参见 Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, 以及 Glagov S 于 1998 年在 *Journal of Vascular Surgery* 《血管外科学杂志》27(5):910-8 中发表的文章 Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury 《急性试验性动脉损伤后低流速对于血小板活性的增强作用》; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, 以及 Shigematsu H 于 2000 年在 *Int Angiol* 《国际血管学》19(2):142-6 中发表的文章 Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets 《由剪切负荷的血小板以及内皮细胞诱发的平滑肌细胞的迁移: 剪切负荷的血小板引起的血小板衍生生长因子产量的增加》; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, 以及 Sumpio BE 于 1996 年在 *Journal of Vascular Surgery* 《血管外科学杂志》24(1):51-7 中发表的文章 Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration 《平滑肌细胞迁移的内皮控制的基质特异性作用》; 以及 Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, 以及 Muto T 于 2000 年在 *Int Angiol* 《国际血管学》19(1):39-46 中发表的文章 Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell 《脉动剪切应力对于平滑肌细胞的直接作用以及间接作用》)。机械力量可以通过对于上述因素的直接调节来影响平滑肌细胞的脱黏

附以及迁移。已经证明平滑肌细胞的迁移受到剪切应力诱导的内皮细胞 (EC) 信号的调节 (参见 Garanich JS, Pahakis M, 以及 Tarbell JM 于 2005 年在 *Am J Physiol Heart Circ Physiol*《美国生理学杂志:心脏循环生理学》288(5):H2244-52 中发表的文章 *Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulated of matrix metalloproteinase-2 activity*《剪切应力通过对基质金属蛋白酶-2 活性进行的含氮氧化物介导的去调节作用对平滑肌细胞的迁移进行的抑制》; Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, 以及 Glagov S 于 1998 年在 *Journal of Vascular Surgery*《血管外科学杂志》27(5):910-8 中发表的文章 *Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury*《急性试验性动脉损伤后低流速对于血小板活性的增强作用》; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, 以及 Shigematsu H 于 2000 年在 *Int Angiol.*《国际血管学》19(2):142-6 中发表的文章 *Smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets*《由剪切负荷的血小板以及内皮细胞诱发的平滑肌细胞的迁移:剪切负荷的血小板引起的血小板衍生生长因子产量的增加》; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, 以及 Sumpio BE 于 1996 年在 *Journal of Vascular Surgery*《血管外科学杂志》24(1):51-7 中发表的文章 *Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration*《平滑肌细胞迁移的内皮控制的基质特异性作用》; Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, 以及 Muto T 于 2000 年在 *Int Angiol.*《国际血管学》19(1):39-46 中发表的文章 *Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell*《脉动剪切应力对于平滑肌细胞的直接作用以及间接作用》; 以及 Sho M, Sho E, Singh TM, Komatsu M, Sugita A, Xu C, Nanjo H, Zarins CK, 以及 Masuda H 于 2002 年在 *Exp Mol Pathol*《试验分子病理学》72(2):150-60 中发表的文章 *Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell proliferation and migration*《低于正常的剪切应力诱导的内膜增厚需要中层平滑肌细胞的增殖以及迁移》)。

[0020] 增殖

[0021] 几种生长因子作为重要的组分被暗含在静脉嫁接物的增生应答中。转化生长因子 β (TGF- β) 似乎占有格外重要的地位。例如, Wolf 等人已经证明, 在大鼠模型中全身性的施用针对转化生长因子 β 的抗体能够显著的降低内膜增生的发展 (参见 Wolf YG, Rasmussen LM, 以及 Ruoslahti E 于 1994 年在 *J Clin Invest*《临床调查杂志》93(3):1172-8 中发表的文章 *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*《针对转化生长因子- β 1 的抗体抑制大鼠模型中的内膜增生》)。血小板衍生生长因子 (PDGF) 以及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 同样被认为是在与平滑肌细胞的增殖相关的内膜增生中涉及到的重要的因素。例如, 血小板衍生生长因子能够在经过培养的平滑肌细胞中引发剂量依赖性增殖应答 (参见 Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, 以及 Ueda T 于 2000 年在 *Atherosclerosis*《动脉硬化症》149(1):51-9 中发表的文章 *The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells*《蛋白-酪氨酸的磷酸化以及白凝胶酶的生产在平滑肌细胞的迁移以及增殖中所起

到的作用》),而转化生长因子 β 抑制增殖(参见 Mii S, Ware JA, 以及 Kent KC 于 1993 年在 Surgery 《外科学》114(2):464-70 中发表的文章 Transforming growth factor-beta inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration 《转化生长因子- β 对于人类血管平滑肌细胞的生长以及迁移所产生的抑制作用》)。从自身同源性静脉嫁接物的死亡细胞以及受损细胞中释放出来的碱性成纤维细胞生长因子促进平滑肌细胞的增殖(参见 Qian H, Zhang B, 以及 Zhao H 于 1996 年在 Zhonghua Yi Xue Za Zhi 《中华医学杂志》76(11):826-8 中发表的文章 gene expression of bfgf and intimal hyperplasia of autologous vein grafts in rats 《大鼠自身同源性静脉嫁接物中碱性成纤维细胞生长因子的基因表达以及内膜增生》)。在猪静脉嫁接物的新生内膜中发现了最高水平的血小板衍生生长因子的 mRNA 水平以及增殖细胞的数量(参见 Francis SE, Hunter S, Holt CM, Gadsdon PA, Rogers S, Duff GW, Newby AC, 以及 Angelini GD 于 1994 年在 J Thorac Cardiovasc Surg. 《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》108(3):540-8 中发表的文章 Release of platelet-derived growth factor activity from pig venous arterial grafts 《猪静脉动脉嫁接物中血小板衍生生长因子的释放》)。尽管生长因子在内膜增生中起到了明显的作用,基质金属蛋白酶也在动脉损伤的形成中起到了至关重要的作用,这一作用是通过调节平滑肌细胞的增殖来实现的(参见 Southgate KM, Davies M, Booth RF, 以及 Newby AC 于 1992 年在 Biochem J. 《生物化学杂志》288(Pt 1 第 1 部分):93-9 中发表的文章 Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation 《在兔大动脉平滑肌细胞的增殖中涉及到的胞外-基质-降解金属蛋白酶》;以及 Cho A 与 Reidy MA 于 2002 年在 Circ Res. 《循环学研究》91(9):845-51 中发表的文章 Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury 《在动脉损伤之后基质金属蛋白酶-9 对于调节平滑肌细胞的复制以及迁移的必要性》),而已经表明金属蛋白酶组织抑制剂能够促进平滑肌细胞的凋亡(参见 Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, 以及 Beliveau R 于 2002 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》35(3):539-46 中发表的文章 Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms 《对腹部大动脉动脉瘤中的基质金属蛋白酶活性进行的微分调节》)。

[0022] 已经证明内膜增生与平滑肌细胞的增殖的增加以及细胞凋亡的增加以及减少相关。内膜凋亡的增加像是反直观的与内膜增生相关,其中所述的内膜增生是一种与细胞数量增加相关的现象。然而,必须记住的是细胞数量的增加仅仅是调节内膜增生的平衡中的一个异常事件(a singular event)。事实是,尽管在细胞凋亡的数量上存在绝对的增加,但细胞增殖方面的更高程度的增加可能导致细胞数量的净增。因为这些原因,当对增殖进行评价时,对于所述平衡的两个方面(即,促进因素以及抑制因素)同时进行评价是重要的。

[0023] 增殖细胞核抗原(PCNA)以及末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记(TUNEL)分别被用来在完整的静脉动脉嫁接物中通过体内方式(参见 Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, 以及 Yasuda K 于 2002 年在 Int Angiol. 《国际血管学》21(3):250-5 中发表的文章 Induction of angiotensin converting

enzyme in neointima after intravascular stent placement《放置血管内支架之后血管紧张素转换酶的诱导作用》)以及体外方式(参见 Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Mahidhara RS, Kim PK, Taylor BS, 以及 Tzeng E 于 2003 年在 J Vasc Surg《血管外科学杂志》38(4):812-9 中发表的文章 Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation《变异的 κB 抑制剂 α 的过表达对于血管平滑肌细胞的增殖以及内膜增生的形成的抑制作用》)对增殖细胞以及凋亡细胞进行标记。细胞的增殖以及凋亡是同时发生的过程,这两个过程在嫁接之后的第一周时间里发生在所述静脉的外膜以及中层中,然而在此之后由于增殖的速率增长超过了凋亡的速率,因此这种平衡被破坏(参见 Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, 以及 Yasuda K 于 2002 年在 Int Angiol.《国际血管学》21(3):250-5 中发表的文章 Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement《放置血管内支架之后血管紧张素转换酶的诱导作用》)。已经证明,与未变窄的对照组相比,在二次手术中切离的变窄的冠状动脉搭桥(旁路)嫁接物中层以及新生内膜中的增殖水平显著的升高(参见 Hilker M, Buerke M, Lehr HA, Oelert H, 以及 Hake U 于 2002 年发表的文章 Bypass graft disease: Analysis of proliferative activity in human aorto-coronary bypass grafts《旁路嫁接疾病:对人类冠状动脉旁路嫁接物的增殖活性的分析》5 Suppl(增刊)4:S331-41)。

[0024] 室壁应力的增加与动脉静脉嫁接物的内膜增生相关,这可能是对于平滑肌细胞的增殖以及凋亡所进行的机械调节的直接结果。例如,与动脉平滑肌细胞相比,当将静脉平滑肌细胞暴露于动脉水平的循环应力中时,所述的静脉平滑肌细胞已经表现出了增殖现象的增强(参见 Predel HG, Yang Z, von Segesser L, Turina M, Buhler FR, 以及 Luscher TF 于 1992 年在 Lancet《柳叶刀》340(8824):878-9 中发表的文章 Implications of pulsatile stretch in growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle《脉动应力对于隐静脉以及乳腺动脉平滑肌的生长的暗含意义》以及 Dethlefsen SM, Shepro D, 以及 D'Amore PA 于 1996 年在 J Vasc Res.《血管研究杂志》33(5):405-13 中发表的文章 Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro《机械刺激对于体外静脉平滑肌细胞以及动脉平滑肌细胞的作用的比较》)。Liu 等人已经证明,通过溴脱氧尿苷染色以及末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记(TUNEL)分析可知,在大鼠静脉动脉嫁接物模型中,由于动脉血液动力学所引发的机械应力能够诱导细胞的死亡,这可能介导随后的细胞增殖(参见 Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, 以及 Kent KC 于 2002 年在 Surgery《外科学》132(2):317-25 中发表的文章 The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation《信号蛋白 rho 是血管平滑肌迁移并且存活的必要因素但不是增殖的必要因素》)。Predel 等人已经证明,脉动应力能够刺激隐静脉中的平滑肌细胞的增殖,但不能刺激内乳动脉中的平滑肌细胞的增殖,并且其可能构成静脉旁路嫁接疾病(参见 Predel HG, Yang Z, von Segesser L, Turina M, Buhler FR, 以及 Luscher TF 于 1992 年在 Lancet《柳叶刀》340(8824):878-9 中发表的文章 Implications of pulsatile stretch in growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle《脉动应力对于隐静脉以及乳腺动脉平滑肌的生长的暗含意义》)。

当静脉被转置于所述的动脉循环中时,它们除了需要经受内部应力 (intramural stress) 之外,还需要经受管腔 (luminal) 剪切应力的增加。事实上已经证明,施加于经过培养的平滑肌细胞之上的增加的剪切应力以及循环应力的组合激活了血小板衍生生长因子受体 α (参见 Hu Y, Bock G, Wick G, 以及 Xu Q 于 1998 年在 Faseb J. 《美国实验生物学学会联合会官方出版物》12(12):1135-42 中发表的文章 Activation of pdgf receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress 《机械应力对血管平滑肌细胞中的血小板衍生生长因子受体 α 的活化作用》) 【192】。

[0025] 重塑

[0026] 血管的重塑通常指的是血管为了应答于所处的生物机械环境的变化而发生的形态学上或者微观结构的改变。可以确信,这一现象的发生是所述的组织为恢复生物机械学动态平衡所作的尝试 (即,还原为正常水平的剪切应力以及室壁应力)。在动脉静脉嫁接物的情形中,内膜增生属于重塑的一种病态形式,其包括由平滑肌细胞的迁移以及增殖所引起的内膜厚度的增加,内膜凋亡的增加,由细胞外间质沉积的增加所引起的内膜以及中层的变窄,以及中层平滑肌细胞以及外膜平滑肌细胞的过度增大。

[0027] 血管细胞生成了所述细胞外间质的组分,例如骨胶原以及弹性蛋白。已经表明,与静脉嫁接相关的平滑肌细胞的表型转化通过增加 I 型骨胶原以及弹性蛋白的产量而改变了细胞外间质的合成。用作动脉旁路嫁接物的静脉经受着它们的细胞外间质的组分上的改变,这可能导致内腔面积的损失以及最终的闭塞。在由球囊血管成形术造成的损伤过后的第一周时间里,基质合成方面的改变直接导致增生性新生内膜中的骨胶原含量的增加。除此之外,与新鲜的静脉相比,经受过这种增生性重塑的动脉静脉嫁接物表现出降低的顺应性,这可能导致它们的失效。

发明内容

[0028] 建立一种可靠的用于预防所述的内膜增生 (IH) 过程中的早期事件的方法将导致动脉搭桥操作的改进。因此,这里提供了一种对动脉静脉嫁接物或者任意的管状组织 (有生命的细胞结构) 进行机械性调节的方法,通常,但不排外的,用于自身同源性、同种异源性、异种性移植操作中。为了这一目的,这里提供了一种覆盖管状组织的方法,所述的管状组织不局限于,静脉,动脉,尿道,肠道,食道,气管,支气管,输尿管以及输卵管。所述的管状组织在其周围被生物可消化性 (也被称为生物可降解性或者生物可再吸收性) 聚合物的限制性纤维矩阵所覆盖。在一种非限制性的实施方式中,所述的矩阵通过静电纺作用被沉积于管状组织之上。在一种具体的非限制性实施方式中,所述的管状组织是静脉,例如是隐静脉,其被用在例如动脉搭桥操作中,例如冠状动脉搭桥操作中。

[0029] 可以对所述聚合物矩阵的生物降解速率进行操纵、优化或者调整,这样一来所述的矩阵在超过使用寿命之后发生降解。例如,在冠状动脉搭桥的情况中,期望所述的矩阵在 12 小时或者更长时间之后发生溶解,用以防止所述嫁接物上的巨大的骤加应力。所述的聚合物在经过一段期望的时间之后发生降解,这样一来在这段时间内由所述的聚合物矩阵提供的机械支撑逐渐的减少,并且所述的静脉能够被暴露于逐渐增加的周向室壁应力水平中。

[0030] 这种新的方法可能具有两种潜在的用途。在第一种非限制性用途中,所述的矩阵

可以作为一种围手术期 (peri-surgical) 的工具,对打算作为动脉静脉嫁接物的静脉片段进行修饰。可以通过在临床床边 (bedside) 对刚刚从机体中分离出来的静脉或者对马上要进行嫁接的静脉进行处理,来实现对所述的静脉或者其他管状解剖学结构的修饰,例如但不局限于,在动脉搭桥外科手术中进行。在一个非限制性的实施例中,当提取到所述的隐静脉之后,并且当所述的外科医生看到所述的外科手术位点时,在将所述的静脉应用于搭桥操作之前,通过静电纺作用向所述静脉上覆盖所述的聚合物。

[0031] 在第二种非限制性的实施方式中,所述的聚合物矩阵可以作为一种新的媒介,用于为动脉静脉嫁接物传递支撑。尽管随着时间的过去静脉嫁接物的机械环境的修饰本身能够改善动脉静脉嫁接物的开放性,但在许多情况下可以证实向动脉静脉嫁接物传递活性试剂以及生物学(细胞)支撑是期望的。通过对导入了活性试剂和/或生物学物质的静电纺聚合物覆盖物进行调整,使其以期望的速率发生降解,可以控制传递这些支撑形态的速率。

[0032] 根据一种实施方式,提供了一种管状组织嫁接装置。所述的装置包括一种管状组织以及在所述的管状组织周围的生物可消化性聚合物的限制性纤维矩阵。所述的矩阵通常是连续的或者是基本连续的,沿所述管状组织的至少一部分的周界。在一种实施方式中,所述的管状组织是从静脉获得的(是静脉的),例如并且不局限于,所述的静脉管状组织来自于隐静脉的一部分。在另外的实施方式中,所述的管状组织选自(来自于一种器官/组织,所述的器官/组织选自)下述中的一种或者多种:动脉,尿道,肠道,食道,输尿管,气管,支气管,以及输卵管。所述的装置中的矩阵通常能够在经过一段时间后在原地(当被植入时)发生生物消化,所述的一段时间是从12小时至两周的时间,这意味着在这段时间过后所述矩阵的支撑性质发生减退,但所述矩阵的完全消化不是必要的。

[0033] 在一种实施方式中,通过在所述的管状组织上利用静电纺作用放置所述的聚合物纤维来制备所述的装置。所述的聚合物纤维可以包括任何有效的生物可消化性的聚合物组分。在一种实施方式中,如下所示,所述的纤维包括一种包含酯以及氨基甲酸酯键(urethane linkage)的聚合物,包括例如并且不局限于聚酯型聚氨酯。在其他的实施方式中,所述的纤维包括一种选自下述物质中的一种或者多种的聚合物:来源于 α -羟基酸的聚合物,聚丙交酯,聚丙交酯-聚乙醇酸共聚物,聚L-丙交酯-聚己内酯共聚物,聚乙醇酸,聚DL-丙交酯-聚乙醇酸共聚物,聚L-丙交酯-聚DL-丙交酯共聚物,包括内酯单体的聚合物,聚己酸内酯,包括碳酸连接键的聚合物,聚碳酸酯,聚葡萄糖酸酯,聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯共聚物,聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯-聚二氧杂环己酮共聚物,包括氨基甲酸酯键的聚合物,聚亚安酯,聚酯型聚氨酯,聚酯型聚氨酯弹性体,包括酯键的聚合物,聚链烷酸酯,聚羟基丁酸盐,聚羟基戊酸盐,聚二氧杂环己酮,聚凝结素,天然聚合物,壳聚糖,骨胶原,弹性蛋白,藻酸盐,纤维素,透明质酸以及凝胶。在一种实施方式中,所述的聚合物组分包括含有大约25%重量至大约75%重量的骨胶原的聚酯型聚氨酯。这种聚合物还可以包括弹性蛋白,例如但不局限于含有大约25%重量至大约75%重量的骨胶原与弹性蛋白的混合物,其中所述的骨胶原与弹性蛋白在一种实施方式中以大约相等的量存在。

[0034] 在另外一种实施方式中,在所述的矩阵上关联(接触,吸附,吸收,植入,连接,等等)细胞以及治疗试剂(例如,药物,细胞因子,趋化因子,抗生素,抗炎剂,等等)中的一种或者两种。在一种实施方式中,将细胞与所述的矩阵进行关联,所述的与矩阵相关联的细胞是例如但不局限于选自下述细胞中的一种或者多种:干细胞,祖细胞(前体细胞),平

滑肌细胞,骨骼肌成肌细胞,心肌细胞,内皮细胞,内皮祖细胞,骨髓间质细胞以及遗传修饰的细胞。在另外一种实施方式中,在所述的矩阵上关联一种生长因子,所述的生长因子是例如但不局限于选自下述生长因子中的一种或者多种的生长因子:碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),酸性成纤维细胞生长因子(aFGF),血管内皮生长因子(VEGF),肝细胞生长因子(HGF),胰岛素样生长因子(IGF),转化生长因子- β 多效生长因子(pleiotrophin)蛋白,沉默中期因子(midkine)蛋白以及胰岛素样生长因子-1。在另外一种实施方式中,在所述的矩阵上关联一种药物。在某些非限制性的实施方式中,所述的药物选自下述药物中的一种或者多种:非类固醇型抗炎药,抗生素,抗凝血因子,免疫抑制剂,糖肾上腺皮质激素,作用于免疫亲和素的药物,干扰素,肿瘤坏死因子(TNF)结合蛋白,紫杉烷(taxane),他汀类(statin),以及含氮氧化物供体。在其他实施方式中,所述的药物选自下述物质中的一种或者多种:非类固醇类抗炎药(NSAID),水杨酸,茚甲新,三水合茚甲新钠,水杨酰胺,萘普生,秋水仙碱,苯氧布洛芬,舒林酸(sulindac),双氟尼酸(diflunisal),双氯芬酸(diclofenac),吲哚布洛芬钠水杨酰胺,抗炎细胞因子,抗炎蛋白,类固醇类抗炎试剂,肝磷脂,Pebac,伊诺肝素,阿司匹林,水蛭素,波利维(plavix),比伐卢定(bivalirudin),普拉格雷(prasugrel),艾卓肝素(idraparinux),法华林(warfarin),可密定(coumadin),氯吡格雷(clopidogrel),PPACK,GGACK,组织血纤维蛋白溶酶原激活剂,尿激酶,链激酶,糖(肾上腺)皮质激素,氢化可的松,倍他米松(betamethasone),地塞米松,氟米松,异氟泼尼龙,甲基强的松龙,强的松,强的松龙,曲安奈得(triamcinolone acetonide),血管生成剂,氟尿嘧啶,紫杉醇,多柔比星,顺铂,甲氨蝶呤,环磷酰胺,依托泊苷,哌加它尼,lucentis,色氨酸-tRNA合成酶,retene,CA4P,腺病毒介导的色素上皮细胞衍生因子(AdPEDF),血管内皮生长因子TRAP-EYE(VEGF-TRAP-EYE),AG-103958,阿瓦斯汀(Avastin),JSM6427,TG100801,自噬相关蛋白3(ATG3),OT-551,内皮抑制素,萨利多胺(thalidomide),贝伐单抗(becacizumab),新伐司他(neovastat),抗增殖剂,西罗莫斯(sirolimus),紫杉醇,紫苏醇,法尼基转移酶抑制剂,法尼基蛋白转移酶III(FPTIII),L774,抗增殖因子, Van 10/4,多柔比星,5-氟尿嘧啶(5-FU),柔红霉素,丝裂霉素,地塞米松,咪唑硫嘌呤,苯丁酸氮芥(chlorambucil),环磷酰胺,甲氨蝶呤,霉酚酸酯(mofetil),血管活性肠多肽,抗体,作用于免疫亲和素的药物,环孢霉素,zotarolimus,依维莫司(everolimus),他克莫司(tacrolimus),西罗莫司(sirolimus),干扰素,肿瘤坏死因子(TNF)结合蛋白,紫杉烷(taxane),紫杉醇(paclitaxel),多西他塞(docetaxel),他汀(statin),阿托伐他汀(atorvastatin),洛伐他汀(lovastatin),斯伐他汀(simvastatin),普伐他汀(pravastatin),氟伐他汀(fiuvastatin),罗苏伐他汀(rosuvastatin),含氮氧化物供体或者前体,Angeli's Salt, L-精氨酸,游离碱,二乙胺一氧化氮-亲核复合体,二乙胺一氧化氮-亲核复合体/AM, Glyco-SNAP-1, Glyco-SNAP-2, (+/-)-S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺, S-亚硝基谷胱甘肽, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, NOC-18, NOR-1, NOR-3, SIN-1, 盐酸, 硝普钠, 二水合物(Dihydrate), 精胺一氧化氮-亲核复合体, 链脲霉素, 抗生素, 阿昔洛韦(acyclovir), 氧氟沙星(ofloxacin), 氨苄西林(ampicillin), 两性霉素B(amphotericin B), 阿托喹酮(atovaquone), 阿奇霉素(azithromycin), 环丙沙星(ciprofloxacin), 克拉霉素(clarithromycin), 克林霉素(clindamycin), 氯法齐明(clofazimine), 氨苯砒(dapsone), 地克珠利(diclazuril), 强力霉素(doxycycline),

红霉素 (erythromycin), 乙胺丁醇, 氟康唑, 氟喹诺酮 (fluoroquinolones), 膦甲酸 (foscarnet), 更昔洛韦 (ganciclovir), 庆大霉素, 伊曲康唑, 异烟肼 (isoniazid), 酮康唑, 利氟星 (levofloxacin), 林可霉素 (lincomycin), 米康唑 (miconazole), 新霉素, 诺氟沙星, 氧氟沙星, 巴龙霉素 (paromomycin), 盘尼西林, 喷他脒 (pentamidine), 多粘菌素 B, 吡嗪酰胺, 乙胺嘧啶, 利福布汀 (rifabutin), 利福平 (rifampin), 司帕沙星 (sparfloxacin), 链霉素, 磺胺嘧啶, 四环素, 托普霉素, 三氟尿嘧啶核苷, 硫酸甲氧苄氨嘧啶, 心羟基吡啶硫酮, 以及银盐例如氯化银, 溴化银, 碘化银以及高碘酸银。

[0035] 这里还提供了一种用于制备管状嫁接物的方法, 所述的方法包括沿一种管状组织的周长 (外表面, 周界) 沉积一种生物可消化性聚合物的纤维矩阵, 从而制成一种管状组织嫁接装置。。所述的矩阵通常是连续的或者是基本连续的, 沿所述管状组织的至少一部分的周界。在一种实施方式中, 所述的矩阵是通过静电纺作用进行沉积的。如上所述, 所述的矩阵通常能够在经过一段时间后在原位发生生物消化, 所述的一段时间是从 12 小时至两周的时间。

[0036] 在一种实施方式中, 所述的管状组织是从静脉获得的, 例如并且不局限于, 所述的静脉管状组织来自于隐静脉的一部分。在另外的实施方式中, 所述的管状组织选自 (来自于一种器官 / 组织, 所述的器官 / 组织选自) 下述中的一种或者多种: 动脉, 尿道, 肠道, 食道, 输尿管, 气管, 支气管, 以及输卵管。

[0037] 所述的聚合物纤维可以包括任意有效的生物可消化性以及生物可相容性的聚合物组分。在一种实施方式中, 如下所示, 所述的纤维包括一种包含酯以及氨基甲酸酯键 (urethane linkage) 的聚合物, 包括例如并且不局限于聚酯型聚氨酯。在其他的实施方式中, 所述的纤维包括一种选自下述物质中的一种或者多种的聚合物: 来源于 α -羟基酸的聚合物, 聚交酯, 聚丙交酯-聚乙醇酸共聚物, 聚 L-丙交酯-聚己内酯共聚物, 聚乙醇酸, 聚 DL-丙交酯-聚乙醇酸共聚物, 聚 L-丙交酯-聚 DL-丙交酯共聚物, 包括内酯单体的聚合物, 聚己酸内酯, 包括碳酸连接键的聚合物, 聚碳酸酯, 聚葡萄糖酸酯, 聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯共聚物, 聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯-聚二氧杂环己酮共聚物, 包括氨基甲酸酯键的聚合物, 聚亚安酯, 聚酯型聚氨酯, 聚酯型聚氨酯弹性体, 包括酯键的聚合物, 聚链烷酸酯, 聚羟基丁酸盐, 聚羟基戊酸盐, 聚二氧杂环己酮, polyglactin, 天然聚合物, 壳聚糖, 骨胶原, 弹性蛋白, 藻酸盐, 纤维素, 透明质酸以及凝胶。在一种实施方式中, 所述的聚合物组分包括含有大约 25% 重量至大约 75% 重量的骨胶原的聚酯型聚氨酯, 包括在上述范围之内的递增量。这种聚合物还可以包括弹性蛋白, 例如但不局限于含有大约 25% 重量至大约 75% 重量的骨胶原与弹性蛋白的混合物, 其中所述的骨胶原与弹性蛋白在一种实施方式中以大约相等的量存在。

[0038] 在另外一种实施方式中, 所述的方法包括在所述的矩阵上关联 (接触, 吸附, 吸收, 植入, 连接, 等等) 细胞以及治疗试剂 (例如, 药物, 细胞因子, 趋化因子, 抗生素, 抗炎剂, 等等) 中的一种或者两种。在一种实施方式中, 将细胞与所述的矩阵进行关联, 所述的与矩阵相关联的细胞是例如但不局限于选自下述细胞中的一种或者多种: 干细胞, 祖细胞 (前体细胞), 平滑肌细胞, 骨骼肌成肌细胞, 心肌细胞, 内皮细胞, 内皮祖细胞, 骨髓间质细胞以及遗传修饰的细胞。在另外一种实施方式中, 在所述的矩阵上关联一种生长因子, 所述的生长因子是例如但不局限于选自下述生长因子中的一种或者多种的生长

因子:碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF),酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF),血管内皮生长因子 (VEGF),肝细胞生长因子 (HGF),胰岛素样生长因子 (IGF),转化生长因子- β 多效生长因子 (pleiotrophin) 蛋白,沉默中期因子 (midkine) 蛋白以及胰岛素样生长因子-1。在某些非限制性的实施方式中,所述的药物选自下述药物中的一种或者多种:非类固醇型抗炎药,抗生素,抗凝血因子,免疫抑制剂,糖肾上腺皮质激素,作用于免疫亲和素的药物,干扰素,肿瘤坏死因子 (TNF) 结合蛋白,紫杉烷 (taxane),他汀类 (statin),以及含氮氧化物供体。在其他的实施方式中,所述的药物选自下述物质中的一种或者多种:非类固醇类抗炎药 (NSAID),水杨酸,茛甲新,三水合茛甲新钠,水杨酰胺,萘普生,秋水仙碱,苯氧布洛芬,舒林酸 (sulindac),双氟尼酸 (diflunisal),双氯芬酸 (diclofenac),吲哚布洛芬钠水杨酰胺,抗炎细胞因子,抗炎蛋白,类固醇类抗炎试剂,肝磷脂,Pebac,伊诺肝素,阿司匹林,水蛭素,波利维 (plavix),比伐卢定 (bivalirudin),普拉格雷 (prasugrel),艾卓肝素 (idraparinux),法华林 (warfarin),可密定 (coumadin),氯吡格雷 (clopidogrel),PPACK,GGACK,组织血纤维蛋白溶酶原激活剂,尿激酶,链激酶,糖(肾上腺)皮质激素,氢化可的松,倍他米松 (betamethasone),地塞米松,氟米松,异氟泼尼龙,甲基强的松龙,强的松,强的松龙,曲安奈得 (triamcinolone acetonide),血管生成剂,氟尿嘧啶,紫杉醇,多柔比星,顺铂,甲氨蝶呤,环磷酰胺,依托泊苷,哌加它尼,lucentis,色氨酸-tRNA 合成酶,retene, cAMP,腺病毒介导的色素上皮细胞衍生因子 (AdPEDF),血管内皮生长因子 TRAP-EYE (VEGF-TRAP-EYE), AG-103958,阿瓦斯汀 (Avastin), JSM6427, TG100801,自噬相关蛋白 3 (ATG3), OT-551,内皮抑制素,沙利多胺 (thalidomide),贝伐单抗 (bevacizumab),新伐司他 (neovastat),抗增殖剂,西罗莫司 (sirolimus),紫杉醇,紫杉醇,法尼基转移酶抑制剂,法尼基蛋白转移酶 III (FPTIII), L774,抗增殖因子, Van 10/4,多柔比星,5-氟尿嘧啶 (5-Fu),柔红霉素,丝裂霉素,地塞米松,咪唑硫嘌呤,苯丁酸氮芥 (chlorambucil),环磷酰胺,甲氨蝶呤,霉酚酸酯 (mofetil),血管活性肠多肽,抗体,作用于免疫亲和素的药物,环孢霉素, zotarolimus,依维莫司 (everolimus),他克莫司 (tacrolimus),西罗莫司 (sirolimus),干扰素,肿瘤坏死因子 (TNF) 结合蛋白,紫杉烷 (taxane),紫杉醇 (paclitaxel),多西他赛 (docetaxel),他汀 (statin),阿托伐他汀 (atorvastatin),洛伐他汀 (lovastatin),斯伐他汀 (simvastatin),普伐他汀 (pravastatin),氟伐他汀 (fluvastatin),罗苏伐他汀 (rosuvastatin),含氮氧化物供体或者前体, Angeli's Salt, L-精氨酸,游离碱,二乙胺一氧化氮-亲核复合体,二乙胺一氧化氮-亲核复合体/AM, Glyco-SNAP-1, Glyco-SNAP-2, (+/-)-S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺, S-亚硝基谷胱甘肽, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, NOC-18, NOR-1, NOR-3, SIN-1, 盐酸,硝普钠,二水合物 (Dihydrate),精胺一氧化氮-亲核复合体,链脲霉素,抗生素,阿昔洛韦 (acyclovir),氧氟沙星 (ofloxacin),氨苄西林 (ampicillin),两性霉素 B (amphotericin B),阿托喹酮 (atovaquone),阿奇霉素 (azithromycin),环丙沙星 (ciprofloxacin),克拉霉素 (clarithromycin),克林霉素 (clindamycin),氯法齐明 (clofazimine),氨苯砞 (dapsone),地克珠利 (diclazuril),强力霉素 (doxycycline),红霉素 (erythromycin),乙胺丁醇,氟康唑,氟喹诺酮 (fluoroquinolones),膦甲酸钠 (fosfarnet),更昔洛韦 (ganciclovir),庆大霉素,伊曲康唑,异烟肼 (isoniazid),酮康唑,利氟星 (levofloxacin),林可霉素 (lincomycin),米康唑 (miconazole),新霉素,诺氟

沙星,氧氟沙星,巴龙霉素 (paromomycin),盘尼西林,喷他脒 (pentamidine),多粘菌素 B,吡嗪酰胺,乙嘧啶,利福布汀 (rifabutin),利福平 (rifampin),司帕沙星 (sparfloxacin),链霉素,磺胺嘧啶,四环素,托普霉素,三氟尿嘧啶核苷,硫酸甲氧苄氨嘧啶,心羟基吡啶硫酮,以及银盐例如氯化银,溴化银,碘化银以及高碘酸银。

[0039] 在另外一种实施方式中,提供了一种心脏搭桥方法,所述的方法包括利用一种管状动脉嫁接装置进行冠状动脉的搭桥,其中所述的管状动脉嫁接装置包括静脉以及沿所述静脉周围的连续的生物可消化性聚合物的限制性纤维矩阵。所述的连续的生物可消化性聚合物矩阵是如上所述的以及贯穿本说明书中的任意矩阵,并且可以包括如上所述的其他的治疗试剂。

附图说明

[0040] 附图 1:内膜增生过程的示意图。请注意:IEL 表示内弹性膜;SMC 表示平滑肌细胞。所述的图像是根据下述内容改写的:Robbins Pathologic Basis of Disease《罗宾病理学基础》,1999(参见 Kumar V, Fausto N, 以及 Abbas A 于 2004 年在 Saunders 发表的 Robbins&coltran pathologic basis of disease《罗宾病理学基础》)。

[0041] 附图 2:表示固生蛋白 -C(TN-C),血小板反应素 -1,2(TSP),富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白 (SPARC),有丝分裂原诱导基因 -2(Mig-2) 以及整合素连接激酶 (ILK) 的位置的示意图。请注意:ECM 表示细胞外间质; α 以及 β 表示干扰素。

[0042] 附图 3:一种闭合回路灌注 / 器官培养系统的示意图。所述的回路是由下述组件构成的:一个用以提供脉冲压力以及流体的 Biomedicus 离心泵 (A),一个热交换器 (D),一个组织容纳腔 (C),近端压力传感器 (B1) 以及远端压力传感器 (B2),一个可变电阻阀 (E),流体探针 (F),收集罐 (G),以及血管旁路 (H)。没有被表示出的组件包括:外膜浴环 (bath loop),氦 - 氖激光千分尺,以及数据获取系统。更多细节可以参见, Labadie(于 1996 年) 等人发表的文章 (Labadie, R. F., J. F. Antaki, J. L. Williams, S. Katyal, J. Ligush, S. C. Watkins, S. M. Pham, 以及 H. S. Borovetz 于 1996 年在 American Journal of Physiology《美国生理学杂志》270(2 Pt 2 第 2 部分):p. H760-8 中发表的文章“Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue《用于对完整血管组织的生物化学途径进行体外调查的脉冲灌注系统》”)。

[0043] 附图 4:猪颈内静脉片段的压力与直径的应答。

[0044] 附图 5:最顶端的三个控制板表示的是猪颈内静脉片段的内腔的基线对照(基线),“静脉”48 小时灌注对照(静脉的),以及“动脉”48 小时灌注(动脉的)代表性的扫描电子显微镜图像。需要注意的是完整的内皮细胞层的鹅卵石样的外观。第二行的三个控制板表示的是经过对每组进行的 H&E(苏木精 - 伊红)染色而观察到的代表性的微观结构以及存活的细胞核(200 倍放大)。第三行的三个控制板表示的是在每个组织基团中的代表性的存活细胞(初始为绿色)以及死亡细胞(初始为红色)(200 倍放大)。值得注意的是,当与基线对照组织进行比较时,在灌注组织中的坏死并没有表现出升高的水平。最底端的三个控制板表示的是经过了相同的 48 小时灌注试验后的组织的代表性的末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 检测图像(在油浸状态下的 400 倍

放大)。值得注意的是,当与基线对照进行比较时,在灌注组织中的细胞凋亡并没有表现出升高的水平。在所有的控制板中,所述的箭头指示的是血管内腔。

[0045] 附图 6:描述静脉 (VEN) 体外灌注试验以及动脉 (ART) 体外灌注试验的示意图。

[0046] 附图 7:描述动脉 (ART) 体外灌注试验以及经过调节的动脉 (cART) 体外灌注试验的示意图。

[0047] 附图 8:描述动脉 (ART) 体外灌注试验以及经过覆盖的动脉 (wART) 体外灌注试验的示意图。

[0048] 附图 9:表示所述的静脉 / 覆盖物复合体的横截面图像的示意图。

[0049] 附图 10:用于进行端点分析的灌注后的静脉片段的示意图。给出的长度表示的是未负载的血管的休眠长度 (resting length)。

[0050] 附图 11:对 sham 猪颈内静脉片段 (PIJVs) 以及 spun 猪颈内静脉片段进行的标准化猪颈内静脉片段外直径应答。spun 猪颈内静脉片段 (wART) 以及 sham 对照猪颈内静脉片段均在 120/80 毫米汞柱血压以及 100 毫升 / 分钟的平均流量的动脉条件下进行了灌注。值得注意的是,当与 sham 对照 ($N = 5$) 进行比较时,所述的 spun 静脉 ($N = 7$) 的标准化直径急剧减小。压缩外直径 (ODp) 被归一 (normalized) 至未压缩外直径 (ODup) 并且所表示的数据是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0051] 附图 12:对静电纺聚合物覆盖的猪颈内静脉 (PIJV) 片段进行了 24 小时的体外灌注后得到的周向室壁应力 (CWS) 与时间的图表,其中所述的聚合物具有表 1 中所示的每种组合。下方的虚线水平线表示的是在处于静脉环境下的未被覆盖的静脉中测量到的平均的周向室壁应力水平 (CWS₀ 为约 25KPa),而中间的虚线水平线表示的是冠状动脉的平均周向室壁应力 (大约 120KPa) (参见 Labadie RF 等人于 1996 年在 Am J Physiol. 《美国生理学杂志》270(2 Pt 2 第 2 部分):H760-8 中发表的文章 Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue 《用于对完整血管组织的生物化学途径进行体外调查的脉冲灌注系统》)。上方的虚线表示的是在处于动脉环境下的未被覆盖的静脉 (sham 对照) 中测量到的平均周向室壁应力。在所述的图例中,ET 表示的是静电纺时间。所有的周向室壁应力值被归一化 (normalized) 为 CWS₀。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0052] 附图 13:使用肾上腺素 (EPI) 以及硝普钠 (SNP) 刺激 spun 猪颈内静脉片段以及 sham 对照猪颈内静脉片段得到的代表性的血管收缩挑战结果。请注意,在利用肾上腺素进行刺激之后,一旦观察到所述组织发生的自然松弛,则立即施用硝普钠。即,在不同的时间对所述的 sham 猪颈内静脉以及 spun 猪颈内静脉 V 施用硝普钠,所述的时间取决于观察到所述组织发生自然松弛 (经过肾上腺素的刺激之后) 的时间。在上述试验的过程中对每种猪颈内静脉片段的外直径进行测量,并将所述的测量值利用所述的基线外直径进行归一化,其中所述的基线外直径是在第一次施用肾上腺素之前测量得到的。

[0053] 附图 14:来自于血管收缩挑战试验 ($N = 4$) 的结果。在所述的 sham 猪颈内静脉片段与 spun 猪颈内静脉片段中,看起来不存在收缩水平或者扩张水平上的显著差异。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0054] 附图 15:24 小时过后对 sham 猪颈内静脉片段 (A&C) 以及 spun 猪颈内静脉片段 (B&D) 的顺应性 (compliance) 以及 β -硬度的计算。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均

值的标准误差。

[0055] 附图 16 :在进行灌注之前并且经过覆盖操作之后 (A, C) 以及经过体外灌注的 24 小时后 (B, D) 的 H&E (苏木精 - 伊红染色) 成像 (A, B) 以及 Masson' s 三色染色成像 (C, D)。值得注意的是,在进行灌注之前所述的聚合物覆盖物具有均匀的厚度,并且在经过灌注之后的图像中不存在所述的聚合物覆盖物。所述的单向箭头指示的是血管内腔。在 (A) 以及 (c) 中所述的双向箭头指示的是所述的聚合物覆盖物的厚度,在 (B) 或者 (D) 中检测不到该数值。

[0056] 附图 17 :经过天狼猩红染色的静脉片段的代表性的双折射图像 (最初的颜色)。所述的试验条件如下所定义 :20 毫摩汞柱压力以及 20 毫升 / 分钟流速的静脉 (VEN) 环境 ; 120/80 毫米汞柱压力以及 100 毫升 / 分钟流速的动脉 (ART) 环境 ;以及经过覆盖的动脉 (wART) 环境,其中所述的被覆盖的静脉片段在动脉环境 xia 经历了 24 小时的体外灌注。所述的箭头指示的是血管内腔。

[0057] 附图 18 :静脉组织片段的 Movat' s 五色染色 (最初的颜色)。在每个图像中,骨胶原被染成黄色,弹性蛋白以及核被染成黑色,而肌肉被染成红色。所述的被覆盖的动脉片段的外膜侧上的红色染色是培养基蛋白的非特异性染色,其在体外灌注试验中被圈闭在所述的聚合物内。所述的箭头指示的是血管内腔。

[0058] 附图 19 : (A) 表示的是在外膜表面上沉积有静电纺聚合物的猪颈内静脉片段段的低倍放大扫描电子显微镜 (SEM) 图像。(B) 是在被施用了所述的聚合物覆盖之后的猪颈内静脉外膜表面的扫描电子显微镜 (SEM) 图像 (在 500 倍放大时获取的图像)。值得注意的是所述的聚合物覆盖物的高度多孔性。(C) 是表示出所述的聚合物覆盖物与所述静脉的连接扫描电子显微镜 (SEM) 图像 (在 500 倍放大时获取的图像)。(D) 是所述静脉的管腔表面 (luminal surface) 的扫描电子显微镜 (SEM) 图像 (在 500 倍放大时获取的图像),表示出的是一个看上去仍然保持完整的连续的内皮层。

[0059] 附图 20 :在经历过静电纺作用,以及经过静电纺作用后静态培养 18 至 92 小时后用以评价猪颈内静脉片段的坏死水平的量化 Live/Dead™ 结果。所述的数据表示的是一次试验的结果,而所述的误差条来自于对每个猪颈内静脉片段进行分析的 10 个视场。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0060] 附图 21 :通过基于荧光素的末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP- 生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 分析获得的代表性的免疫组织化学图像 (最初的颜色)。最顶端的两个控制板来自于 24 小时的静脉 (A) 试验以及动脉 (B) 试验。接下来的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (C) 试验以及经过调节的动脉 (D) 试验。第三行的控制板来自于 72 小时的动脉 (E) 试验以及经过调节的动脉 (F) 试验。最底端的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (G) 试验以及被覆盖的动脉 (H) 试验。所述的箭头指示的是凋亡的细胞。L 指示的是所述的猪颈内静脉内腔。

[0061] 附图 22 :通过基于荧光素的末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP- 生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 分析获得的定量的免疫组织化学结果,用以评价猪颈内静脉片段中的凋亡细胞的百分数,其中所述的猪颈内静脉片段来自于完全的体外血管灌注试验。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0062] 附图 23 :通过基于抗生素 - 生物素化的辣根过氧化物酶 (HRP/ABC) 的增殖细胞核

抗原 (PCNA) 分析获得的代表性的免疫组织化学图像 (最初的颜色)。最顶端的两个控制板来自于 24 小时的静脉 (A) 试验以及动脉 (B) 试验。接下来的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (C) 试验以及经过调节的动脉 (D) 试验。第三行的控制板来自于 72 小时的动脉 (E) 试验以及经过调节的动脉 (F) 试验。最底端的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (G) 试验以及被覆盖的动脉 (H) 试验。所述的箭头指示的是增殖的细胞。L 指示的是所述的猪颈内静脉片段内腔。

[0063] 附图 24 :通过基于抗生素 - 生物素化的辣根过氧化物酶 (HRP/ABC) 的增殖细胞核抗原 (PCNA) 分析获得的定量的免疫组织化学结果,用以评价猪颈内静脉片段中的增殖细胞的百分数,其中所述的猪颈内静脉片段来自于完全的体外血管灌注试验。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0064] 附图 25 :通过基于抗生素 - 生物素化的辣根过氧化物酶 (HRP/ABC) 的高尔基体分析获得的代表性的免疫组织化学图像 (最初的颜色)。最顶端的两个控制板来自于 24 小时的静脉 (A) 试验以及动脉 (B) 试验。接下来的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (C) 试验以及经过调节的动脉 (D) 试验。第三行的控制板来自于 72 小时的动脉 (E) 试验以及经过调节的动脉 (F) 试验。最底端的两个控制板来自于 24 小时的动脉 (G) 试验以及被覆盖的动脉 (H) 试验。所述的箭头指示的是阳性染色的细胞。L 指示的是所述的猪颈内静脉内腔。

[0065] 附图 26 :通过基于抗生素 - 生物素化的辣根过氧化物酶 (HRP/ABC) 的高尔基体分析获得的定量的免疫组织化学结果,用以评价猪颈内静脉片段中的阳性染色细胞的百分数,其中所述的猪颈内静脉片段来自于完全的体外血管灌注试验。所述的数据表示的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0066] 附图 27 :左 :处于静电纺处理过程中的被覆盖的猪颈内静脉片段。中 :如本发明中所提议的作为颈动脉插入嫁接物被植入的被覆盖的猪颈内静脉。右 :未被覆盖的猪颈内静脉嫁接物。值得注意的是,在动脉压力下所述被覆盖的猪颈内静脉 V(B) 不会发生扩张而所述的未被覆盖的静脉 (C) 会发生扩张。

[0067] 附图 28 :来自于 spun 动脉静脉嫁接物以及 sham 动脉静脉嫁接物的荧光血管造影图像。

[0068] 附图 29 :用于对内膜增生进行形态定量测量 (morphometric measurement) 的代表性的 Movats 五色染色图像 (最初的颜色)。使用所述的等式计算所述内膜与中层的厚度比例。

[0069] 附图 30 :从内膜增生的形态定量测量获得的量化结果的概况。P < 0.05 被认为具有统计学显著性。值得注意的是,只观察到了一种具有统计学显著性的趋向。

[0070] 附图 31 :来自于两个体内试验的低倍放大 (30 倍) 的扫描电子显微镜 (SEM) 图像,其中在所述的两个试验中所述的动脉静脉嫁接物没有发生闭塞。A 以及 B 来自于所述的嫁接物完全开放的试验。C 以及 D 来自于所述的嫁接物仅发生局部闭塞的试验。这些图像表示出了静脉嫁接物与颈动脉之间的吻合分界面。

具体实施方式

[0071] 这里提供了一种对动脉静脉嫁接物或者任意的管状组织进行机械性调节的方法,

通常,但不排外的,用于自身同源性、同种异源性、异种性移植操作中。为了这一目的,这里提供了一种覆盖管状组织的方法,所述的管状组织不局限于,静脉,动脉,尿道,肠道,气管,食道,输尿管以及输卵管(意思是来源于这些组织中的任何一部分都可以用于所述的嫁接物中,并且并不意味着将上述完整的解剖学结构用于嫁接的目的,尽管使用所述的完整结构或者本质上完整的结构也是一种选择。因此,当所述的管状组织是一种静脉,例如是隐静脉时,这并不意味着必须使用完整的隐静脉)。在所述的结构中,沿所述管状组织的周界覆盖一种生物可消化性聚合物的限制性纤维矩阵。如本发明中所述,“纤维”是一种能够伸长的、细长的、延长的、线状的和/或丝状的结构。“矩阵”是元素(例如,纤维)任意的二维排列或者三维排列,可以是有序的(例如,是一种纺织网或者非纺织网)或者是随意排列的(典型的是一种纤维垫子,通常由静电纺作用制成)。

[0072] 所述的矩阵通常是本质上连续的或者基本上连续的,沿管状组织的周界,这意味着所述的矩阵在所述管状组织的一部分的表面上以及周界边形成了一种连续的支撑环,但并不必须包裹所述管状组织的完整表面(例如,长度)。所述的矩阵是“限制性的(restrictive)”,这意味着所述的矩阵在本质上与所述管状组织的外表面发生接触,并且限制、阻碍和/或阻止所述管状组织在被嫁接时发生本质上的周界的扩张。所述矩阵通常达到这样的限制性程度:在典型的动脉压力下,所述的管状组织不能够扩张到这一组织的本质上最大扩张直径(参见,例如,附图4)。所述的矩阵可以是有弹性的,只要其具有限制性即可。在所述的矩阵具有生物可消化性的情况中,由于所述的矩阵发生了消化,超过一定时间后所述的矩阵的限制性特性发生下降。

[0073] 在一种非限制性的实施方式中,将所述的矩阵沉积于一种管状组织之上,例如通过静电纺作用将其沉积于一种管状解剖学结构或者器官之上。在一种具体的非限制性实施方式中,例如在一种动脉搭桥操作中所使用的所述的解剖学结构是静脉,例如是隐静脉,所述的动脉搭桥操作例如是冠状动脉搭桥操作。

[0074] 尽管可以使用任何有效的方法将精密的纤维沉积于管状组织的表面之上,但静电纺作用是一种将本质上均一的纤维沉积于这样的表面之上的有效的方法。静电纺作用能够构造出支架结构(scaffold),这种支架结构类似于所述天然细胞外基质(ECM)的刻度以及纤维性质。所述的细胞外间质由纤维,毛孔,以及具有亚微型尺寸刻度以及纳米尺寸刻度的其他表面特征组成。这些特征直接影响到细胞与合成材料间的相互作用例如迁移以及定位。静电纺作用还能够构造出定向纤维,从而形成具有固有的各向异性的支架结构。这些排列好的支架结构能够影响到细胞的生长,形态学特征以及细胞外间质的生成。例如,Xu等人已经发现了与聚L-丙交酯-聚ε-己内酯共聚物纤维一同排列的平滑肌细胞(SMC)(参见 Xu C.Y., Ina R., Kotaki M., Ramakrishna S. 于2004年在Biomaterials《生物材料》(25)877-86中发表的文章“Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential for blood vessel engineering《经排列的生物可降解性纳米纤维结构:一种可能用于血管工程的材料》”),并且Lee等人向经排列的生物不可降解性聚亚安酯施加机械刺激,并且发现与随机组织的支架结构相比,培养于经排列的支架结构中的细胞产生更多的细胞外间质(参见 Lee C.H., Shin H.J., Cho I.H., Kang Y.M., Kim I.A., Park K.D., Shin J.w. 于2005年在Biomaterials《生物材料》(26)1261-1270中发表的文章“Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human

ACL fibroblast《纳米纤维的排列以及机械应力的方向对于人类前交叉韧带 (ACL) 成纤维细胞的细胞外间质的生成所产生的影响》”)。

[0075] 一般情况下,静电纺的方法包括在一个装配有小孔以及计量泵的池中放置含有聚合物的流体(例如,聚合物的溶液,聚合物的悬浮液,或者聚合物的熔化液),其中所述的小孔例如是针管或者吸液管。将一个高电压电源的电极放置于与所述的含有聚合物的流体或者小孔进行电接触,同时将另外一个电极放置于与一个靶子(通常是收集筛或者旋转式芯棒)进行电接触。在静电纺过程中,通过将所述的高电压施加至所述的溶液或者小孔中(例如,大约 3-15 千伏)并且随后利用计量泵强迫其穿过所述的小孔从而提供稳定的流量,来给所述的含有聚合物的流体充电。正常情况下由于表面张力的作用存在于所述小孔处的含有聚合物的流体应当具有一种半球形状,而高电压的施加导致所述的存在于小孔处的本应具有半球形状的含有聚合物的流体发生了延伸,形成一种圆锥形状,被称为泰勒锥 (Taylor cone)。由于施加至所述含有聚合物的流体和 / 或小孔上的足够高的高电压,所述带电荷的含有聚合物的流体的静电排斥力克服了所述的表面张力并且从所述的泰勒锥的尖端处喷射出一股带电流体并朝向所述的靶子进行加速运动,所述的带电流体具有 -2 至 -10 千伏的偏压。任选的,可以使用施加有偏压(例如,1-10 千伏)的聚能环对所述的一股含有聚合物的带电流体的轨道进行导向 (direct)。由于所述的带电流体朝向所述具有偏压的靶子运动,其经历了复杂的搅打 (whipping) 运动以及弯曲运动。如果所述的流体是一种聚合物溶液或者悬浮液,所述的溶剂通常在飞行途中被蒸发,在所述的具有偏压的靶子上留下聚合物纤维。如果所述的流体是一种聚合物熔化液,所述的被熔化的聚合物在飞行途中被冷却并且凝固,并且作为一种聚合物纤维聚集于所述具有偏压的靶子上。由于所述的聚合物纤维在所述的具有偏压的靶子上积累,从而在所述具有偏压的靶子上形成了一个非纺织的多孔的网(矩阵)。

[0076] 可以通过改变所述静电纺的条件对所述静电纺弹性矩阵的性质进行剪裁。例如,当所述的具有偏压的靶子相对接近于所述的小孔时,所得到的静电纺网趋向于含有不平坦的厚纤维,这样一来所述纤维的某些区域具有一种“珠样”的外观。然而,随着所述具有偏压的靶子进一步的远离所述的小孔,所述的非纺织纤维网趋向于具有更加均一的厚度。而且,所述的具有偏压的靶子可以相对于所述的小孔运动。在某些实施方式中,所述的具有偏压的靶子以一种规律的周期形式来回运动,这样一来所述的非纺织纤维网之间是本质上平行的。当出现这种情况时,与来自于与所述纤维垂直方向上的应力相比,所得到的非纺织网对于来自于与所述纤维平行方向上的应力可能具有更高的抗性。在其他的实施方式中,所述的具有偏压的靶子相对于所述的小孔进行随机的运动,这样一来所述的非纺织网的平面上的应力的抗性是等向的。所述的靶子还可以是一种旋转式芯棒。在这种情况下,可以通过改变旋转的速度来改变所述非纺织网的性质。还可以通过改变施加至所述静电纺系统之上的电压的量级来改变所述静电纺弹性支架结构的性质。在一种特别优选的实施方式中,所述的静电纺装置包括一个具有 12 千伏偏压的孔,一个具有 -7 千伏偏压的靶子,以及一个具有 3 千伏偏压的聚能环。施加至聚合物悬浮液或者熔化液之上的高电压的有效范围是 0.5-30 千伏,更加优选是 5-25 千伏,甚至更加优选是 10-15 千伏。

[0077] 可以使用两个或者更多个管口进行静电纺,其中每一个管口是一种不同的聚合物溶液的来源。为了对得到的非纺织聚合网的物理性质以及化学性质进行剪裁,可以利用不

同的偏压或者相同的偏压对所述的管口进行偏压处理。除此之外,可以使用多种不同的靶子。除了平的、板样的靶子之外,可以使用芯棒作为靶子。

[0078] 当使用一种聚合物悬浮液进行所述的静电纺时,存在于所述悬浮液中的所述聚合组分的浓度同样可以发生改变,从而调节所述弹性支架结构的物理性质。例如,当所述的聚合组分以相对低的浓度存在时,所得到的静电纺非纺织纤维网与聚合组分以相对高的浓度存在时相比具有较小的直径。不希望受到这一理论的任何限制,可以相信较低浓度的溶液具有较低的粘性,导致更快的流经所述的小孔从而制备更薄的纤维。本领域技术人员能够调整聚合物的浓度从而获得具有期望性质的纤维。所述聚合物组分的有效的浓度范围包括从大约 1%重量至大约 15%重量的范围,从大约 4 重量%至大约 10 重量%的范围,以及从大约 6%重量至大约 8%重量的范围。

[0079] 在使用中,将所述的芯棒放置于管状组织内,例如静脉内,并且通过所述芯棒的旋转将所述的聚合物纤维沿所述组织的至少一部分的周界进行沉积。所述的芯棒可以在所述的喷丝头与收集器之间进行纵向交替运动,从而增加对所述管状组织的覆盖。

[0080] 可以通过调节需要进行沉积的所述聚合物组合物的粘性和 / 或调节所述静电纺的过程来控制所述矩阵的厚度。使用粘性较高的聚合物组合物可能产生较厚的纤维,需要较少的时间沉积出具有期望厚度的矩阵。使用粘性较低的聚合物组合物可能产生较薄的纤维,需要较长的沉积时间沉积出具有期望厚度的矩阵。所述矩阵的厚度以及存在于所述矩阵内的纤维的厚度影响着所述矩阵的生物消化的速度。可以根据所述矩阵的最终用途对这些参数进行优化,从而达到一种期望的或者最佳的生理效应。

[0081] 可以对所述的聚合物矩阵的生物降解速率进行操纵、优化、或者调整,这样一来所述的矩阵在超过使用寿命之后发生降解。例如,在冠状动脉搭桥的情况中,期望所述的矩阵在 12 小时或者更长时间之后发生溶解,用以防止所述嫁接物上的巨大的骤加应力。所述的聚合物在经过一段期望的时间之后发生降解,这样一来在这段时间内由所述的聚合物矩阵提供的机械支撑逐渐的减少,并且所述的静脉能够被暴露于逐渐增加的周向室壁应力水平中。

[0082] 这种新的方法可能具有两种潜在的用途。在第一种非限制性用途中,所述的矩阵可以作为一种围手术期 (peri-surgical) 的工具,对打算作为动脉静脉嫁接物的静脉片段进行修饰。可以通过在临床床边 (bedside) 对刚刚从机体中分离出来的静脉或者对马上要进行嫁接的静脉进行处理,来实现对所述的静脉或者其他管状解剖学结构的修饰,例如但不限于,在动脉搭桥外科手术中进行。在一个非限制性的实施例,当提取到所述的隐静脉之后,并且当所述的外科医生看到所述的外科手术 (嫁接) 位点时,在将所述的静脉应用于搭桥操作之前,通过静电纺作用向所述静脉上覆盖所述的聚合物。

[0083] 在第二种非限制性的实施方式中,所述的聚合物矩阵可以作为一种新的媒介,用于为动脉静脉嫁接物传递支撑。尽管随着时间的过去静脉嫁接物的机械环境的修饰本身能够改善动脉静脉嫁接物的开放性,但在许多情况下可以证实向动脉静脉嫁接物传递活性试剂以及生物学 (细胞) 支撑是期望的。通过对导入了活性试剂和 / 或生物学物质的静电纺聚合物覆盖物进行调整,使其以期望的速率发生降解,可以控制传递这些支撑形态的速率。

[0084] 先前那些在血管周放置覆盖物用以向动脉静脉嫁接物传递支撑的方法对于临床移植具有限制速度的障碍,而这里所提供的使用静电纺生物可降解性聚合物的方法能够解

决这些限制。

[0085] Parsonnet 等人首次描述了在静脉嫁接物周围使用外部包封物的方法。他们已经证明所述的包封物能够阻止扩张,其能够很好被所述的宿主组织所接受,并且在有支撑的血管与没有支撑的血管之间不存在抗张强度的差异(参见 Parsonnet V, Lari AA, 以及 Shah IH 于 1963 年在 Arch Surg. 《外科学档案》87:696-702 中发表的文章 New stent for support of veins in arterial grafts 《用于支撑动脉嫁接物中的静脉的新的支架》)。Karayannacos 等人已经证明与未被支撑的对照嫁接物相比,松散的以及紧密的装配了的确良(Dacron)网包封物的动脉静脉嫁接物均表现出血栓症以及内皮下增殖作用的降低(参见 Karayannacos PE, Hostetler JR, Bond MG, Kakos GS, Williams RA, Kilman JW, 以及 Vasko JS 于 1978 年在 Ann Surg. 《外科学年鉴》187(2):183-8 中发表的文章 Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia 《静脉嫁接物的延迟失效:内皮下纤维肌性增生的调节因子》)。Mehta 等人已经证明,放置一种外部的、大孔的、非限制性的聚酯支架能够减少猪静脉嫁接物中的新生内膜的形成(参见 Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Izzat MB, Southgate KM, Bryan AJ, Newby AC, 以及 Angelini GD 于 1998 年在 Nat Med. 《自然医学》4(2):235-9 中发表的文章 External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting 《在猪动脉静脉旁路嫁接模型中外部支架对于长期的中层和新生内膜增厚的减少以及血小板衍生生长因子表达的降低》)。最近,聚四氟乙烯包封物被用来永久性的限制动脉静脉嫁接物在动脉压力下的扩张,并且这导致了猪模型中内膜增生的降低(参见 Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grothberg JB, 以及 Mok AP 于 1999 年在 J Biomech 《生物机械学杂志》32(11):1165-75 中发表的文章 Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach 《通过使用生物机械学工程化方法在试验性静脉嫁接物中对单核细胞以及粒细胞的活化进行的部分预防》)。

[0086] 为动脉静脉嫁接物提供永久性机械支撑的临床移植至今仍未有报道,这最有可能归因于针对用于血管用途的生物持久性合成材料所产生的不期望的炎性应答(参见 Bunt TJ 于 1983 年在 Surgery 《外科学》93(6):733-46 中发表的文章 Synthetic vascular grafts infection. I. Graft infections 《合成性血管嫁接物的感染:I. 嫁接物感染》以及 Edwards WH, Jr., Martin RS, 3rd, Jenkins JM, Edwards WH, Sr., 以及 Mulherin JL, Jr. 于 1987 年在 J Vasc Surg 《血管外科学杂志》6(3):235-9 中发表的文章 Primary graft infection 《嫁接物原发性感染》)。这种限制促使 Vijayan 等人以及 Jeremy 等人使用基于聚多糖的生物可降解性包封物来降低动脉静脉嫁接物中的内膜增生(参见 Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, vijayan V, Shukla N, Smith FC, 以及 Angelini GD 于 2004 年在 J Thorac Cardiovasc Surg. 《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》127(6):1766-72 中发表的文章 A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening 《一种抑制猪隐静脉嫁接物增厚的生物可吸收性(聚多糖),非限制性外部包封物》;Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, 以及 Jeremy JY 于 2004 年在 J Vasc Surg. 《血管外

科学杂志》40(5):1011-9 中发表的文章 Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath 《利用聚多糖生物可降解性外部包封物对猪隐静脉嫁接物中的中层以及内膜增厚作用进行的长期降低》;以及 Vijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, 以及 Jeremy JY 于 2002 年在 Eur J Vasc Endovasc Surg. 《欧洲血管以及内皮血管外科学杂志》24(1):13-22 中发表的文章 External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts 《静脉嫁接物中的外部支撑以及对于新生内膜形成的预防》)。已经被注意到的有益效果包括与未被覆盖的对照组相比增强了新生血管滋养管的形成(参见 Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, 以及 Jeremy JY 于 2004 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》40(5):1011-9 中发表的文章 Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath 《利用聚多糖生物可降解性外部包封物对猪隐静脉嫁接物中的中层以及内膜增厚作用进行的长期降低》)。然而,这些生物可降解性包封物的装配是松散的并且使得所述的动脉静脉嫁接物在动脉压力下能够膨胀至它们的最大直径,并且因此不能够为抗击所述周向室壁应力水平的增加而提供机械支撑。在 Vijayan 等人(参见 Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, 以及 Jeremy JY 于 2004 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》40(5):1011-9 中发表的文章 Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath 《利用聚多糖生物可降解性外部包封物对猪隐静脉嫁接物中的中层以及内膜增厚作用进行的长期降低》以及 Vijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, 以及 Jeremy JY 于 2002 年在 Eur J Vasc Endovasc Surg. 《欧洲血管以及内皮血管外科学杂志》24(1):13-22 中发表的文章 External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts 《静脉嫁接物中的外部支撑以及对于新生内膜形成的预防》)以及 Jeremy 等人(参见 Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, vijayan V, Shukla N, Smith FC, 以及 Angelini GD 于 2004 年在 J Thorac Cardiovasc Surg. 《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》127(6):1766-72 中发表的文章 A bioabsorbable(polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening 《一种抑制猪隐静脉嫁接物增厚的生物可吸收性(聚多糖),非限制性外部包封物》)使用所述方法之前, Huynh 等人使用了一种暂时性的外部骨胶原管支撑来减少兔静脉嫁接物中内膜增生的形成。这些骨胶原管同样是非限制性的,并且没有报道提及所述的降解动力学问题(参见 Huynh TT, Iaccarino G, Davies MG, Safi HJ, Koch WJ, 以及 Hagen PO 于 1999 年在 Surgery 《外科学》126(2):127-34 中发表的文章 External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts 《外部支撑对于试验性静脉嫁接物的 g 蛋白表达以及受体偶联的调节》)。据报道,静电纺横向连接的骨胶原在水溶液中降解的非常迅速(参见 Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, Roh S, Cho JJ, Park WH, 以及 Min BM 于 2006 年在 Biomaterials 《生物材料》27(8):1452-61 中发表的文章 Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing 《静电纺骨胶原纳米纤

维对于正常人类角化细胞以及早期伤口愈合的行为所产生的作用》) 并且因此由骨胶原单独制成的包封物向动脉静脉嫁接物提供的结构支撑作用太短暂,以至于不能在长期的时间内发挥作用。Liao 等人研发了一种外部动脉静脉嫁接物包封物,其被设计成以一种期望的速率发生降解,从而在一段时间内逐渐向动脉静脉嫁接物传递周向室壁应力。通过利用聚乳酸-聚乙醇酸共聚物薄片对特氟伦杆进行卷绕,将其预制在所述的管中,并且因此不用在每种动脉静脉嫁接物中进行定制(参见 Liao SW, Lu X, Putnam AJ, 以及 Kassab GS 于 2007 年在 Tissue Eng.《组织工程》13(12):2855-62 中发表的文章 A novel time-varying poly lactic-co glycolic acid external sheath for vein grafts designed under physiological loading《一种在生理学负载条件下设计的用于静脉嫁接物的新的时变聚乳酸-聚乙醇酸共聚物外部包封物》)。即,利用先前的方法,Liao 等人的方法使得在传递任何机械支撑之前,允许存在于动脉压力下的动脉静脉嫁接物发生扩张。对所述包封物的降解动力学以及得到的周向室壁应力与时间的曲线进行了报道,而没有对这里所描述的动脉静脉嫁接物中层室壁(mid-AVG-wall)中的降解动力学以及得到的周向室壁应力与时间的曲线进行报道。我们的方法解决了与如上所述的先前的研究相关的两个主要的限制,特别涉及到生物持久性的外部包封物和/或非限制性的外部包封物。

[0087] 向动脉静脉嫁接物传递机械支撑仅仅是外膜覆盖的一种可能性。其他的用途可以是,作为一种媒介,用于生物化学试剂、药物、基因、或者细胞的局部传递。Kanjickal 等人使用聚乙二醇水凝胶向动脉静脉嫁接物进行环孢霉素的持续性的局部传递,并且成功的减少了吻合内膜增生的形成(参见 Kanjickal D, Lopina S, Evanchow-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D, 以及 Springhetti S 于 2004 年在 J Biomed Mater Res《生物医学材料研究杂志》68(3):489-95 中发表的文章 Polymeric sustained local drug delivery system for the prevention of vascular intimal hyperplasia《用于预防血管内膜增生的进行药物的持续性局部传递的聚合体系》)。在另外一项研究中,Cagiannos 等人使用聚四氟乙烯包封物向动脉静脉嫁接物进行雷帕霉素(西罗莫司)的局部传递,并且有效的降低了猪模型中的吻合内膜增生(参见 Cagiannos C, Abul-Khoudoud OR, DeRijk W, Shell DHT, Jennings LK, Tolley EA, Handorf CR, 以及 Fabian TC 于 2005 年在 J Vasc Surg《血管外科学杂志》42(5):980-8 中发表的文章 Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model《涂覆雷帕霉素的扩张的聚四氟乙烯旁路嫁接物在猪模型中表现出对于吻合新生内膜增生的降低》)。最近,Kohler 等人使用了一种生物可降解性网进行紫杉醇的传递,有效的降低了羊模型的透析入口(dialysis access)的嫁接物-静脉吻合(anastomosis)的内膜增生(参见 Kohler TR, Toleikis PM, Gravett DM, 以及 Avelar RL 于 2007 年在 J Vasc Surg《血管外科学杂志》45(5):1029-1037;discussion(讨论)1037-8 中发表的文章 Inhibition of neointimal hyperplasia in a sheep model of dialysis access failure with the bioabsorbable vascular wrap paclitaxel-eluting mesh《对生物可吸收性血管覆盖物紫杉醇洗脱网失效的羊模型透析入口的新生内膜增生的抑制》)。可以将这些行为在理论上与所述的静电纺聚合物覆盖技术进行结合,通过调整所述的静电纺聚合物覆盖物的降解速率,可能将所述的传递速率控制在某一程度。

[0088] 根据我们的知识,通过一种生物可降解性动脉静脉嫁接物覆盖物/包封物进行细

胞的传递先前从未有过报道,并且因此所述的外膜覆盖物具有的这一可能的未来应用应当是新的。这里所使用的所述聚合物已经被公开(参见 Stankus JJ, Guan J, 以及 Wagner WR 于 2004 年在 J Biomed Mater Res A 《生物医学材料研究杂志 A》70(4):603-14 中发表的文章 Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies 《利用亚微型形态结构制造生物可降解性弹性支架》),并且其已经成功的与各种平滑肌细胞进行了微整合(参见 Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, 以及 Wagner WR 于 2006 年在 Biomaterials 《生物材料》27(5):735-44 中发表的文章 Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix 《平滑肌细胞在生物可降解性弹性纤维矩阵中的微整合》),这应当有助于进行这一可能的未来的应用。

[0089] 生物可降解性聚合物是“生物可相容性”的,因为所述的聚合物及其降解产物在本质上是无毒的,包括无致癌性的以及非免疫原性的,并且能够在生物体系中被清除或者发生降解,例如是一种在本质上不具有毒性作用的有机体(患者)。在生物体系中的降解机制的非限制性的例子包括化学反应,水解反应,以及酶法断裂。生物可降解性聚合物包括天然聚合物,合成聚合物,以及天然聚合物与合成聚合物的混合物。例如但不局限于,天然聚合物包括壳聚糖,骨胶原,弹性蛋白,藻酸盐,纤维素,聚链烷酸酯,透明质酸,或者凝胶。天然聚合物可以通过天然来源获得,也可以通过合成方法(包括通过重组的方法)制备得到,用于进行本发明所描述的技术中的使用。合成聚合物的非限制性例子包括:均聚物,杂聚物,嵌段共聚物或者共聚物。

[0090] 这里所使用的所述术语“聚合物组合物”指的是一种组合物,其包括一种或者多种聚合物。作为一种类别,“聚合物”包括均聚物,杂聚物,共聚物,嵌段聚合物,嵌段共聚物并且它们可以是天然的以及合成的。均聚物含有一种类型的构造块(building block),或者单体,而共聚物含有多于一种类型的单体。例如但不局限于,含有来源于 α -羟基酸的单体的聚合物包括聚丙交酯,聚丙交酯-聚乙醇酸共聚物,聚 L-丙交酯-聚己内酯共聚物,聚乙醇酸,聚 DL-丙交酯-聚乙醇酸共聚物,聚 L-丙交酯-聚 DL-丙交酯共聚物;含有来源于酯的单体的聚合物包括聚羟基丁酸酯,聚羟基戊酸酯,聚二氧环己酮以及聚多糖(polygalactin);含有来源于内酯的单体的聚合物包括聚己酸内酯;含有来源于碳酸盐的单体的聚合物包括聚碳酸酯,聚葡萄糖酸酯,聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯共聚物,聚乙醇酸-聚三亚甲基碳酸酯-聚二氧杂环己酮共聚物;含有通过尿乙烷连接的单体的聚合物包括聚亚安酯,聚酯型聚氨酯弹性体。

[0091] 根据一种非限制性的实施方式,所述的聚合物组合物包括骨胶原以及弹性蛋白中的一种或者两种。骨胶原是一种常见的细胞外间质组分,并且其通常以一种比许多合成性生物可消化性聚合物更快的速率进行体内的降解。因此,可以通过对所述聚合物组合物中的骨胶原的含量进行操控,来作为一种调节体内生物消化速率的方法。骨胶原可以以任意有效范围的含量存在于所述的聚合物组合物中,包括,但不局限于,从大约 2%重量至大约 95%重量,但更加典型的在大约 25%重量至大约 75%重量的范围内,包括在此之间的所有的范围以及点值,包括大约 40%重量至大约 75%重量,包括大约 75%重量至大约 42.3%重量。可以向所述的聚合物组合物中导入弹性蛋白,用以提供增强的弹性。弹性蛋白的使用使得所述的限制性矩阵能够发生轻微的周边扩张,用以帮助所述的管状组织适应其新的功能,其中所述的管状组织是例如静脉,所述的新的功能是例如作为动脉来使用。弹性蛋白可

以任意有效范围的含量存在于所述的聚合物组合物中,包括但不限于,从大约 2%重量至大约 50%重量,包括在此之间的所有的范围以及点值,从大约 40%重量至大约 42.3%重量,包括在此之间的所有的范围以及所有点值及其等价物。在一种非限制性的实施方式中,骨胶原与弹性蛋白以大约相等的量存在于所述的聚合物组合物之中。在另外一种实施方式中,所述的骨胶原与弹性蛋白可以以任意有效范围的含量总量存在于所述的聚合物组合物之中,包括,但不限于,从大约 2%重量至大约 95%重量,但更加典型的在大约 25%重量至大约 75%重量的范围内,包括在此之间的所有的范围以及点值,包括大约 40%重量至大约 75%重量,包括大约 75%重量至大约 42.3%重量。

[0092] 这里所指出的所有的范围或者数值,除非另外指明,无论是否被冠有所述的术语“大约”,都被认为冠有所述的术语“大约”,从而将精密测量的变化以及功能上等价的范围考虑在内。例如,可以指明所述的骨胶原以 10%重量的量存在于聚合物组合物之中,但是,由于测量上的变化,实际上可能以 10%重量 $\pm$ 0.05%重量、0.10%重量、或者 1.0%重量的量存在,并且以这样的重量百分比存在时可能会以同样的方式发挥功能。

[0093] 这里所使用的所述术语“包括”、“包含”或者“含有”及其改变的说法意在表示开放式。所述的术语“一个”以及“一种”意在表示一个或者多个。

[0094] 这里所使用的所述术语“患者”或者“宿主”指的是动物家族的成员,包括但不限于人类。

[0095] 如果一种单体被导入到所述的聚合物中,则可以说所述的聚合物“包括”或者“来自于”所述的单体。因此,所述的聚合物所包括的所述被导入的单体并不等同于在未被导入到聚合物中之前的单体,这是因为可能至少某些端基被导入到所述的聚合物主干之上了。如果在所述的聚合物中存在某个具体类型的连接键,则可以说所述的聚合物包括这种具体类型的连接键。

[0096] 这里所描述的生物可降解性聚合物被认为是生物可消化的。“生物可消化性”指的是当所述的聚合物被植入并且与体液以及组织发生接触时,将通过与所述的体液和 / 或组织间的化学反应发生部分的或者完全的降解,典型的并且通常优选的在经过几小时、几天、几周甚至几个月的时间之后发生。这种化学反应的非限制性的例子包括酸 / 碱反应,水解反应,以及酶法断裂。在某些实施方式中,所述的聚合物含有不稳定的化学半族,这样的例子包括酯类,酞类,聚酞类,或者酰胺类。或者,所述的聚合物可能含有作为构造块的肽或者生物大分子,它们很容易在原位发生化学反应。例如,所述的聚合物可以含有下述的肽序列丙氨酸 - 丙氨酸 - 赖氨酸,所述的序列给予所述的聚合物以酶不稳定性。在另外一种实施方式中,所述的聚合物可以包括一种作为构造块的细胞外基质蛋白,例如骨胶原。

[0097] 通常可以对所述的聚合物进行选择,使得能够在经过一段时间后在原位发生降解,从而优化所述组织的机械环境。有效的原位降解速率的非限制性例子包括在 12 小时至 2 周的时间内,以及在上述范围内的 1 小时、2 小时、3 小时、6 小时、12 小时、24 小时和 / 或 48 小时的递增量。

[0098] 这里所使用的所述生物可降解性聚合物也可以是弹性的。一般而言,与需要被替换或者被修复的所述软组织的性质相类似的任何弹性聚合物都是合适的。例如,在某些实施方式中,用于制作覆盖物的所述聚合物具有高度的扩张性。适合的聚合物的非限制性的例子包括那些具有在 100%至 1700%之间的破断应变的聚合物,更加优选在 200%至 800%

之间,并且甚至更加优选在 325%至 600%之间。在特别优选的实施方式中,所述聚合物的所述破断应变在 5%至 50%之间,更加优选在 10%至 40%之间,并且甚至更加优选在 20%至 30%之间。进一步的,选择具有 10kPa-30Mpa 的抗张强度的聚合物在通常情况下是有效的,更加优选从 5-25Mpa,并且甚至更加优选在 8 至 20Mpa 之间。在某些实施方式中,所述的起始模量在 10kPa 至 100Mpa 之间,更加优选在 10 至 90Mpa 之间,并且甚至更加优选在 20 至 70Mpa 之间。

[0099] 在某些实施方式中,这里所使用的所述聚合物在患者体内发生降解时还释放治疗试剂。例如,可以对所述聚合物中的各种构造块进行选择,这样一来当它们经由所述的降解过程在原位发生释放时,所述的构造块本身就能提供一种治疗作用。在一种特别优选的实施方式中,一种所述的聚合物构造块是腐胺,其被作为一种能够引发细胞生长以及细胞分化的物质被包含在所述的聚合物中。

[0100] 在一种实施方式中,所述的纤维包括一种生物可降解性聚酯型聚氨酯弹性体 (PEUU)。这样的聚酯型聚氨酯弹性体的例子是一种由聚己内酯二醇 (分子量 2000) 以及 1,4- 二异环己酰亚胺制成的弹性聚合物,上述反应中利用二胺作为增链剂,其中所述的二胺是例如腐胺。可以通过两步聚合法制备适合的聚酯型聚氨酯弹性体聚合物,其中,将聚己内酯二醇 (分子量 2000)、1,4- 二异环己酰亚胺、以及腐胺以 2 : 1 : 1 的摩尔比进行混合。在第一个聚合步骤中,利用 25 重量%的二醇的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液对 15 重量%的 1,4- 二异环己酰亚胺的二甲基亚砜溶液进行持续的搅拌。在所述的第二个步骤中,加入辛酸亚锡并且将所述的混合液在 75℃下反应 3 小时,同时加入三乙胺来帮助分解。所述的弹性聚合物还可以是一种聚醚型聚氨酯弹性体 (PEEU)。例如,可以通过将聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯三嵌段共聚物与 1,4- 二异环己酰亚胺以及腐胺进行反应来制备所述的聚醚型聚氨酯弹性体。在一种优选的实施方式中,所述的聚醚型聚氨酯弹性体是通过两步反应获得的,在所述的反应中使用到了 2 : 1 : 1 的反应物化学计量的 1,4- 二异环己酰亚胺:三嵌段共聚物:腐胺。在所述的第一个聚合步骤中,利用 25 重量%的三嵌段共聚物二醇的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液对 15 重量%的 1,4- 二异环己酰亚胺的二甲基亚砜溶液进行持续的搅拌。在所述的第二个步骤中,加入辛酸亚锡并且将所述的混合液在 75℃下反应 3 小时。随后将所述的反应混合液冷却至室温并且持续 18 小时。之后利用蒸馏水对所述的聚醚型聚氨酯弹性体聚合物溶液进行沉淀,并且将得到的湿的聚合物在异丙醇中浸泡 3 天,从而除去未反应的单体,并且进行真空干燥。

[0101] 在其他的实施方式中,向所述的生物可消化性纤维中加入至少一种治疗试剂。有效的治疗试剂包括那些能够被涂覆于、结合于、吸收于、吸附于、包埋于或者关联于所述的生物可消化性纤维之上并且能够向患者提供治疗作用的任意的物质。所述的治疗试剂可以在加工所述的聚合物的过程中与所述的聚合物进行混合。例如,可以将所述的治疗试剂溶解于一种溶剂 (例如,二甲基亚砜) 之中并且在加工的过程中加入到所述的聚合物之中。在另外一种实施方式中,将所述的治疗试剂与一种载体聚合物 (例如但不限于,聚乙二醇水凝胶或者聚乳酸-乙醇酸微粒) 进行混合,随后将其与所述的弹性聚合物一同进行加工。通过将所述的治疗试剂与一种载体聚合物混合或者将其直接与所述的弹性聚合物本身进行混合,可以通过所述聚合物的降解速率来控制所述治疗试剂的释放速率。在一种实施方式中,将一种包括活性试剂或者细胞的生物可消化性的水凝胶施加至所述的生物可消化

性纤维之上,所述的过程是在将它们施加至管状组织的表面上之后进行的。

[0102] 这里所使用的“生物可降解性”、“生物可再吸收性”以及“生物可消化性”是同义的。同样的,所述的描述词“管状”并不专指那些具有恒定的直径以及圆形横截面的几何学上完美的管状。它还包括具有非圆形并且发生改变的横截面的组织,并且可以具有变化的直径,并且因此它可以是具有环绕内腔的连续的侧壁(即,是中空的),并且在所述的内腔中具有两端开口的任意形状,这样一来液体、固体或者气体可以从一端开口向另一端开口运动。如这里所指出的,管状组织的具体的非限制性的描述性的例子包括动脉,尿道,肠道,食道,输尿管,气管,支气管,以及输卵管组织。

[0103] 除此之外,可以在所述的生物可消化性纤维中导入的其他活性试剂包括,但不局限于,抗炎药,例如,但不局限于 NSAID(非类固醇类抗炎药)例如水杨酸,茚甲新,三水合茚甲新钠,水杨酰胺,萘普生,秋水仙碱,苯氧布洛芬,舒林酸(sulindac),双氟尼酸(diflunisal),双氯芬酸(diclofenac),吲哚布洛芬钠水杨酰胺,抗炎细胞因子,以及抗炎蛋白或者类固醇类抗炎试剂;抗生素;抗凝血因子例如肝磷脂,Peback,伊诺肝素,阿司匹林,水蛭素,波利维(plavix),比伐卢定(bivalirudin),普拉格雷(prasugrel),艾卓肝素(idraparinux),法华林(warfarin),可密定(coumadin),氯吡格雷(clopidogrel),PPACK,GGACK,组织血纤维蛋白溶酶原激活剂,尿激酶以及链激酶;生长因子。其他的活性试剂包括,但不局限于:(1)免疫抑制剂;糖(肾上腺)皮质激素例如氢化可的松,倍他米松(betamethasone),地塞米松,氟米松,异氟泼尼龙,甲基强的松龙,强的松,强的松龙,以及曲安奈得(triamcinolone acetonide);(2)血管生成剂例如氟尿嘧啶,紫杉醇,多柔比星,顺铂,甲氨蝶呤,环磷酰胺,依托泊苷,哌加它尼,lucentis,色氨酸-tRNA合成酶,retene,CA4P,腺病毒介导的色素上皮细胞衍生因子(AdPEDF),血管内皮生长因子TRAP-EYE(VEGF-TRAP-EYE),AG-103958,阿瓦斯汀(Avastin),JSM6427,TG 100801,自噬相关蛋白3(ATG3),OT-551,内皮抑制素,沙利多胺(thalidomide),贝伐单抗(becacizumab),新伐司他(neovastat);(3)抗增殖剂例如西罗莫司(sirolimus),紫杉醇,紫杉醇,法尼基转移酶抑制剂,法尼基蛋白转移酶III(FPTIII),L774,抗增殖因子,Van 10/4,多柔比星,5-氟尿嘧啶(5-FU),柔红霉素,丝裂霉素,地塞米松,咪唑硫嘌呤,苯丁酸氮芥(chlorambucil),环磷酰胺,甲氨蝶呤,霉酚酸酯(mofetil),血管活性肠多肽,以及垂体腺苷酸环化酶激活肽(PACAP);(4)抗体;作用于免疫亲和素的药物,例如环孢霉素,zotarolimus,依维莫司(everolimus),他克莫司(tacrolimus)以及西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素),干扰素,肿瘤坏死因子(TNF)结合蛋白;(5)紫杉烷(taxane),例如紫杉醇(paclitaxel)以及多西他赛(docetaxel);他汀类(statin),例如阿托伐他汀(atorvastatin),洛伐他汀(lovastatin),斯伐他汀(simvastatin),普伐他汀(pravastatin),氟伐他汀(fluvastatin)以及罗苏伐他汀(rosuvastatin);(6)含氮氧化物供体或者前体,例如,但不局限于,Angeli's Salt,L-精氨酸,游离碱,二乙胺一氧化氮-亲核复合体,二乙胺一氧化氮-亲核复合体/AM,Glyco-SNAP-1,Glyco-SNAP-2,(+/-)-S-亚硝基-N-乙酰基青霉胺,S-亚硝基谷胱甘肽,NOC-5,NOC-7,NOC-9,NOC-12,NOC-18,NOR-1,NOR-3,SIN-1,盐酸,硝普钠,二水合物(Dihydrate),精胺一氧化氮-亲核复合体,链脲霉素;以及(7)抗生素,例如,但不局限于,阿昔洛韦(acyclovir),氧氟沙星(ofloxacin),氨苄西林(ampicillin),两性

霉素 B(amphotericin B),阿托喹酮 (atovaquone),阿奇霉素 (azithromycin),环丙沙星 (ciprofloxacin),克拉霉素 (clarithromycin),克林霉素 (clindamycin),氯法齐明 (clofazimine),氨苯砒 (dapsone),地克珠利 (diclazuril),强力霉素 (doxycycline),红霉素 (erythromycin),乙胺丁醇,氟康唑,氟喹诺酮 (fiuoroquinolones),膦甲酸 (foscarnet),更昔洛韦 (ganciclovir),庆大霉素,伊曲康唑,异烟肼 (isoniazid),酮康唑,利氟星 (levofloxacin),林可霉素 (lincomycin),米康唑 (miconazole),新霉素,诺氟沙星,氧氟沙星,巴龙霉素 (paromomycin),盘尼西林,喷他脒 (pentamidine),多粘菌素 B,吡嗪酰胺,乙胺嘧啶,利福布汀 (rifabutin),利福平 (rifampin),司帕沙星 (sparfloxacin),链霉素,磺胺嘧啶,四环素,托普霉素,三氟尿嘧啶核苷,硫酸甲氧苄氨嘧啶,心羟基吡啶硫酮,以及银盐例如氯化银,溴化银,碘化银以及高碘酸银。

[0104] 可以使用各种方法向所述的限制性生物可消化性矩阵中进行细胞的微整合。例如,可以将所述的矩阵浸没在目标细胞的适合的的生长培养基中,并且因而将其直接暴露于所述的细胞中。所述的细胞能够在所述矩阵的表面上以及缝隙中进行增殖。随后从所述的生长培养基中取出所述的矩阵,如果必要的话进行洗涤,并且移植。但由于静电纺非纺织物通常具有相对小的孔隙尺寸(例如,与使用其他方法制造的非纺织物的孔隙尺寸相比,其中所述的其他方法是例如盐浸取法或者温度诱导的相分离法),当仅期望在靠近所述弹性支架结构的表面处进行细胞的微整合时,通常在所述的支架结构的表面上进行细胞的培养。

[0105] 在另外一种实施方式中,将目标细胞溶解于一种合适的溶液(例如,生长培养基或者缓冲液)中并且随后在利用静电纺作用生成所述矩阵的同时将其喷雾在所述的限制性的生物可消化性矩阵之上。当期望获得一种高度细胞化的组织工程化构造时,这种方法是格外适合的。在一种实施方式中,使用加压喷雾(即,在压力条件下通过喷嘴进行细胞的喷雾)对所述的细胞进行沉积。在另外一种实施方式中,在静电纺的过程中将所述的细胞电喷雾到所述的非纺织网上。如本发明中所述,电喷雾包括将一种具有适当粘性以及浓度的含有细胞的溶液放置于电场中,所述的电场足以生成一种含有细胞的溶液的微小带电液滴的喷雾。在一项试验中(未示出),对于在不同的条件下进行喷雾的平滑肌细胞(SMC)的细胞存活能力进行检查。这些不同的条件包括单独喷雾,向带有-15千伏电荷的目标喷雾,向带有-15千伏并且具有聚酯型聚氨酯脲(PEUU)静电纺的目标喷雾,在10千伏条件下向带有-15千伏电荷的目标喷雾,以及在10千伏条件下向带有-15千伏并且具有聚酯型聚氨酯脲(PEUU)静电纺的目标喷雾。经由所述的喷嘴喷出的细胞中,平滑肌细胞的存活能力发生了显著的降低。不希望受到任何理论的限制,可以相信导致这一结果的可能是加压喷雾的物理压力以及将所述细胞暴露于加工溶剂中的联合作用,因为单独喷雾可以导致存活能力的丧失,并且在静电纺聚酯型聚氨酯脲(e-PEUU)的制造过程中进行喷雾导致存活能力的更大的丧失。其他文献已经报道了细胞气雾剂喷雾导致存活能力的降低,并且发现这很大程度上取决于喷嘴的直径,喷雾的压力,以及溶液的粘性(参见 Veazey w. S, Anusavice K. J., Moore K. 于2005年在 J. Biomed. Mater. Res. 《生物医学材料研究杂志》(72B)334-8中发表的文章“Mammalian cell delivery via aerosol deposition 《经由气雾剂沉积作用进行的哺乳动物细胞的传递》”)。因此,可以对存在于补充有凝胶的介质中的细胞进行喷雾,从而增加粘性并且帮助细胞免受机械应力以及化学应力的损伤。尽管可以恢复所述的

存活能力,但由于在所述的纤维网状中存在凝胶,仍然能够破坏所述的聚酯型聚氨酯矩阵的机械完整性。

[0106] 与加压喷雾相反,对细胞进行电喷雾不会显著的影响细胞的存活能力或者增殖性。这与其他文献中报道的细胞可以在被暴露于高压电场的环境下存活的结论(参见,例如,Nedovic V.A.,Obradovic B.,Poncelet D.,Goosen M.F.A.,Leskosek-Cukalovic O.,Bugarski B.于2002年在Landbauforsch Volk《福肯罗特农业研究》(241)11-17中发表的文章“Cell immobilization by electrostatic droplet generation《通过生成静电液滴进行细胞的固定化》”;Temple M.D.,Bashari E.,Lu J.,Zong W.X.,Thompson C.B.,Pinto N.J.,Monohar S.K.,King R.C.Y.,MacDiarmid A.G于2002年4月7-11日发表的文章“Electrostatic transportation of living cells through air《经由空气进行的存活细胞的静电运输》”,Abstracts of papers(摘要),223 ACS National Meeting(第223届美国化学协会年会),Orlando,FL)相一致。即使在存在聚酯型聚氨酯静电纺的情况下,平滑肌细胞的存活能力也不会下降,这可能是因为带正电的静电纺以及电喷雾流之间互相排斥,从而避免了所述细胞在进行沉积之前被暴露于溶剂之中。同样的,由于23厘米这一相对长的静电纺距离,聚酯型聚氨酯纤维在进行沉积的时候可能不含有溶剂。与利用不含凝胶的介质进行的电喷雾相比,利用补充有凝胶的介质进行的电喷雾获得了更多数量的存活细胞。然而,凝胶的使用导致了结构机械性质的降低。因此,在许多情况下,单独利用介质进行的电喷雾可能是一种更加优选的导入细胞的方法。

[0107] 可以被导入到所述的生物可消化性矩阵之上或者之中的细胞包括干细胞,祖细胞(前体细胞),平滑肌细胞,骨骼肌成肌细胞,心肌细胞,内皮细胞,内皮祖细胞,骨髓间质细胞以及经遗传修饰的细胞。在某些实施方式中,所述的经遗传修饰的细胞能够表达一种治疗物质,例如一种生长因子。适合的生长因子的例子包括血管生成因子或者神经营养因子,其可以任选的通过重组技术获得。生长因子的非限制性例子包括碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),酸性成纤维细胞生长因子(aFGF),血管内皮生长因子(VEGF),肝细胞生长因子(HGF),胰岛素样生长因子(IGF),转化生长因子- β 多效生长因子(pleiotrophin)蛋白,沉默中期因子(midkine)蛋白。在一种优选的实施方式中,所述的生长因子是胰岛素样生长因子-1。

[0108] 实施例

[0109] 所述的自生性隐静脉仍然是冠状动脉搭桥操作(每年500,000例)以及外周动脉搭桥操作(每年80,000例)中可以选择的嫁接物。动脉静脉嫁接物的失效仍然是一个主要的问题,而带有失效嫁接物的患者将死亡或者需要进行二次手术。内膜增生占全部的动脉静脉嫁接物失效的20%至40%。可以相信,将动脉静脉嫁接物突然暴露于由所述动脉循环形成的新的严峻的生物机械环境中以及与所述的动脉体系相关的水平升高的室壁周向应力中(相较于自然的静脉环境而言具有140倍的升高),能够触发内膜增生。本发明的研究假设是:可以通过将动脉静脉嫁接物逐渐暴露于动脉水平的室壁周向应力中,来降低或者消除所述的内膜增生应答。即,如果给予动脉静脉嫁接物充足的机会来适应并且调整其新环境下的应力,将可以降低细胞的损伤,因此限制内膜增生出现的机械环境。明显的,建立一种可靠的用于预防所述的内膜增生过程中的早期事件的方法将导致动脉搭桥操作的临床效果方面的改进。因此,本项研究的长期目标在于建立一种新的机械调节的范例,以在

外膜周围放置一种生物可降解性聚合物覆盖物的方式,从而安全的并且有效的在原位进行动脉静脉嫁接物的“动脉血化”。可以对所述的聚合物覆盖物进行调节,使其在经过一段期望的时间后发生降解,由其所提供的机械支撑减少,从而使所述的静脉在原位逐渐被暴露于水平升高的周向室壁应力中。

[0110] 表 1 概括描述了本发明中所略述的几种分子信号,以及选择它们作为本项研究的端点的基本原理。

[0111] 表 1 本项研究的端点的概述以及选择这些端点的基本原理

[0112]

本项研究中提议的端点	在内膜增生中的作用	由文献支持的基本原理
高尔基体	表型转化 蛋白合成	与收缩性平滑肌细胞相比,合成性平滑肌细胞的量增加 ^a
增殖细胞核抗原	增殖	突然被暴露的动脉静脉嫁接物的细胞增殖水平增加 ^b

[0113]

末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记	细胞凋亡	突然被暴露的动脉静脉嫁接物的细胞凋亡发生变化 ^c
顺应性	临床表现	动脉静脉嫁接物开放的重要指示 ^d 突然被暴露的动脉静脉嫁接物的顺应性降低,因而增加顺应性的失调 ^e
硬度	临床表现	动脉静脉嫁接物开放的重要指示 ^d 突然被暴露的动脉静脉嫁接物的硬度增加,并且可能导致临床表现的降低 ^f

[0114] ^aMorisaki N 等人于 1988 年在 Atherosclerosis《动脉硬化症》71(2-3):165-71 中

发表的文章 Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin i2 in cultured rabbit aortic smooth muscle cells 《前列腺素 i2 在经培养的兔大动脉平滑肌细胞中对于 DNA 合成的细胞周期依赖性抑制作用》;Campbell GR 等人于 1988 年在 Arch Pathol Lab Med. 《病理学与实验室医学档案》112(10):977-86 中发表的文章 Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell 《动脉平滑肌:一种多功能的间叶细胞》;以及 Nagai R 等人于 1989 年在 The Journal of Biological Chemistry 《生物化学杂志》264(17):9734-7 中发表的文章 Identification of two types of smooth muscle myosin heavy chain isoforms by cDNA cloning and immunoblot analysis 《利用 CDNA 克隆以及免疫印迹分析识别两种类型的平滑肌肌浆球蛋白重链同型体》。

[0115] bNishibe T 等人于 2002 年在 Int Angiol. 《国际血管学》21(3):250-5 中发表的文章 Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement 《放置血管内支架之后血管紧张素转换酶的诱导作用》以及 Zuckerbraun BS 等人于 2003 年在 J Vasc Surg 《血管外科学杂志》38(4):812-9 中发表的文章 Overexpression of mutated ikappaBalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation 《变异的 κ B 抑制剂 α 的过表达对于血管平滑肌细胞的增殖以及内膜增生的形成的抑制作用》。

[0116] cWang GJ 等人于 2005 年在 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 《动脉硬化症, 血栓症, 以及血管生物学》25(10):2081-7 中发表的文章 Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein 《一种凋亡蛋白抑制剂, survivin 基因对于静脉嫁接物增生的调节》以及 Wang AY 等人于 2001 年在 Cardiovasc Surg 《心脏外科学》9(4):319-28 中发表的文章 Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts 《植出型主动脉冠状动脉隐静脉旁路嫁接物中凋亡相关蛋白的表达以及细胞死亡的结构特征》。

[0117] dDavies AH 等人于 1992 年在 Ann R Coll Surg Engl 《英国外科医生学院年鉴》74(6):434-5 中发表的文章 Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass 《非反向 femorodistal 搭桥中偏转的预防》。

[0118] eJacot JG 等人于 2004 年在 J Vasc Surg 《血管外科学杂志》39(3):547-55 中发表的文章 Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffens changes accompany geometric remodeling 《人类下肢末端静脉嫁接物的早期适应性:伴随几何学重塑的室壁硬度的改变》。

[0119] fTai NR 等人于 2000 年在 Br J Surg 《英国外科学杂志》87(11):1516-24 中发表的文章 Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction 《在血管重建过程中使用的导管的顺应特性》以及 Jacot JG 于 2004 年在 J Vasc Surg 《血管外科学杂志》39(3):547-55 中发表的文章。

[0120] 实施例 1- 聚酯型聚氧酯脲 (PFUU) 结构的制造

[0121] 利用注射泵以 1.0 毫升/小时 (mL/h) 的速率向一个不锈钢细管中泵入 5% 重量的聚酯型聚氧酯脲的六氟异丙醇 (HFIP) 溶液, 其中在所述的不锈钢细管中垂直悬浮有一根 13 厘米长、4.5" 直径的铝制芯棒。利用高压发生器 (Gamma High Voltage Research) 给聚

酯型聚氨酯脲充上+12千伏的电并且给所述的铝制靶子充上-7千伏的电。通过在所述的靶子上进行静电纺操作制成排列好的聚酯型聚氨酯脲纤维,其中所述的靶子以0.0至13.8米/秒的速率进行旋转。将所述的支架结构在室温下干燥过夜并且随后将其在30℃下放置于真空中48小时。取每个样本的一部分放入标准的X-射线衍射承载器进行分析,使得所述纤维的方向与所述的X-射线光束相平行。将所述的样本放置于使用铜射线的PANalytical X'Pert Pro 衍射仪。聚酯型聚氨酯脲的平均数量以及平均分子量分别为228,700以及87,600,得到的多分散指数为2.61。差式扫描量热(DSC)结果表明其玻璃化温度为-54.6℃并且所述聚酯型聚氨酯脲软片段的熔化温度为41.0℃。

[0122] 用于进行血管组织工程化操作的静电纺管状构造

[0123] 这个实施例描述的是一种制备高度细胞化的血管构造的方法,所述的血管构造还能够提供足够的弹性机械支撑。所述的方法包括一个微整合的步骤,在进行或者不进行所述的细胞内放置操作的情况下,在血管室壁内构建一种亚微型弹性纤维网。可以通过体外培养的方法或者体内的方法形成细胞结构。这些方法可以被用来进行本发明所述的管状组织的涂覆。

[0124] 这个实施例提供了一种在管腔表面种植小直径的静电纺聚亚安酯导管的方法,其可以被用来进行本发明所描述的管状组织的涂覆。可以在构建支架结构的过程中使用静电纺技术进行细胞的导入,从而更好的促进组织的生成。

[0125] 聚酯型聚氨酯脲是聚(ϵ -己内酯)二醇以及1,4-二异环己酰亚胺在腐胺增链剂的存在下合成得到的。将聚酯型聚氨酯脲以6%重量的量溶解于六氟异丙醇中并且进行静电纺。静电纺的条件包括:溶液的体积流量为1.0毫升/小时,喷嘴与靶子的距离为13.5厘米,并且施加在所述喷嘴上的电压为+12千伏而施加在所述靶子上的电压为-3千伏。用于制造在移植中使用的小直径管的所述的靶子是316型(Type 316)不锈钢芯棒,所述的芯棒具有1.3毫米的直径并且以250rpm的转速进行旋转。

[0126] 所述的芯棒同时以大约8厘米/秒的速度沿其轴在一个线性平台上进行平移(translate),从而制造出更加均匀的导管厚度。对样本进行15分钟的静电纺处理,从而制成具有150微米至200微米数量级的室壁厚度的多孔管状构造。为了进行内皮化研究,在与上述相同的处理条件下使用一个4.7毫摩的不锈钢芯棒作为替代。

[0127] 将6%重量的聚酯型聚氨酯脲的六氟异丙醇溶液通过静电纺作用沉积于以250rpm的速度旋转的、带有负电荷的旋转芯棒上,从而制成一种管状构造。所述的静电纺管具有1.3毫米的内径,达到8厘米的长度以及150-200微米的室壁厚度。纤维的尺寸大约在1000微米的范围内。除此之外,这些构造是可以缝合的(suturable)的并且保持着它们的内腔。

[0128] 在构建之后,将所述的芯棒浸泡在70%的乙醇中,其目的在于能够更加容易的将其从所述的钢芯棒上分离。随后将所述的导管多次浸泡在去离子水中,吸干(blotted dry)并且随后在室温下真空干燥24至48小时。随后,利用解剖显微镜检查导管的粗视结构或者利用扫描电子显微镜检查导管的纤维形态。为了能够观察到连续的纤维横截面,将样本在液氮中浸泡1分钟并且随后进行切片,在此之后为扫描电子显微镜图像进行溅射涂覆。

[0129] 聚酯型聚氨酯脲导管(4.7毫摩)被放置于一种用户定制的旋转真空接种装置中并且被接种 20×10^6 个肌源性干细胞(MDSC)。更具体的,将所述的静电纺导管放置于金属

底座上并且向所述导管的外部施加轻度的真空条件。随后,次培养的肌源性干细胞被灌注到所述的导管内腔并且由真空的作用被强加于所述管的纤维内腔侧壁上。在静态条件下在皮氏培养皿中对所述的构造进行 24 小时的培养。经过 24 小时的静态培养之后,细胞得以存活,黏附于所述的内腔中并且形成了一种单层结构。

[0130] 将 1.3 毫米内径的多孔管状静电纺支架结构作为插入性嫁接物移植到大鼠的腹部大动脉中。所述的构造是可以缝合的 (sutureable) 的并且能够容易的在体内保持它们的内腔。利用 1% 的异氟烷以及 2.5 2.5 毫克 /100 克的克他命对体重 250-300 克的雌性 Lewis 大鼠进行麻醉。从腹部中间切开并且暴露出所述的后腹膜腔。对低于肾脏水平的降主动脉进行解剖,夹紧最近端以及最远端的片段从而制造出一个 1 厘米的缺口。之后,使用 10.0 聚丙烯缝合线以一种端对端的方式植入所述的静电纺导管。在夹紧之前施用 200 单位 / 千克的静脉内肝磷脂。利用 2.0 Vycril 缝合线以两层的方式对所述的腹部膜进行缝合。大鼠能够通过所述的外科手术恢复其四肢功能。在两周的时候将大鼠处死并且将样本植出体在室温下固定于 10% 的中性缓冲福尔马林中。在移植后的两周后,嫁接物保持着开放性以及功能性。之后,将样本包埋于石蜡中并且进行切片,在此之后进行苏木精以及伊红的染色或者进行 Masson's 三色染色。苏木精以及伊红染色证明沿所述的植出性嫁接物周围形成了外囊。Masson's 三色染色表明,所述的囊是由经排列的骨胶原以及新生成的毛细血管共同组成的。在所述的构造中观察到了细胞以及组织的向内生长,伴有骨胶原的形成。同样证明了细胞在所述构造内腔的周围形成了一种单层结构。

[0131] 尽管前述的实施例提供了一种体内的方法,但可以利用静电纺作用将一种具有生物可降解性以及细胞相容性的弹性聚酯型聚氨酯导入到小直径管中,适用于在大鼠模型中进行移植。

[0132] 与上述的实施例相似,这个实施例提供了一种制造高度细胞化的血管构造的方法,所述的血管构造同样能够提供足够的弹性机械支撑。然而,先前所述的模型是一种体内的方式,利用静电纺作用将一种具有生物可降解性以及细胞相容性的弹性聚酯型聚氨酯导入到小直径管中,适用于在大鼠模型中进行移植。这个实施例提供了一种体外的方式,其中使用了微整合技术,在构建支架结构的同时将平滑肌细胞接种至静电纺纳米纤维之中。

[0133] 在组织培养聚苯乙烯 (TCPS) 培养板上将从大鼠大动脉中分离出来的血管平滑肌细胞 (SMC) 展开,所述的展开是在 Dulbecco's Modified Eagle 培养基 (DMEM) 中进行的,所述的培养基中补充有 10% 的胎牛血清以及 1% 的盘尼西林-链霉素。采用与先前的描述相类似的方式进行微整合处理,对于所述的处理进行某些改良,从而允许使用小直径的电喷雾 / 静电纺芯棒。

[0134] 在培养基中对 7.5×10^6 个平滑肌细胞 / 毫升进行次培养,并且以 0.1 毫升 / 分钟的速度将其送至带有 8.5 千伏电荷的无菌的 316 型不锈钢细管中,并且距离所述的靶子 4.5 厘米。以 1.5 毫升 / 分钟的速度将 6% 重量的聚酯型聚氨酯的六氟异丙醇溶液或者 6% 重量的聚酯型聚氨酯 / 骨胶原 (75/25) 的六氟异丙醇溶液送至带有 12 千伏电荷的细管中并且距离所述的靶子 23 厘米。所述的靶子由一根无菌的不锈钢芯棒 (直径 4.7 毫米) 组成,其带有 -3 千伏的电荷并且以 250rpm 的速度进行旋转,同时以 1.6 毫米 / 秒的速度沿其轴平移 8 厘米。制造每个微整合导管需要使用 30 分钟的构建时间。在构建完成之后,利用无菌操作技术将所述的导管以及芯棒轻轻的放置于一个转瓶之中并且静态培养 16 小时。

16 小时过后,将样本从所述的经过培养的芯棒中轻轻取出。随后将样本切成 15 厘米的长度并且将其缝合至金属底座上,并且利用附图 3 中所示的装置,使用脉冲式流动的介质进行 3 天的灌注。

[0135] 在构建之后的第一天以及第四天的时间点上,对样本进行特征分析。使用噻唑蓝 (MTT) 线粒体检测对细胞的存活能力进行测量。为了进行组织学研究,将样本在室温下固定于 10% 的中性缓冲福尔马林中。随后利用石蜡对样本进行包埋,切片并且利用苏木精以及伊红对其进行染色。在经过构建之后立即对样本进行生物机械特性的分析。被测量的性质包括环的强度,动力学顺应性,以及爆破压力。为了测量环的强度,将不锈钢钉插入到 5 毫米长的管状片段中并且之后将其放入单轴张力检测器 (ATS) 的夹手中。使用一个 10 lb 的测压元件以及 10.05 毫米 / 分钟的位移速率,对样本进行压紧,直至其破裂。

[0136] 为了测量动力学顺应性以及爆破压力,将 15 毫米长的管状样本放置于一个由离心泵 (Biomedicus) 驱动的流动环中并且在 37°C 下浸没于磷酸缓冲液 (PBS) 中。利用标准的同轴应变仪式压力传感器以及 PC 采集板对所述的压力进行监控并且在 30 赫兹 (Hz) 条件下进行记录。利用脉冲式流动 (110/70 毫米汞柱, 1.2 赫兹) 对所述的血管构造进行灌注,并且通过利用氦-氖激光千分尺 (Beta Lasermike) 对所述样本的外直径进行记录,来测量所述的动力学顺应性 c。顺应性是按照下述等式来计算的:

$$[0137] \quad C = \frac{(D_{\max} - D_{\min})}{D_{\min} (P_{\max} - P_{\min})}$$

[0138] 对于每个脉冲而言 (D = 最大直径或者最小直径, P = 最大压力或者最小压力)。使用猪的乳腺动脉作为对照,用于在顺应性研究中与经过微整合的聚酯型聚氨酯脲进行比较。为了测量爆破压力,将所述的样本出口进行密封并且流量开始增加直至管发生破裂。选取在破裂之前所达到的最大压力作为所述的爆破压力。

[0139] 为了对小直径管实施细胞微整合技术,使用一个直径 4.7 毫米的不锈钢芯棒代替先前使用的直径 19 毫米的芯棒来进行板状的微整合。为了对高度细胞化以及没有缺失的管状构造进行微整合,从先前的方法出发并且将电喷雾距离些微的减少 0.5 厘米并且将所述芯棒的负电荷从 -10 千伏降低到 -3 千伏的做法是有效的。在制造过程中,所述的聚酯型聚氨酯脲呈现出粉红色并且在所述的芯棒上反光,这标志着形成了均匀的细胞电喷雾。当被从所述的芯棒中分离后,可以发现无论是聚酯型聚氨酯脲样本还是聚酯型聚氨酯脲 / 骨胶原 (75/25) 样本都表现出具有机械强度,这是因为它们是可以缝合的 (sutureable) 并且能够在被压缩之后保留它们的内腔。

[0140] 在开始时对所述的平滑肌细胞微整合构造中的细胞的放置以及存活能力进行了调查,并且在经过 4 天的静态培养或者灌注培养之后再次进行上述调查。在经过灌注之后,轻轻的将样本从所述的底座上进行分离,并且之后将其切成用于噻唑蓝 (MTT) 以及组织学检测的代表性的片段。噻唑蓝检测结果对于在制造过程的 1 天之后存活下来的细胞进行了指示。此外,在静态培养或者灌注培养进行 4 天的时候细胞仍然保持存活,且灌注培养中所报道的细胞数值稍高一些。对样本进行固定化并且利用苏木精以及伊红染料进行染色。苏木精以及伊红 (H&E) 染色表明在所述的管状构造中进行了均匀的原始细胞的整合。

[0141] 在制造了所述的微整合构造之后,对其环的强度,爆破压力,以及缝合的保留强度

(suture retention strength) 进行了评价。小管片段(环)具有机械强度并且具有弹性,其最大应力值以及最大应变值分别为 6.3Mpa 与 170%。在每种情况中,所述的环样本不会利落的发生破裂,而像是在经过所述的极限应力值之后发生撕裂或者分层。为了对所述的微整合构造的动力学顺应性进行计算,将样本暴露于脉冲式流动中并且对其压力/直径间的关系进行评价。将这种关系与被暴露于同样的脉冲式流动的猪乳腺动脉(pMA)进行比较。所述的猪乳腺动脉与微整合的聚酯型聚氨酯脲所产生的机械应答非常相似,两种样本均产生了数值的下降,这种下降是相继发生的。猪乳腺动脉的顺应性数值为 $1.02 \pm 0.33 \times 10^{-3}$ 毫米汞柱而平滑肌细胞微整合的聚酯型聚氨酯脲的顺应性数值为 $0.71 \pm 0.13 \times 10^{-3}$ 毫米汞柱。两个样本的爆破压力均高于 1500 毫米汞柱。所述的爆破压力值是近似的,这是因为所述的微整合管所具有的多孔性质。

[0142] 这种方法生产出了高度细胞化的弹性支架结构。在制造之后细胞是存活的并且在灌注培养中发生增殖。为了利用这一技术在作为血管原型的小直径管状构造中进行细胞的微整合,对某些操作变量进行调整是有利的。例如,为了命中所述的小直径芯棒并且将细胞电喷雾于其上,减小所述电喷雾喷嘴与芯棒间的距离是有效的。同样的,避免在所述芯棒上施加大的负性偏压是有效的。在所述的旋转的芯棒上使用高负电荷将产生聚合物突出的缺陷,或者在所述的管内形成“穿刺”现象,这可能破坏导管的完整性以及细胞的存活能力。因此,降低芯棒的电荷能够有效的产生均质的细胞以及纤维管状导管。之后在灌注生物反应器中对这些导管进行培养,从而促进所述管内部的细胞与营养、垃圾、以及氧气之间进行更好的交换。苏木精 & 伊红染色以及噻唑蓝检测结果表明,在制造出所述的导管以及经过灌注培养之后,在所述的导管中存在存活的细胞。

[0143] 实施例 2- 由静脉嫁接物的动脉血化作用而引起的机械性质的改变

[0144] 在动脉压力范围内,动脉静脉嫁接物由于其过度膨胀的程度而基本上成为一种刚性的管(参见 Stooker w, Gok M, Sipkema P, Niessen HW, Baidoshvili A, Westerhof N, Jansen EK, Wildevuur CR, 以及 Eijssman L 于 2003 年在 Ann Thorac Surg《胸外科学年鉴》76(5):1533-8 中发表的文章 Pressure-diameter relationship in the human greater saphenous vein 《人类大隐静脉中的压力与直径间的关系》)。为了证实这一点,我们进行了一次压力斜坡试验。这项试验的结果在附图 4 中有所表示。我们可以看到,所述的静脉在大约 30 毫米汞柱的时候达到了最大的膨胀。因此,在动脉水平的压力下静脉非常僵硬,而我们希望通过利用一种生物可降解性外膜覆盖物来提供临时的外部的结构支撑,从而抵消这种现象。

[0145] 根据 Davies 等人的研究,动脉静脉嫁接物的膨胀程度直接关系到例如顺应性这样的静脉性质,这种性质进而又关系到开放速率(patency rate)(参见 Davies AH, Magee TR, Baird RN, 以及 Horrocks M 于 1992 年在 Ann R Coil Surg Engl《英国外科医生学院年鉴》74(6):434-5 中发表的文章 Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass 《非反向 femorodistal 搭桥中偏转的预防》以及 Favies AH, Magee TR, Baird RN, Sheffield E, 以及 Horrocks M 于 1993 年在 Eur J Vasc Surg《欧洲血管外科学杂志》7(6):642-7 中发表的文章 Pre-bypass morphological changes in vein grafts 《静脉嫁接物在搭桥前的形态学变化》), Davies 报道了在外周搭桥手术中具有较低顺应性的动脉静脉嫁接物具有较低的开放速率。这种开放性的降低很大程度上归因于所述的动脉

静脉嫁接物与所要嫁接的天然动脉之间的顺应性的失调(参见Bandyk DF以及Mills JL于1993年在Semin Vasc Surg《血管外科学研究会》6(2):75-77中发表的文章An evolving concept《一种进化的观点》;Bassiouny HS, White S, Glagov S, Choi E, Giddens DP,以及Zarins CK于1992年在J Vasc Surg《血管外科学杂志》15(4):708-16中发表的文章Anastomotic intimal hyperplasia:Mechanical injury or flow induced《机械性损伤或者流动引发的吻合内膜增生》,discussion(讨论)716-7;以及Berkowitz HD,Fox AD,以及Deaton DH于1992年在J Vasc Surg《血管外科学杂志》15(1):130-41中发表的文章Reversed vein graft stenosis:Early diagnosis and management《逆静脉嫁接物狭窄的早期诊断与处理》,discussion(讨论)141-2)。静脉本身就具有比动脉低的顺应性(参见Tai NR,Salacinski HJ,Edwards A,Hamilton G,以及Seifalian AM于2000年在Br J Surg《英国外科学杂志》87(11):1516-24中发表的文章Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction《在血管重建过程中使用的导管的顺应特性》)并且在其被突然暴露于动脉血化作用时会产生更低的顺应性(参见Jacot JG,Abdullah I,Belkin M,Gerhard-Herman M,Gaccione P,Polak JF,Donaldson MC,whittemore AD,以及Conte MS于2004年在J Vasc Surg《血管外科学杂志》39(3):547-55中发表的文章Early adaptation of human lower extremity vein grafts:Wall stiffenss changes accompany geometric remodeling《人类下肢末端静脉嫁接物的早期适应性:伴随几何学重塑的室壁硬度的改变》)。似乎动脉静脉嫁接物的顺应性的改变仿佛是动脉静脉嫁接物失效的一个重要的预报器。

[0146] 实施例 3- 被一种限制性聚合物矩阵所涂覆的动脉静脉嫁接物

[0147] 这里所提供的数据涵盖了正在进行的研究中的两个截然不同的区域:i)对于完整的静脉片段对动脉血液动力学所产生的机械病理生物学(mechanopathobiological)应答的调查以及ii)作为外膜覆盖物进行使用的生物可降解性静电纺聚合物的形成。

[0148] 制成一种体外血管灌注装置,用以研究完整的血管片段以及嫁接物对于真实的、受到严密控制的生物机械环境以及代谢环境所产生的应答。附图3表示的就是这样一种装置。这个装置允许将猪的颈内静脉片段在体外暴露于精确控制的血液动力学环境以及溶解气体(氢气分压 pH , 氧气分压 pO_2 , 二氧化碳分压 pCO_2)中,从而模拟各种环境,包括所述的静脉环境以及真实的动脉静脉嫁接物环境。使用两个独立的灌注/器官培养体系(如附图3中示意性的示出的内容)来达到这种受控制的条件。所述的闭合回路灌注设计允许无菌灌注液(补充有1%的胎牛血清,0.5克/升头孢西丁的组织培养培养基199)进行循环。利用一个滚动泵在所述样本的周围进行外膜浴(含有1%的胎牛血清以及0.5克/升头孢西丁的Dulbecco's Modified Eagle培养基)的循环,其中所述的滚动泵被安装在一个密闭的腔室中。

[0149] 为了模拟天然的静脉血液动力学环境以及生物机械学环境,对所述的灌注回路中的滚动泵以及流动电阻器进行设定,从而提供20毫升/分钟的非脉冲式流动以及20毫米汞柱的压力。为了模拟动脉静脉嫁接物的血液动力学环境,将所述的泵以及流动电阻器设定成提供120/80毫米汞柱的脉冲压力波形以及100毫升/分钟的平均灌注液流体。通过将所述的灌注系统设定为提供如上所述的动脉环境,来首先进行所述的“动脉静脉嫁接物环境”的方案。通过应用一种经过调整的生物可降解性血管周静电纺聚合物覆盖物,对经

灌注的静脉片段的周向室壁应力进行控制。即,所述的中脉室壁的周向室壁应力与时间的曲线中将包括从静脉(大约 25KPa)水平到动脉(大约 140KPa 峰值)水平的一段逐渐的增加,在 24 小时至 192 小时的时间段内发生线性的增加。达到这种期望的降解速率,可以使得对动脉静脉嫁接物的体内机械调控处理成为可能,或者也许能够改进所有的动脉静脉嫁接物的开放速率。

[0150] 为了进一步验证体外灌注的性能,在静脉以及动脉环境下对经过灌注的静脉片段进行组织存活能力的分析,并且将得到的结果与组织存活能力的基线水平进行比较。在进行体外灌注的 48 小时之后,进行扫描电子显微成像,苏木精 & 伊红染色,Live/Dead™染色,以及末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 分析(参见附图 5)。扫描电子显微成像以及苏木精 & 伊红染色表明,在经过收集并且经过 48 小时的灌注之后,所述组织的形态学完整性是完好的。Live/Dead 以及末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 分析表明,与 48 小时时的基线相比较,在所述的静脉环境或者动脉环境中分别没有发生显著的坏死或者细胞凋亡。使用这类系统的较早一代系统对持续 14 天的灌注进行了类似的观察(参见 Ligush J., R. F. Labadie, S. A. Berceli, J. B. Ochoa, 以及 H. S. Borovetz 于 1992 年在 The Journal of Surgical Research《外科研究杂志》52(5):416-21 中发表的文章 Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel《利用完整血管的体外灌注对内皮一氧化氮介导的血管舒张所进行的评价》)。这些试验证明,有能力在保持无菌环境以及组织存活能力的基础之上完成所设想的猪颈内静脉的体外灌注。

[0151] 进行几组体外血管灌注试验。首先,进行一组试验(每组试验中有 $N = 6$ 个动物),用于建立被突然暴露于动脉生物机械环境中的猪颈内静脉片段所产生的急性增生性应答,并且将其与被暴露于自然的静脉环境中的猪颈内静脉片段所产生的这种应答进行比较。附图 6 是一幅用来表示这一试验设计的示意图,也将在下文中对其进行详细的描述。之后,我们尝试通过逐渐将猪颈内静脉片段 (PIJVs) 暴露于期望的周向室壁应力水平中来削弱这种急性增生性应答,这种逐渐的暴露是通过对有效的体外血管灌注系统 (EVPS) 的压力进行手动调节来完成的。附图 7 是一幅用来表示这一试验设计的示意图,也将在下文中对其进行详细的描述。这些试验直接涉及到建立一种周向室壁应力曲线,所述的曲线是为达到降低急性增生性应答的目的而必不可少的,所述的急性增生性应答是由在增加负荷的条件下 (incrementally-imposed) 经过体外灌注的新鲜离体的静脉片段所产生的,这种急性增生性应答的降低是相较于在被突然暴露于动脉环境下的静脉片段所产生的应答而言的。利用这些结果,我们同样希望对外膜生物可降解性聚合物覆盖物的降解速率进行调整,从而获得同样的周向室壁应力曲线,并且随后利用这些覆盖物削弱猪颈内静脉片段的急性增生性应答,其中所述的削弱是相对于未被覆盖的对照组而言的。附图 8 是一幅用来表示这一试验设计的示意图,也将在下文中对其进行详细的描述。上文中所描述的每一项试验都是“成对”进行的,从而将动物与动物之间的可变性考虑在内,并且在一般情况下按照如下方式进行:通过外科手术方式从幼猪中收集双侧猪颈内静脉片段 (PIJVs) 并且将其置于 (tied into) 分别的、独立的体外血管灌注系统 (EVPS) 中(见下)。血管的灌注试验要进行 24 小时或者 72 小时,因为在这些时间点的几小时范围内成功的检测到需要调查的大部分端点(参见表 1 中的引用文献,见上)。在每一项试验完结的时候,对所述的组织进行处

理（见下），用于进行生物检测，从而评价在表 1 中概括出的所述端点。

[0152] 组织的收集以及输送

[0153] 选择猪颈内静脉 (PIJV) 作为模型，因为它与人类的大隐静脉具有相似的内径以及室壁厚度，并且这种组织先前已经在调查中被使用，用以调查被暴露于动脉血液动力学环境中的静脉的病理学应答。按照搭桥操作中使用的隐静脉切除术的方式完成所述的外科手术收集操作。简单的说，将被麻醉的动物放置在仰卧的位置上，从两面进行颈部的切割，在所述颈部的血管筋膜层中进行切开。对每个猪颈内静脉进行识别并且进行切开，最近端切至所述的颈静脉汇合而最远端切至所述的颈静脉孔。对所有的支流进行识别并且小心的进行结扎以避免渗漏。当暴露出期望的长度时（6-8 厘米），将鸭嘴形导管套管从所述片段的两端插入。在即将被植出之前，在所述套管的一个端点上连接一种为用户定制设计的血管钳（参见 Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, 以及 Borovetz HS 于 1992 年在 J Surg Res《外科研究杂志》52(5):416-21 中发表的文章 Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel《利用完整血管的体外灌注对内皮一氧化氮介导的血管舒张所进行的评价》），用以保持所述的血管在被取出之后的体内长度。随后在所述被夹住的套管与所述的结扎处之间的任意一侧切断所述的血管。在被取出之后，立即将所述的血管放置于一个无菌的输送容器中（含有补充有肝磷脂（500 单位 / 升），罂粟碱（60 毫克 / 升），以及头孢西丁（1.0 克 / 升）的乳酸罗格氏溶液）。从组织收集到被放置于下文所述的灌注系统所用的时间总是少于一小时。

[0154] 静电纺生物可降解性聚合物覆盖物的血管周放置

[0155] 根据 Guan 等人所披露的，用于形成所述的外膜覆盖物的所述生物可降解性聚合物合成物是以聚酯型聚氨酯脲 (PEUU) 材料为基础的（参见 Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, 以及 Wagner WR 于 2002 年在 J Biomed Mater Res《生物医学材料研究杂志》61(3):493-503 中发表的文章 Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine《以聚己内酯以及腐胺为基础的弹性的生物可降解性聚酯型聚氨酯脲的合成，性质，以及细胞顺应性》），并且 Stankus 等人进一步定义了它的静电纺形式（参见 Stankus JJ, Guan J, 以及 Wagner WR 于 2004 年在 J Biomed Mater Res A《生物医学材料研究杂志 A》70(4):603-14 中发表的文章 Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies《利用亚微型形态结构制造生物可降解性弹性支架》以及 Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, 以及 Wagner WR 于 2006 年在 Biomaterials《生物材料》27(5):735-44 中发表的文章 Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix《平滑肌细胞在生物可降解性弹性纤维矩阵中的微整合》）。这种聚合物经历了体外的水解降解，并且被降解成非细胞毒性的降解产物，并且已经表明其在大约 3 个月的时间里已经几乎进行了完全的体内降解（参见 Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, 以及 Wagner WR 于 2007 年在 Ann Thorac Surg《胸外科学年鉴》83(2):648-54 中发表的文章 In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures《针对用于心脏重塑操作的多孔、弹性生物可降解性修饰物的体内评价》以及 Fujimoto KL, Tobita K, Merryman WD, Guan J, Momoi

N, Stolz DB, Sacks MS, Keller BB, 以及 Wagner WR 于 2007 年在 J Am Coll Cardiol《美国心脏病学学院杂志》49(23):2292-300 中发表的文章 An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction《一种弹性的生物可降解性心脏修饰物诱导对收缩性平滑肌的诱导, 对心脏重塑的促进以及在亚急性心肌梗塞中发挥的作用》)。为了对所述覆盖物的降解速率进行控制, 使用聚酯型聚氨酯脲、骨胶原以及弹性蛋白的合成物, 加入蛋白用于加速质量损失。

[0156] 聚酯型聚氨酯脲是聚(ϵ -己内酯)二醇以及 1,4-二异环己酰亚胺在腐胺增链剂的存在下合成得到的。在 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)溶液中对聚酯型聚氨酯脲、骨胶原以及弹性蛋白进行混合, 并且随后使用将在别处进行详细解释的操作将其静电纺作用在猪颈内静脉片段上(参见 Stankus JJ, Guan J, 以及 Wagner WR 于 2004 年在 J Biomed Mater Res A《生物医学材料研究杂志 A》70(4):603-14 中发表的文章 Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies《利用亚微型形态结构制造生物可降解性弹性支架》)。简要说, 静电纺的条件包括: 混合溶液的体积流量为 0.28 微升/秒, 喷嘴与靶子的距离为 17 厘米, 并且施加在所述喷嘴上的电压为 +12 千伏而施加在所述靶子上的电压为 -3 千伏。用于制造在移植中使用的 spun 动脉静脉嫁接物的所述的靶子是 316 型(Type 316)的不锈钢芯棒, 所述的芯棒具有 3 毫米的直径并且其被小心的插入到所述动脉静脉嫁接物的内腔之中, 从而避免内皮的损伤。所述的芯棒同与其同轴的静脉以 250rpm 的转速一同进行旋转, 并且以大约 8 厘米/秒的速度沿其轴在一个线性平台上进行 10 厘米的平移(translate), 从而制造出更加均匀的涂层厚度。

[0157] 用于调整所述聚合物的机械性质以及降解速率的有三个参数: 1) 存在于混合溶液中的所述聚合物的最终浓度; 2) 在所述混合溶液中, 所述的聚酯型聚氨酯脲: 骨胶原: 弹性蛋白的比例; 以及 3) 所述覆盖物的厚度, 其与静电纺时间是成比例的。表 2 中表示的是所有被检测的这些参数的组合的概况。

[0158] 表 2 用于调整聚合物的参数组合的概况

[0159]

组合	聚酯型聚氨酯脲: 骨胶原: 弹性蛋白 (%)	静电纺时间 (分钟)	最终浓度 (%)
A	14.3: 42.3: 42.3	20	6
B	25: 75: 0	15	6
C	50: 50: 0	15	6
D	50: 50: 0	20	12

[0160] 体外灌注条件

[0161] 将静脉片段放置于建立完好的、有效的体外血管灌注/器官培养系统中(EVPS, 参

见,例如, Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, 以及 Borovetz HS 于 1996 年在 Am J Physiol 《美国生理学杂志》270(2 Pt 2 第 2 部分):H760-8 中发表的文章 Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue 《用于对完整血管组织的生物化学途径进行体外调查的脉冲灌注系统》;Severyn DA, Muluk SC, 以及 Vorp DA 于 2004 年在 J Surg Res 《外科学研究杂志》121(1):31-7 中发表的文章 The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro 《血液动力学以及室壁生物机械学对于经过体外灌注的静脉片段的凝血活性的影响》以及 Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC, 以及 Webster MW 于 1998 年在 Journal of Vascular Surgery:Official Publication, the Society For Vascular Surgery 【and】International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter 《血管外科学杂志:血管外科学学会与心脏血管外科学国际学会官方出版物,北美篇章》27(3):521-7 中发表的文章 Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics 《被暴露于冠状动脉血液动力学环境中的静脉片段对组织因子表达的增强》)。简要的说,所述的闭合回路灌注设计允许无菌灌注液(补充有 1% 的胎牛血清以及 1.0 克/升头孢西丁的组织培养培养基 199)经由所述的血管片段进行循环,并且允许进行外膜浴(含有 1% 的胎牛血清以及 1.0 克/升头孢西丁的 Dulbecco's Modified Eagle 培养基)的循环,其中所述的循环发生在一个密闭的腔室中。将所述的灌注液以及外膜浴培养基保持在 37℃ 以及溶解气体的生理水平下。试验利用到两种模拟的血液动力学环境中的一种(参见 Severyn DA, Muluk SC, 以及 Vorp DA 于 2004 年在 J Surg Res 《外科学研究杂志》121(1):31-7 中发表的文章 The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro 《血液动力学以及室壁生物机械学对于经过体外灌注的静脉片段的凝血活性的影响》以及 Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC, 以及 Webster MW 于 1998 年在 Journal of Vascular Surgery:Official Publication, the Society For Vascular Surgery 【and】International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter 《血管外科学杂志:血管外科学学会与心脏血管外科学国际学会官方出版物,北美篇章》27(3):521-7 中发表的文章 Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics 《被暴露于冠状动脉血液动力学环境中的静脉片段对组织因子表达的增强》)——自然静脉 (VEN) 环境或者动脉 (ART) 环境中的一种。为了模拟静脉的血液动力学环境,将所述的灌注回路设定为提供 20 毫升/分钟的非脉冲式流动以及 20 毫米汞柱的压力。为了模拟动脉静脉嫁接物的血液动力学环境,将所述的系统设定成提供 120/80 毫米汞柱的脉冲压力波形以及 100 毫升/分钟的平均灌注液流体。分别进行试验,用以检查处于静脉环境下或者动脉环境下的未被覆盖的静脉,以及处于动脉环境下的被覆盖的静脉 (wART)。每次灌注试验持续 24 小时,每小时测量一次囊内压力,外部直径以及流速。随后利用组织学方法或者经由下文中描述的免疫组织化学方法对静脉片段进行分析。

[0162] 静脉 (VEN) 试验与动脉 (ART) 试验

[0163] 附图 6 的示意图描述的是所完成的第一组体外试验。在这些试验中,我们对覆盖

于猪颈内静脉片段 (PIJVs) 上的生物可降解性静电纺聚合物的有益作用进行了评价,其中将猪颈内静脉片段被突然暴露于动脉环境中的情况与所述的猪颈内静脉片段被暴露于静脉环境下 24 小时的情况进行了比较。

[0164] 动脉 (ART) 试验与经过调节的动脉 (cART) 试验

[0165] 附图 7 的示意图描述的是所完成的第二组体外试验。在这些试验中,我们对机械调节的范例 (cART 环境) 对于猪颈内静脉片段的作用进行了评价,并将其与突然被暴露于动脉环境下 24 小时以及 72 小时的猪颈内静脉片段进行了比较。

[0166] 动脉 (ART) 试验与被覆盖条件下的动脉 (wART) 试验

[0167] 附图 8 的示意图描述的是所完成的第三组体外试验。我们对覆盖于猪颈内静脉片段上的经过调整的生物可降解性聚合物的有益作用进行了评价,其中所述的猪颈内静脉是被暴露于动脉环境下的 (wART 环境),并且将其与被暴露于动脉环境下 24 小时的未被覆盖的猪颈内静脉片段进行了比较。

[0168] 对复式汽缸中的周向室壁应力的计算

[0169] 由于已经确信将动脉静脉嫁接物突然暴露于动脉水平的周向室壁应力中可能导致它们的失效,我们相信所述的静电纺生物可降解性聚合物覆盖物的一种可能的用途将是用于将动脉静脉嫁接物逐渐的暴露于动脉水平的周向室壁应力中。先前使用一种外部包封物来限制周向室壁应力的尝试并没有取得完全的成功,这是因为它们是生物持久性的和/或它们装配的很宽松。为了证明所述的覆盖物怎样来调节周向室壁应力,以及怎样对所述的覆盖物进行调整以达到所期望的结果,我们检查了表 1 中给出的每种覆盖物组合的周向室壁应力随时间变化的曲线 (CWS-over-time profile),并且将这些曲线与被暴露于静脉环境或者动脉环境中的未被覆盖的静脉片段进行比较。利用从体外灌注试验中收集到的数据以及周向室壁应力的数学模型来完成上述检查。

[0170] 为了达到建立生物机械学模型的目的,我们将附图 9 中所述的示意图认定为表示的是所述的静脉/覆盖物复合体的理想化的横截面。所述的双层复合管的外层被认为是所述的静电纺聚合物覆盖物,而所述的同中心的内层被认为是所述的静脉片段。

[0171] 之后,进行下述的假设 (参见 Vorp DA, Raghavan ML, Borovetz HS, Greisler HP, 以及 Webster MW 于 1995 年在 Ann Biomed Eng 《生物医学工程学年鉴》23(2):178-88 中发表的文章 Modeling the transmural stress distribution during healing of bioresorbable vascular prostheses 《对生物可再吸收性人造血管的愈合过程中的透壁应力分配的模建》):

[0172] i) 在所述的层之间没有滑动或者脱离

[0173] ii) 穿越所述分界面的变形的兼容性是保持不变的

[0174] iii) 在平均动脉压力下只有一处小的变形

[0175] iv) 所述的系统处于平面应力的状态下

[0176] v) 两层均是不可压缩的、各向同性的 (isotropic)、均质的以及线性的弹性材料

[0177] vi) 每个单独的层可以被泛化 (generalized) 成为一个单个的、厚壁的圆柱体,所述的圆柱体受到内部压力以及外部压力的影响

[0178] 所述的数学模型由 Vorp 等人 (Id.) 建立,其适合作为附图 9 中所描述的模型。简而言之,我们使用经典的 Lamé 方程来解答一个两端未封闭的、厚壁圆柱体的径向室壁应力

以及周向室壁应力（分别表示为 σ_r 以及 σ_θ ），以及以任意半径 r 存在的径向变形 (u_r)，其中所述的圆柱体受到内部压力以及外部压力的作用 (Id.)。对于附图 9 中所示的所述的内层（静脉），我们得到 (Id.)：

[0179]

$$\sigma_{r,V} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} - \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15a)$$

$$\sigma_{\theta,V} = \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} + \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r^2} \quad (15b)$$

$$u_{r,V} = \frac{1 - \nu_V}{E_V} \frac{(a^2 P_i - b^2 P_2) r}{b^2 - a^2} + \frac{1 + \nu_V}{E_V} \frac{(P_i - P_2) a^2 b^2}{(b^2 - a^2) r} \quad (16)$$

[0180] 其中所使用的下标“V”指的是所述静脉的量，并且 a 以及 b 分别表示所述的静脉层的内部半径以及外部半径。 P_i 是所述的内部压力，而 P_2 是作用于所述的同心圆柱体的两层之间的界面压力，所述的界面压力是由于所述的两层在机械性质上存在的差异而产生的。 ν 是所述的泊松比 (Poisson's ratio) 而 E 是表示弹性的杨氏模量 (Young's modulus)。对于附图 9 中所示的所述的外层（覆盖物），我们得到：

[0181]

$$\sigma_{r,W} = \frac{b^2 P_2 - c^2 P_o}{c^2 - b^2} - \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \quad (17a)$$

$$\sigma_{\theta,W} = \frac{b^2 P_2 - c^2 P_o}{c^2 - b^2} + \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r^2} \quad (17b)$$

$$u_{r,W} = \frac{1 - \nu_W}{E_W} \frac{(b^2 P_2 - c^2 P_o) r}{c^2 - b^2} + \frac{1 + \nu_W}{E_W} \frac{(P_2 - P_o) b^2 c^2}{(c^2 - b^2) r} \quad (18)$$

[0182] 其中所使用的下标“w”指的是被所述的覆盖物占据的区域的量，并且 b 以及 c 分别表示所述的覆盖物层的内部半径以及外部半径。 P_o 是所述的外部压力。鉴于在所述的层之间的穿越分界面的变形的兼容性，必定存在下述关系：

[0183] 当 $r = b$ 时， $u_r, v = u_r, w$ (19)

[0184] 将 (16) 以及 (18) 代入 (19) 中，使 $\nu_w = \nu_v = \nu = 0.5$ (假设两种材料均是不可压缩的)，设定 $P_o = 0$ (即，大气压力)，并且对 P_2 进行求解，我们得到：

$$P_2 = \frac{a^2 P_i (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 P_i}{b^2 (1 - \nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1 - \nu) a^3 E_v (b^2 - a^2) + (1 + \nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 + c^2 E_v b (b^2 - a^2)} \quad (20)$$

[0186] 回想起在我们进行的体外灌注试验中测量了 P_i 以及外部直径 (即， c)。因此我们需要对每组 P_i 以及 c 的测量值进行内部半径 ($r = a$) 以及界面半径 ($r = b$) 的估算。因为我们假设所述的静脉以及覆盖物均是不可压缩的材料，这要求每个圆柱体无论处于何种变形的状态下，其体积都是恒定不变的，则必定存在下述关系：

$$[\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_u = [\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_p \quad (21)$$

[0188] 其中 r_o 以及 r_i 分别是所述的外部半径以及内部半径, 并且 L 是每个圆柱体的长度, 而所述的下标 u 以及 p 分别指的是未加压的状态以及加压的状态。将等式 (21) 应用至附图 9 中所示的所述“覆盖物”圆柱体的几何学中, 得到:

$$[0189] \quad b_p = \sqrt{\frac{c_p^2 L_p - (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}} \quad (22)$$

[0190] 因此对于 c_p 以及 L_p 的任意测量值而言, 都可以计算出 b_p 的值。类似的, 仅对附图 9 中所述的“静脉”圆柱体进行考虑, 并且运用计算 b_p 的等式 (22), 我们发现:

[0191]

$$a_p = \sqrt{\frac{\left(\frac{c_p^2 L_p (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p} \right) L_p - (b_u^2 - a_u^2) L_u}{L_p}} \quad (23)$$

[0192] 将等式 (20)、(22) 以及 (23) 代入等式 (15b) 中, 并且在所述的平均动脉压力以及

在 $r = \frac{a_p + b_p}{2}$ 时进行评价, 我们可以计算出在所述的聚合物覆盖的静脉中的中层室壁

的周向室壁应力。在我们的计算中, 我们假设 $E_w = 7.5 \text{ Mpa}$ (参见 Stankus JJ, Guan J, 以及 Wagner WR 于 2004 年在 J Biomed Mater Res A 《生物医学材料研究杂志 A》70(4):603-14 中发表的文章 Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies 《利用亚微型形态结构制造生物可降解性弹性支架》), 并且 $E_v = 600 \text{ KPa}$ (参见 Wesly RL, Vaishnav RN, Fuchs JC, Patel DJ, 以及 Greenfield JC 于 1975 年在 Circulation Research(Online) 《循环研究(在线)》37(4):509-20 中发表的文章 Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man 《狗以及人的正常静脉组织以及动脉血化的静脉组织的静态线性弹性性质以及非线性弹性性质》)。

[0193] 血管收缩挑战试验

[0194] 为了评价所述的静电纺过程对于组织存活能力所起的作用, 我们在适当的位置处检查了覆盖有所述的聚合物覆盖物 (“spun”) 的猪颈内静脉片段以及未覆盖所述的聚合物覆盖物 (“sham”) 的猪颈内静脉片段, 以及未经过处理的新鲜离体 (“对照”) 的组织。对于没有覆盖静电纺聚合物覆盖物的所述 sham 猪颈内静脉片段, 我们模仿了所述的静电纺过程, 直至到达了实际上放置所述聚合物覆盖物的程度 (即, 包括插入所述的芯棒并且在电场中进行所述静脉的旋转/平移)。使用先前描述的体外血管收缩挑战对组织的功能性进行了评价 (参见 Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, 以及 Borovetz HS 于 1996 年在 Am J Physiol. 《美国生理学杂志》270(2 Pt 2 第 2 部分):H760-8 中发表的文章 Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue 《用于对完整血管组织的生物化学途径进行体外调查的脉冲灌注系统》以及 Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, 以及 Borovetz HS 于 1992 年在 J Surg Res 《外科研究杂志》52(5):416-21 中发表的文章

Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel 《利用完整血管的体外灌注对内皮一氧化氮介导的血管舒张所进行的评价》)。简而言之,向血管片段中插入导管,将其放置于 20 毫米汞柱的恒定的囊内压力下,并且暴露于增加剂量的肾上腺素 (EPI) 中。在所述的试验过程中,利用激光千分尺对血管的外部直径 (D) 进行连续的测量 (参见 Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, 以及 Borovetz HS 于 1996 年在 Am J Physiol. 《美国生理学杂志》270(2 Pt 2 第 2 部分):H760-8 中发表的文章 Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue 《用于对完整血管组织的生物化学途径进行体外调查的脉冲灌注系统》; Brant AM, Rodgers GJ, 以及 Borovetz HS 于 1987 年在 J Appl Physiol 《应用生理学杂志》62(2):679-83 中发表的文章 Measurement in vitro of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser 《利用氦-氖激光对脉冲式动脉直径进行的体外测量》; 以及 Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, 以及 Borovetz HS 于 1992 年在 J Surg Res 《外科研究杂志》52(5):416-21 中发表的文章 Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel 《利用完整血管的体外灌注对内皮一氧化氮介导的血管舒张所进行的评价》)。在注射第一剂量的肾上腺素之前对所述的基线直径 ($D_{\text{基线}}$) 进行测量。随后分别在 1 分钟、4 分钟、5 分钟、以及 10 分钟的时间内注射 2×10^{-5} 毫克 / 毫升、 2×10^{-4} 毫克 / 毫升、以及 2×10^{-3} 毫克 / 毫升最终浓度的肾上腺素。在一种剂量下观察到最强烈的血管收缩之后,再施用下一种剂量。当施用过所述最大剂量的肾上腺素之后,并且在观察到最强烈水平的收缩 ($D_{\text{收缩}}$) 之后,向其中注射 25 毫克 / 毫升硝普钠 (SNP) 的 2 毫升的丸剂,从而获得 0.125 毫克 / 毫升的最终浓度。当观察到完全的膨胀时,记录下 $D_{\text{膨胀}}$ 。为应答于肾上腺素而产生的收缩的水平按如下方式进行计算:

[0195]

$$\% \text{ 收缩} = \frac{D_{\text{基线}} - D_{\text{收缩}}}{D_{\text{收缩}}} * 100 \quad (24)$$

[0196] 类似的,为应答于硝普钠而产生的膨胀的水平按如下方式进行计算:

[0197]

$$\% \text{ 膨胀} = \frac{D_{\text{膨胀}} - D_{\text{收缩}}}{D_{\text{收缩}}} * 100 \quad (25)$$

[0198] 顺应性以及 β -硬度的测量

[0199] 在上文中描述的动脉 (ART) 环境与经过覆盖的动脉 (wART) 环境下的 24 小时灌注试验 ($N = 6$) 的过程中,对外部直径 (OD) 以及囊内脉冲压力 (P) 进行每小时一次的测量。利用这些测量值对 spun 以及 sham 对照猪颈内静脉片段的顺应性 (C) 以及 β -硬度 (β) 进行计算。在 150 赫兹的取样频率下,所进行的每小时一次的测量需要进行 5 秒钟,这样一来可以收集到大约 5 个完整的“心动周期”的数据。之后对所获得的信号进行过滤并且绘图。利用每个循环中的最大值 (OD_s 以及 P_s) 以及最小值 (OD_d 以及 P_d),使用等式 26 来计算 C 并且使用等式 27 来计算 β (参见 Hayashi K 于 1993 年在 J Biomech Eng. 《生物机械

工程学杂志》115(4B):481-8 中发表的文章 Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls 《测量动脉室壁的机械性质以及本构关系的实验室方法》)。取上述 5 个值的平均值并且利用 C 以及 β 的单一值进行每小时的计算。

$$[0200] \quad C = \frac{\left(\frac{OD_s - OD_d}{OD_d} \right)}{P_s - P_d} \quad (26)$$

$$[0201] \quad \beta = \frac{\ln(P_s - P_d)}{\left(\frac{OD_s - OD_d}{OD_d} \right)} \quad (27)$$

[0202] 灌注后的组织处理

[0203] 我们将对持续 1 天以及持续 3 天的试验的端点 (endpoint) 进行评价。我们已经确定,当利用新鲜离体的血管片段时,在这种灌注过程中可以保持组织的存活能力(参见 Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, 以及 Borovetz HS 于 1992 年在 J Surg Res 《外科研究杂志》52(5):416-21 中发表的文章 Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel 《利用完整血管的体外灌注对内皮一氧化氮介导的血管舒张所进行的评价》)。通过对第 1.2 部分中概括的各种经过认真选取的端点进行测量,可以对所述静脉的增生性应答进行量化。根据所需要进行的组织处理,可以将这些端点划分为三类:i) 组织学处理(包括微结构/超微结构);ii) RNA 分析;以及 iii) 蛋白分析。依照附图 10 中的描述,对所有的静脉片段进行分割以及处理。

[0204] 生物学分析

[0205] 根据所需要进行的检测的类型,可以将上述提出的生物学端点定义为组织学的或者分子学的。所述的组织学端点包括对微结构、细胞凋亡、增殖、平滑肌细胞的表型标记物、以及细胞黏附标记物进行评价。所述的蛋白以及基因表达端点需要对蛋白以及 RNA 进行分离,并且被归为分子类。

[0206] 将专门用于进行组织学分析的样本(附图 10)从冷冻器中取出并且将其立即包埋于 Tissue Freezing Medium™(组织冷冻培养基)(Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) 中并且在 -65°C 下冷冻。使用低温切片机切成五微米的横截面,并且将其放置于带正电荷的玻璃显微镜载片上。将所述的载片于 -80°C 下储存直至对它们进行组织学或者免疫组织化学检测。

[0207] 组织学检测

[0208] 在将所述的静脉从所述的体外灌注系统中取出后,将它们在 4°C 下固定于 4% 的多聚甲醛中 4 小时并且随后在 4°C 下将其固定于 30% 的蔗糖中过夜。切成 5 毫米的组织环,利用磷酸缓冲液 (PBS) 进行洗涤,将其包埋于 Tissue Freezing Medium™(组织冷冻培养基)(Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) 中,并且切成 5 微米的片段。将所述的组织片段进行苏木精与伊红 (H&E) 染色、Masson's 三色染色 (MTC)、天狼猩红染色、或者 Movat's 五色染色。之后利用 Olympus Provis 光学显微镜 (Olympus, Center Valley, PA,

USA) 对经过染色的组织片段进行显像,并且进行质量上的比较。

[0209] 扫描电子显微镜方法

[0210] 在扫描电子显微镜 (SEM) 下对所述的静电纺覆盖的猪颈内静脉片段进行检查。简而言之,将被指定用于进行扫描电子显微镜成像的组织片段固定于超纯的 2.5% 的戊二醛中,通过系列分级的乙醇溶液 (30-100%) 进行脱水,临界点干燥 (Emscope, CPD 750, Ashford, Kent, UK),之后利用碳蒸汽 (Cressington 冷冻破裂装置, Cressington, Cranberry, PA, USA) 进行涂覆。利用 JEOL JEM-6335F 场发射电子枪扫描电子显微镜 (JEOL, Peabody, MA, USA) 对所述的组织进行显像。

[0211] 坏死

[0212] 为了评价所述的静电纺过程对于组织存活能力所起的作用,我们检查了 spun 猪颈内静脉片段以及 sham 猪颈内静脉片段,以及未经过处理的新鲜离体 (“对照”) 的组织。按照制造商提供的说明书,使用 Live/Dead™ 冷冻切片染色 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) 对组织坏死进行检查。意在进行 Live/Dead™ 染色的每个片段 (对照, sham 对照以及 spun) 被切成两半并且被放置于皮氏培养皿中在标准的培养皿环境下进行静态培养。在经过 18 小时的培养之后,对每个片段的一半进行评价,在 92 小时的培养之后对另外一半进行评价。从每种样本中切下 5 毫米的环并且将其包埋于冷冻包埋剂 (TBS, Durham, NC) 中之后进行冷冻。从每个环上切下 5 个 8 微米的片段并且使用一种落射荧光显微镜 (Nikon, Model E800, Melville, NY, USA) 在 20 倍放大的条件下对其进行成像。每个片段进行两次成像,这样一来对于每个猪颈内静脉片段而言共有 10 个视野 (field of view) 用于进行量化。利用 Scion Image (Beta 4.02 版本, NIH, Bethesda, MD) 对每个视野中的细胞总数进行计算。为了确定在一个视野中的存活细胞的百分含量,对死亡细胞进行人工计算,除以所述的细胞总数,并且乘以 100%。从 100% 中减去所述的死亡细胞的百分含量,从而计算出所述的存活细胞的百分含量。

[0213] 细胞凋亡

[0214] 使用原位细胞凋亡检测试剂盒 (In Situ Cell Death Kit), 荧光素 (TUNEL) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 对细胞凋亡进行评价。这种检测使用到所述的末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP- 生物素缺口原位末端标记技术,这种技术能够识别出细胞凋亡的染色体组 DNA 分裂成分。简要的说,将横截面在 37℃ 下干燥 20 分钟,在 4% 的多聚甲醛中固定 20 分钟,并且在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中进行 30 分钟的再水合。随后,将样本分别在 10 微克 / 毫升的蛋白酶 K、随后是新鲜制备的 0.1% 的 Triton X-100 溶液以及 0.1% 的柠檬酸钠中进行 10 分钟的室温下的培养,用于进行膜的渗透化。通过在 37℃ 下培养 1 小时,可以识别出 DNA 链的断裂,其中所述的培养是在末端脱氧核苷转移酶以及生物素标记的 dUTP (均由来自于 Roche 的试剂盒所提供) 中进行的。利用 Hoechst 33258 对细胞核进行复染色。利用 100U/ 毫升的脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 对一小组样本进行处理,作为每次进行所述检测时的阳性对照,从而确保有效性。利用经过脱氧核糖核酸酶 I 处理的阳性对照对所有的样本制备参数进行优化,包括培养时间,温度,以及试剂浓度。利用经过标记的 dUTP 对阴性对照进行培养,而不使用所述的转移酶。

[0215] 利用人工计算的步骤完成对 TUNEL 阳性细胞的百分含量的量化。对于一个给定的 5 微米的横截面而言,取 5 个视野中的每一个中的阳性细胞的平均数,从而定义出这个横截

面的阳性细胞的平均百分含量。从而确定来自于一个片段上的 TUNEL 阳性细胞的平均百分含量（附图 10）。

[0216] 增殖

[0217] 通过由免疫组织化学方法确定的增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达对增殖进行评价。按照在所述的末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP- 生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 检测中的描述,对五微米的横截面进行干燥,固定化,以及渗透化。利用 1% 的马血清的磷酸盐缓冲液对所述的样本进行 15 分钟的培养,从而阻断抗体的非特异性结合。在此之后,在 4℃ 下,在保湿腔室中利用抗人类增殖细胞核抗原 (Dako Cytomation, Clone PC10, Denmark) 的原发性小鼠单克隆抗体对所述的样本进行过夜培养,从而防止样本的干燥。通过随后利用磷酸盐缓冲液进行的洗涤,除去未结合的原发性抗体。接着,在 37℃ 下,在保湿腔室中利用一种通用的 (抗小鼠以及抗兔) 生物素标记的次级抗体对所述的横截面进行 60 分钟的培养,并且随后利用磷酸盐缓冲液漂洗三次,其中所述的通用的生物素标记的次级抗体属于 Vectastain Elite™ 辣根过氧化物酶以及亲和素-生物素检测系统 (Vector Labs, Cat. #PK-6200, Burlingame, CA) 中的一部分。此后,在室温下利用所述的 Vectastain™ 试剂进行 30 分钟的培养。为了检测阳性染色的细胞,使用到一种二氨基联苯胺 (DAB) 底物 (Vector Labs, Cat. #SK-4100, Burlingame, CA)。所述的酶反应使得增殖细胞核抗原 (PCNA) 阳性细胞被染成褐色,直至达到期望的染色水平,这种现象可以通过显微镜 (100 倍放大) 进行显现。之后,通过将所述的载片放置于去离子水中来终止所述的反应。为了对细胞核进行显像,依照制造商提供的说明书,使用苏木精 (Vector Labs, Cat. #H-3401, Burlingame, CA) 对细胞进行复染色。利用与在末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP- 生物素缺口原位末端标记 (TUNEL) 检测中所使用的相同的方法完成增殖细胞核抗原阳性细胞的百分含量的量化。

[0218] 平滑肌细胞的表型

[0219] 为了对合成的平滑肌细胞的表型进行检测,我们使用到抗人类高尔基体的小鼠单克隆抗体 (Abcam, Cat. #ab 14487, Cambridge, MA)。使用与上文中 (增殖细胞核抗原) 所描述的同样的方法对每个静脉片段中的高尔基体阳性细胞的平均百分含量进行量化。

[0220] 统计学处理

[0221] 为了获得所述的血管收缩挑战数据,以及免疫组织化学图像的量化数据,需要完成一个成对的学生 t 检验,并且 $P < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。除非另外指明,所表示的数据全部是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0222] 结果

[0223] 周向室壁应力曲线

[0224] 当我们对附图 11 中所述的外部直径曲线进行检查时发现,所述的覆盖物提供给静脉的结构支撑是明显的。附图 11 中表示出,当处于动脉环境中时,带有覆盖物的静脉不与不带有覆盖物的静脉发生同等程度的膨胀。正如下文中所述,与存在于同样水平的动脉压力下的未被覆盖的对照相比,直径的减小有效的降低了所述静脉室壁的周向室壁应力。

[0225] 表 3.1 中所示的聚合物溶液的组分的周向室壁应力随时间变化的曲线是大不相同的 (附图 12)。在一种情况中 (组合 B),所述的覆盖物降解的过于迅速并且导致周向室壁应力在动脉环境下的快速增长。其他的组合 (C 以及 D) 没有发生足够迅速的降解,并且

导致在经过 24 小时的时间段之后周向室壁应力没有发生可感知的增长。组合 A 的降解速率导致在经过 24 小时的时间段之后周向室壁应力在静脉水平以及动脉水平下产生了接近线性的变化。对这种组合进行重复 ($N = 7$) 并且发现所述的效应也是可以重现的。

[0226] 血管收缩挑战结果

[0227] 附图 13 中表示出了典型的血管收缩挑战试验的结果。所述的 sham 猪颈内静脉片段以一种可预计的剂量依赖形式对肾上腺素 (EPI) 的刺激产生了应答,而所述的 spun 猪颈内静脉从最低剂量的肾上腺素开始表现出了单一的收缩性。对于所述的对照以及 spun 猪颈内静脉片段而言,为应答于硝普钠 (SNP) 而形成的血管舒张是相似的,均产生了与基线相比更大的外部直径,这表明在所述的 sham 猪颈内静脉片段以及 spun 猪颈内静脉片段中均存在某种水平的基础紧张性 (basal tone)。总的来说,在 sham 猪颈内静脉片段以及 spun 猪颈内静脉片段之间不存在收缩水平 (附图 14A) 或者膨胀水平 (附图 14B) 上的显著差异。

[0228] 顺应性以及 β -硬度

[0229] 在附图 15A 以及 15C 中,我们看到当猪颈内静脉片段被暴露于动脉水平的压力下时是非常僵硬的 (并且因此具有非常差的顺应性)。在同样的血液动力学环境下,由于硬度的降低 (附图 15B) 以及顺应性的增加 (附图 15D),可以显而易见的看到在所述的猪颈内静脉片段的外膜表面上纺成的经过调整的聚合物覆盖物提供了结构上的支撑。请注意,由于技术问题,不可能对所述 sham 对照中的一组进行压力以及直径的测量,并且因此其获得的数据组 ($N = 5$ 比所述的 spun 组 ($N = 6$) 中少一组。

[0230] 生物学分析

[0231] 组织学分析

[0232] 组织成像与所述的扫描电子显微镜 (SEM) 成像是是一致的,这是因为它们同样能够表示出与所述的静脉外膜表面具有良好接触的所述的聚合物覆盖物并且它可以以一种大致均匀的厚度进行静电纺作用 (附图 16A 以及 19C)。进一步的,在所述的 24 小时的灌注时间段之后,所述的聚合物几乎发生了完全的降解 (附图 16B 以及 16D)。

[0233] 附图 17 表示的是经过天狼猩红染色的静脉片段的代表性的双折射成像。在每个图像中,所述的由红到绿的颜色范围表示的是骨胶原纤维组织化的范围,红色代表发生了最强烈的组织化而绿色代表发生了较弱的组织化。上述染色的颗粒状的外观表示的是天然起褶皱的骨胶原纤维状态,而经过伸展的纤维表现出细条纹状而不是颗粒状。这些结果表明,与对照的猪颈内静脉片段相比,所述的聚合物覆盖物降低了所述骨胶原纤维的伸展水平 (包括更加强烈的组织化以及降低的褶皱现象),其中所述的对照片段在动脉环境下经过了 24 小时的体外灌注。

[0234] 附图 18 表示的是经过 Movat's 五色染色的组织片段的代表性的图像。当与静脉 (VEN) 环境以及经过覆盖的动脉 (wART) 环境相比时,在动脉环境下经过灌注的猪颈内静脉片段的内部弹性薄层似乎被破坏。当利用天狼猩红进行染色时,这一数据表明,当被暴露于动脉环境中时,所述的聚合物覆盖物成功的降低了所述静脉室壁内的伸展水平。

[0235] 扫描电子显微镜 (SEM) 成像

[0236] 所述的静电纺外膜覆盖物表现出高度的多孔性以及对于所述的静脉外膜表面的紧密的黏附性 (附图 19A-C),这表明所述的覆盖物能够对动脉静脉嫁接物提供结构上的支撑并且不会抑制外膜营养物质以及气体向所述组织中的扩散。另外一个重要的观察是,所

述的静电纺过程不会对所述的内皮层进行损坏,所述的内皮层仍然保持连续(附图 19D)。

[0237] 坏死

[0238] 在各个试验组的各个时间点(附图 20)之间不存在组织存活能力上的显著差异。

[0239] 细胞凋亡

[0240] 附图 21 表示的是末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记(TUNEL)染色所获得的代表性的成对的荧光素免疫组织化学图像,其中所述的染色来自于上文中所述的全部四个体外血管灌注试验。附图 22 表示的是从这些试验中获得的定量末端脱氧核苷转移酶介导的 dUTP-生物素缺口原位末端标记(TUNEL)分析结果。可以看到,与静脉对照组相比,在突然被暴露于动脉环境下的猪颈内静脉片段中,凋亡的细胞发生了统计学意义上的显著的增多。然而,与动脉对照环境相比,在经过调节的动脉环境下(24 小时以及 72 小时)以及利用所述的生物可降解性静电纺聚合物覆盖物(wART 环境)的机械调节范例使得猪颈内静脉片段内的凋亡细胞的数量发生了统计学意义上的显著的减少。

[0241] 增殖

[0242] 附图 23 表示的是增殖细胞核抗原(PCNA)染色所获得的代表性的成对的基于抗生素-生物素化的辣根过氧化物酶(HRP/ABC)的免疫组织化学图像,其中所述的染色来自于上文中所述的全部四个体外血管灌注试验。附图 24 表示的是从这些试验中获得的定量的增殖细胞核抗原分析的结果。可以看到,与静脉对照组相比,在突然被暴露于动脉环境下的猪颈内静脉片段中,增殖的细胞发生了统计学意义上的显著的减少。然而,与动脉对照环境相比,在经过调节的动脉环境下(24 小时)以及利用所述的生物可降解性静电纺聚合物覆盖物(wART 环境)的机械调节范例统计学意义上显著的抑制了猪颈内静脉片段内的增殖细胞的数量减少。与动脉对照组相比,在被暴露于经过调节的动脉环境下 72 小时后,猪颈内静脉片段内的增殖细胞的数量并不存在统计学意义上的差异。

[0243] 平滑肌细胞表型

[0244] 附图 25 表示的是高尔基体染色所获得的代表性的成对的基于抗生素-生物素化的辣根过氧化物酶(HRP/ABC)的免疫组织化学图像,其中所述的染色来自于上文中所述的全部四个体外血管灌注试验。附图 26 表示的是从这些试验中获得的定量的高尔基体分析的结果。可以看到,与静脉对照组相比,在突然被暴露于动脉环境下的猪颈内静脉片段中,高尔基体阳性染色的细胞的数量发生了统计学意义上的显著的增加。在经过调节的动脉环境下(24 小时以及 72 小时)以及利用所述的生物可降解性静电纺聚合物覆盖物(wART 环境)的机械调节范例表明,与动脉对照环境相比,统计学意义上显著的抑制猪颈内静脉片段内的高尔基体阳性染色的细胞的数量增加只是一种趋势。

[0245] 讨论

[0246] 在这一章节中的研究表明,生物可降解性静电纺聚合物覆盖物可以被均匀的(附图 16)并且安全的(附图 13 以及 14)被静电纺在静脉片段之上,并且可以对所述的覆盖物进行调整,使其发生完全的降解(附图 16),这样一来,周向室壁应力以一种期望的速率被施加至动脉静脉嫁接物之上(附图 12)。通过对被放置于外膜的静电纺聚合物覆盖物的降解速率进行控制,使得所述的覆盖物具有三种可能的有益的支撑形态,从而削弱动脉静脉嫁接物的内膜增生。正如这里所示,生物机械支撑可以以一种期望的速率进行传递。因此,使用同样的途径能够在理论上达到对生物化学(药物)支撑以及生物学(细胞)支撑的

传递（参见 Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, 以及 Wagner WR 于 2006 年在 *Biomaterials* 《生物材料》27(5):735-44 中发表的文章 *Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix* 《平滑肌细胞在生物可降解性弹性纤维矩阵中的微整合》以及 Stankus JJ, Soletti L, Kazuro F, Hong Y, 以及 Vorp DA 于 2007 年发表的文章 *Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization* 《通过静电雾化作用进行细胞微整合的血管构造的制造》; 公知常识)。通过所述的天狼猩红染色以及 Movat's 五色染色可以观察到动脉静脉嫁接物微结构之上的所述的聚合物覆盖物所具有的潜在的有益作用（分别参见附图 17 以及 18）。所述的聚合物覆盖物看上去能够向动脉静脉嫁接物提供结构上的支撑, 从而产生具有更加天然的褶皱构象的骨胶原纤维（附图 17）, 并且给所述的内部弹性薄层带来更少的损伤（附图 18）。保持构成所述动脉静脉嫁接物室壁的结构蛋白的完整性, 能够帮助将所述的血管内皮细胞 (EC) 以及平滑肌细胞 (SMC) 接收到的有害的机械式触发减小到最小化, 并且因此可以帮助削弱动脉静脉嫁接物的内膜增生。我们还通过对所述的静电纺猪颈内静脉片段进行的 Live/Dead™染色来评价坏死的水平, 并且证明了由于在 sham 以及静态对照组中进行了静电纺处理, 所述的坏死没有发生可感知的增加（附图 19）。除了所述的血管收缩挑战数据（附图 13 以及 14）之外, 这一数据更加明显的表示出组织的存活能力并不受到静电纺的影响。

[0247] 所述的免疫组织化学结果表明, 与突然将动脉静脉嫁接物暴露于动脉水平的周向室壁应力下相比, 将其逐渐暴露于动脉水平的周向室壁应力是有益的。正如分别在附图 22 以及附图 24 中所看到的, 存在于细胞凋亡与细胞增殖之间的平衡被破坏, 这是因为与静脉对照组相比, 将猪颈内静脉片段突然暴露于动脉环境下所导致的。所观察到的在动脉环境下被灌注的猪颈内静脉片段中的细胞凋亡的增加以及增殖的减少表明, 由于所述静脉的生物机械学环境的改变, 在细胞功能间存在一种直接的转换。经由 cART 以及 wART 体外灌注条件所提供的动脉水平的周向室壁应力的逐渐施加表现出对于静脉内的细胞功能间的这种转换的抑制。除此之外, 与静脉对照组相比, 预期看到被暴露于动脉环境中的猪颈内静脉片段的高尔基体表达水平的增加（附图 26）, 这表明对于平滑肌细胞表型的调节达到了一种更加综合的状态。经由 cART 或者 wART 条件所提供的动脉水平的周向室壁应力的逐渐暴露不能在统计学意义上显著的抑制这种观察到的细胞功能 jian 的转换。然而, 在附图 26 中表示出了所观察到的对于这种转换的抑制作用的趋势。需要进行额外的试验, 来确定这种趋势是否能够变成统计学显著的。

[0248] 由于将猪颈内静脉片段暴露于动脉环境中而观察到的平滑肌细胞表型的转化与先前报道的数据相一致（参见 Simosa HF, Wang G, Sui X, Peterson T, Narra V, Altieri DC, 以及 Conte MS 于 2005 年在 *J Vasc Surg* 《血管外科学杂志》41(4):682-90 中发表的文章 *Survivin expression is up-regulated in vascular injury and identifies a distinct cellular phenotype* 《Survivin 表达在血管损伤中的上调及其对一种独特的细胞表型的识别》; Zhang WD, Bai HZ, Sawa Y, Yamakawa T, Kadoba K, Taniguchi K, Masuda J, Ogata J, Shirakura R, 以及 Matsuda H 于 1999 年在 *J Vasc Surg* 《血管外科学杂志》30(1):169-83 中发表的文章 *Association of smooth muscle cell phenotypic modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in*

rabbit vein grafts 《在兔静脉嫁接物的新生内膜形成过程中与细胞外基质的转化相关的平滑肌细胞的表型的调节》;以及 Wolff RA, Malinowski RL, Heaton NS, Hullett DA, 以及 Hoch JR 于 2006 年在 J Vasc Surg 《血管外科学手术》43(5):1028-36 中发表的文章 Transforming growth factor-beta lantisense treatment of rat vein grafts reduces the accumulation of collagen and increases the accumulation of h-caldesmon 《大鼠静脉嫁接物的转化生长因子 $\beta 1$ 反义治疗对骨胶原的积累的减少以及对 h-caldesmon 的积累的增加》)。向动脉静脉嫁接物逐渐施加动脉水平的周向室壁应力这一概念先前并没有被报道过,但是其可能产生一种对平滑肌细胞表型的调节的阻碍或者抑制,这种阻碍或者抑制可能因此降低所述的增生性应答。与静脉环境相比,被暴露于动脉环境中的猪颈内静脉片段的细胞凋亡的减少同样与被公开的结论一致(参见 Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, 以及 Kent KC 于 2002 年在 Surgery 《外科学》132(2):317-25 中发表的文章 The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation 《信号蛋白 rho 是血管平滑肌迁移并且存活的必要因素但不是增殖的必要因素》;Pintucci G, Saunders PC, Gulkarov I, Sharony R, Kadian-Dodov DL, Bohmann K, Baumann FG, Galloway AC, 以及 Mignatti P 于 2006 年在 Faseb J. 《美国实验生物学学会联合会官方出版物》20(2):398-400 中发表的文章 Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of topical mapk inhibition in arterialized vein grafts 《在动脉血化的静脉嫁接物中的局部 mapk 抑制的抗增殖以及抗炎作用》;Alcocer F, Whitley D, Salazar J, Jordan W, 以及 Bland KI 于 2001 年在 J Surg Res 《外科学研究杂志》96(1):75-80 中发表的文章 Mutual exclusion of apoptosis and hsp 70 in human Vein intimal hyperplasia in vitro 《在人类静脉内膜的体外增生中细胞凋亡与热休克蛋白 70 的互斥作用》;Igase M, Okura T, Kitami Y, 以及 Hiwada K 于 1999 年发表的文章 Apoptosis and bcl-xs in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries 《在具有球囊损伤的颈动脉的内膜增厚作用中的细胞凋亡以及 bcl-xs 基因》96(6):605-12; Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, Hanke S, Heise N, Lenz C, 以及 Hanke H 于 2000 年在 Cardiovasc Res 《心脏血管研究》45(3):766-76 中发表的文章 Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model 《在动脉粥样硬化的兔模型中进行球囊血管成形术后内膜增生以及细胞凋亡的发病率》;以及 Wang GJ, Sui XX, Simosa HF, Jain MK, Altieri DC, 以及 Conte MS 于 2005 年在 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 《动脉硬化症,血栓症,以及血管生物学》25(10):2081-7 中发表的文章 Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein 《一种凋亡蛋白抑制剂, survivin 基因对于静脉嫁接物增生的调节》)。然而,与静脉组、经过调节的动脉组、以及经过覆盖的动脉组相比,在动脉条件下进行灌注的猪颈内静脉片段中的增殖的降低与某些被公开的数据不一致(参见 Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, 以及 Yasuda K 于 2002 年在 Int Angiol. 《国际血管学》21(3):250-5 中发表的文章 Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement 《放置血管内支架之后血管紧张素转换酶的诱导作用》;Preedel HG, Yang Z, von-Segesser L, Turina M, Buhler FR, 以及 Luscher TF 于 1992 年在 Lancet 《柳叶刀》340(8824):878-9 中发表的

文章 Implications of pulsatile stretch in growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle 《脉动应力对于隐静脉以及乳腺动脉平滑肌的生长的暗含意义》以及 Dethlefsen SM, Shepro D, 以及 D'Amore PA 于 1996 年在 J Vasc Res. 《血管研究杂志》33(5) :405-13 中发表的文章 Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro 《机械刺激对于体外静脉平滑肌细胞以及动脉平滑肌细胞的作用的比较》)。然而, Liu 等人提议, 由动脉血液动力学所产生的机械应力能够诱导细胞的死亡, 这可能介导随后的细胞增殖 (参见 Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, 以及 Kent KC 于 2002 年在 Surgery 《外科学》132(2) :317-25 中发表的文章 The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation 《信号蛋白 rho 是血管平滑肌迁移并且存活的必要因素但不是增殖的必要因素》)。在这篇论文中研究的短期的时间点没有足够的长度, 不能观察到增殖的上升, 其中所述的增殖的上升发生在在动脉环境下被灌注的猪颈内静脉片段的细胞凋亡的初始增加之后。

[0249] 应当注意到这一章节中的几点局限性。尽管所述的 Live/Dead™检测被广泛的用于评价存活细胞以及组织中的坏死, 但可以被证明其并不能理想化的适用于我们所说的应用中。这是因为所述的试剂能够在所述的血管组织的厚度内进行扩散的距离有限。可以观察到, 所述的染色主要发生在所述静脉室壁的内膜层以及外膜层, 而所述的中层在很大程度上缺乏这种信号。事实是, 所述的静电纺过程的副作用应当产生于所述的聚合物覆盖物与所述的静脉室壁 (即, 所述的外膜) 之间的接触这一方面, 以及所述的芯棒与所述的静脉室壁 (即, 所述的内腔) 之间的接触这一方面。在上述这些方面, 所述的 Live/Dead™检测进行的很好, 并且当与对照组织进行比较时, 坏死的水平没有表现出可感知的增加。除此之外, 所述的血管收缩挑战数据指明, 所述的 spun 猪颈内静脉能够以与所述的 sham 对照相同的强度进行收缩, 这证明了所述的平滑肌细胞的存活能力, 其中所述的平滑肌细胞中包括了所述组织的中层。最终, 我们可以理想化的将所述的 sham 猪颈内静脉片段以及 spun 猪颈内静脉片段的血管收缩性应答与基线对照组的应答进行比较——即, 与一种新鲜离体的猪颈内静脉片段进行比较。然而, 获取第三个猪颈内静脉片段进行直接检测是不可行的, 因为我们仅能从每个动物中收集两个猪颈内静脉片段。我们认识到选择 sham 对照而不选择基线对照是可以接受的, 因为我们仅仅希望对与静电纺相关的差异进行评价。

[0250] 结论

[0251] 我们在这里表明, 可以将一种可以调整的聚合物覆盖物应用至静脉片段之上并且不用在存活能力或者功能方面进行妥协, 并且它的一项可能的应用已经被证明, 即, 向被暴露于动脉水平的压力下的被覆盖的静脉逐渐施加所述的中层室壁的周向室壁应力。所述的动脉水平的周向室壁应力的逐渐施加, 而不是突然的暴露, 可以成为用于减少动脉静脉嫁接物的增生性应答、促进安全的动脉血化过程的替代的一种重要的新方式。

[0252] 医药品或者细胞向外膜聚合物覆盖物中的导入代表了一种可能的未来的应用, 并且可以进一步的增强所述动脉静脉嫁接物的开放性。在我们的认识中, 经由一种生物可降解性动脉静脉嫁接物覆盖物 / 包封物进行细胞支撑的受控传递先前从未有过报道并且因此所述的外膜覆盖物的这种可能的未来应用将是新的。在这篇报道中所使用的所述的聚合物已经被定义, 并且成功的进行了各种平滑肌细胞的微整合, 使其本身可以被用于这种可

能的未来的应用中。

[0253] 实施例 4- 体内的动脉静脉嫁接

[0254] 进行了八个 ($n = 8$) 作为“观点的证据”的颈动脉插入性静脉嫁接试验。我们希望对所述的静电纺聚酯型聚氨酯膜外膜覆盖物对静脉片段的急性以及慢性增生性应答的减轻作用进行评价,其中所述的静脉片段作为颈动脉插入性嫁接物被植入一种临床前期的模型中。为此,我们利用猪进行了一套单侧自身同源性颈动脉插入性嫁接方案。将猪划分为两个组:“spun”动脉静脉嫁接物组以及“sham 对照”动脉静脉嫁接物组。每个动物都充当自己的静脉嫁接物供体。简要的说,按照实施例 2 中描述的方法对猪颈内静脉片段进行收集,并且使用在上述实施例中描述的静电纺方法按照与该实施例中描述的相同的覆盖物组分以及厚度进行纺制,或者被指定作为 sham 对照组。对于不带有所述的静电纺聚合物覆盖物的 sham 猪颈内静脉片段,我们再一次模仿了所述的静电纺过程,直至到达了实际上放置所述聚合物覆盖物的程度(即,包括插入所述的芯棒并且在电场中进行所述静脉的旋转/平移)。随后,将所述的动脉静脉嫁接物作为颈动脉插入性嫁接物被植入(如下文中所述)30 天(或者直至观察到不可逆的并发症),这一植入的持续时间足够在所述的 sham 对照组中使内膜增生表现的非常明显(参见 Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Morgan R, 以及 Newby AC 于 1990 年在 J Thorac Cardiovasc Surg. 《胸血管以及心脏血管外科手术杂志》99(3):433-9 中发表的文章 Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts 《猪动脉静脉旁路嫁接物中膨胀对于血小板以及白细胞的粘附的促进以及对于短期开放性的降低》; Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, 以及 Jeremy JY 于 2004 年在 J Vasc Surg. 《血管外科学杂志》40(5):1011-9 中发表的文章 Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath 《利用聚多糖生物可降解性外部包封物对猪隐静脉嫁接物中的中层以及内膜增厚作用进行的长期降低》; 以及 Jeremy JY, Dashwood MR, Timm M, Izzat MB, Mehta D, Bryan AJ, 以及 Angelini GD 于 1997 年在 Ann Thorac Surg 《胸外科学年鉴》63(2):470-6 中发表的文章 Nitric oxide synthase and adenylyl and guanylyl cyclase activity in porcine interposition vein grafts 《猪插入性静脉嫁接物中的一氧化氮合成酶、腺苷酸环化酶以及鸟苷酸环化酶》),从而将其与所述的 spun 组进行比较。除了通过血管造影术对开放性进行评价之外,还要对被植出的所述动脉静脉嫁接物进行处理,用以进行内膜增生的组织学评价。请注意,上述的体内研究的量化端点在实质上而言是严格的组织学端点。

[0255] 方法

[0256] 单侧猪颈动脉插入性嫁接

[0257] 为了便于操作,在进行所述试验的前 7-10 天取来所使用的动物,并且在进行外科手术之前先将其放在 NPO 中保持 12 小时。在进行外科手术之前,使用 0.15 毫克/千克的乙酰普马嗪进行肌肉内注射,以及 15.0 毫克/千克的克他命进行联合肌肉内注射,插管并且利用异氟烷(以 1-3% 的量溶解于氧气中)将其保持在外科水平的麻醉状态中。一旦对每个动物进行剪取并且为所述的操作进行准备,则将其移到外科手术室并且将其放置于正压通风系统之中并利用监测仪器(心电图 ECG)进行监控。在整个的外科手术过程中对

脉搏血氧饱和度以及血压进行监测。在出现麻醉反应之后,进行无菌的外科手术。

[0258] 进行单侧的颈部切割,从而暴露于所述的颈总动脉。之后对所述的动物进行肝素化处理(300UI/千克),并且使用一种防止损伤的血管钳在最近端以及最远端钳住所述的动脉。切离被钳住的所述片段(大约6厘米)。每个猪都充当自己的嫁接物供体。如上所述,完成猪的新鲜的单侧颈内静脉的收集工作。之后将收集到的颈内静脉进行纺制(按照上述的方法以及根据 Stankus 等人报道的方法【47】)或者将其指定为所述的 sham 对照组。随后,使用不连续的 7-0 聚丙烯纺织纤维缝合线将所述的静脉片段作为单侧颈动脉插入性嫁接物被植入(端对端)。

[0259] 在手术之后,动物进行恢复并且被安置于加护病房内。在所述的外科手术操作以及吸入式麻醉停止之后,当所述的动物表现出吞咽反射时对其进行拔管处理,而所述的保护性的咳嗽反射可以发挥功能。对所述的动物连续监测 24 小时,并且在每个小时对下述参数进行记录:脉搏速率,脉搏强度,血液回充时间,呼吸速率,排尿量,以及通便情况。每两小时测量一次体温并且进行记录。使上述动物保持温暖并且对其进行干燥,以防止体温降低。以固定的时间间隔施用 4 天的盐酸丁丙诺啡(0.005-0.01 毫克/千克,肌肉内,q12h)用于止痛,并且如果仍然表现出疼痛的迹象则持续施用来控制疼痛。动物的急性疼痛表现为下述情形:在一段异常长度的时间内的防卫,发声,肢体残损,烦躁不安,躺着不动,消极(不喜欢运动或者难以站立),或者有异常的外表(低头,腹部突出,耸肩)。在手术后的 10 天除去皮肤缝合钉/缝合线。请受过训练的兽医、注册兽医技术员、以及动物护理人员每天对所有的动物进行监测。

[0260] 使用一种抗凝结方案来对抗经由血栓症引起的动脉静脉嫁接物的急性失效。在手术的前 3 天开始施用口服剂量的阿司匹林(325 毫克/天)以及波利维(Plavix)(75 毫克/天)。在手术之后的整整 30 天的时间内每天施用所述的阿司匹林,而仅在手术之后的 14 天里每天施用所述的波利维。

[0261] 在经过 30 天的存活时间后(或者直至观察到不可逆的并发症),对所述的动物实施安乐死。利用 0.15 毫克/千克的乙酰普马嗪进行肌肉内注射,以及 30.0 毫克/千克的克他命进行联合肌肉内注射,从而对所述的猪进行深度麻醉,之后通过静脉内注射过量的氯化钾诱发心搏停止,对所述的动物实施安乐死。对生命迹象进行监测,从而达到目的。

[0262] 荧光血管造影术

[0263] 在实施安乐死之后并且在即将进行嫁接物的植出之前,进行荧光血管造影术来评价嫁接物的开放性。钳住位于最接近的嫁接物结合处上游大约 3 厘米的颈动脉,并且在所述的钳子的远端处立即将核子造影剂灌注到所述的颈动脉内。对血管造影照片进行记录(Model OEC 9800 Plus,General Electric Inc.),用来验证在所述完整的嫁接物片段中的流动。如果在嫁接物中不能建立其所述的流动(即,由于闭塞的原因),则不能进行血管造影术。

[0264] 植出后的组织处理

[0265] 分离出所述的嫁接物并且将二分之一的组织立即固定于 4%的多聚甲醛中,并且按照下文中所述的方法进行组织学分析。将另外二分之一的组织固定于超纯的 2.5%的戊二醛中并且按照上述部分内容中所述的方法进行扫描电子显微镜分析。

[0266] 内膜增生的组织学测量

[0267] 在所述被植出的嫁接物的中间区域的部分上进行形态学分析。使用标准的 Movat's 五色染色技术,对内膜以及中层的厚度进行测定。通过这些测量值计算出所述的内膜与中层的厚度比。对于每个动脉静脉嫁接物片段而言,对四个视场进行测量并且取平均值,从而得到一个单一的值。

[0268] 扫描电子显微镜方法

[0269] 我们使用与上文中所描述的方法相同的方法,对来自于所述的体内试验的被植出的动脉静脉嫁接物进行处理以及成像。

[0270] 统计学分析

[0271] 对所述的内膜与中层的厚度比的数据进行未成对的学生 t- 检验。P < 0.05 被认为具有统计学显著性。除非另外指明,所表示的数据代表的是平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。

[0272] 结果

[0273] 上述的外膜聚合物覆盖物在维持处于动脉压力下的动脉静脉嫁接物的直径方面具有快速的显著的作用,将其直径保持在与所述的天然静脉相一致的状态(对比附图 27 的中间以及右侧的图)。除此之外,所述的被覆盖的动脉静脉嫁接物表现出与所述的天然颈动脉相类似的脉冲式径向偏移(即,顺应性),而所述的未被覆盖的动脉静脉嫁接物看上去是一种刚性的管,没有检测到脉动。即,在所述的对照嫁接物中建立了流动之后,我们观察到,与所述的天然颈动脉以及 spun 静脉不同,所述的 sham 对照静脉不产生直径上的变化来应答所述的脉冲压力。

[0274] 在所进行的 8 个体内试验中,仅有 1 个试验是完全成功的。即,来自于所述的 spun 猪以及 sham 猪的动脉静脉嫁接物在 30 天之后均呈现出 100% 的开放性。可以在附图 28 中看到这些动脉静脉嫁接物的血管造影图像。由于下述三个原因之一,其余的试验被认为是不成功的:1) 由于内膜增生或者血栓症的原因,所述的 spun 动脉静脉嫁接物以及 sham 动脉静脉嫁接物中的一个或者两个发生了局部的闭塞;2) 术后并发症导致了所述的 spun 组中的一个动物的死亡;以及 3) 由于感染,导致在手术后的一周之后需要对所述的 spun 组中的一个动物实施安乐死。然而,利用所述的两个开放性的动脉静脉嫁接物以及所述的仅仅发生局部闭塞的动脉静脉嫁接物(sham, N = 6; spun, N = 4),我们进行了形态学测量,用以评价内膜增生的形成,从而对所述的两组进行比较。用于进行所述的形态学分析的代表性的 Movat's 五色染色图像在附图 29 中示出,所述的附图也表示出了样本的测量值。可以在附图 30 中看到所述的量化结果。在所述的 spun 组与 sham 对照组之间的内膜与中层的厚度比上似乎仅仅存在一种具有统计学显著意义上的差异的趋势。

[0275] 对来自于一个完全成功的试验中的动脉静脉嫁接物进行扫描电子显微镜成像(附图 31A 以及 31B),同时对来自于另外一个试验中的没有发生完全闭塞的动脉静脉嫁接物进行扫描电子显微镜成像(附图 31C 以及 31D)。可以在每个图像中看到所述的静脉嫁接物与动脉之间的吻合分界面,所述的吻合分界面因为缝合线的存在而变得明显。

[0276] 讨论

[0277] 尽管我们在所述的 spun 组与 sham 组的内膜与中层的厚度比上仅仅观察到了一种具有统计学显著意义上的差异的趋势,但如果所进行的试验的数量增加,这种差异可能会变得具有统计学显著意义。所述的量化的形态学结果以及定性的扫描电子显微镜图像结果

表明,所述的静电纺生物可降解性聚合物覆盖物的确向动脉静脉嫁接物提供了一种有利的作用。然而,进行进一步的调查是必要的,从而确定这些作用事实上是否是一贯有效的。除了机械组织生物化学数据本身所固有的可变性之外,完成上述外科手术的具有不同的经验的三个不同的外科医生也给我们的结果带来了可变性。使用两层的动脉静脉嫁接物(spun组)代替通常的单层的动脉静脉嫁接物(sham组)进行吻合术,会产生一条相关的“学习曲线(learning curve)”,这也是事实。正如任何新的外科手术操作一样,只要完成所述外科手术的外科医生的便捷程度提高,那么所述的外科手术的成功率也会因此升高。

[0278] 如上所述,那些尝试使用一种外部包封物来降低动脉静脉嫁接物的内膜增生的先前的研究聚焦于在各种动物模型中向动脉静脉嫁接物传递机械支撑(正如本文章中所描述的)以及生物化学支撑。由于两方面主要的局限性,使得这些先前的方法的临床转化没有成功。具体的,他们全部使用了宽松装配的/生物可降解性包封物或者宽松装配的/生物持久性的包封物。在本项研究中,我们期望通过研究一种安全“覆盖”动脉静脉嫁接物的方式来摆脱这些局限性,其中所述的安全“覆盖”使用的是一种紧密装配的生物可降解性聚合物。

[0279] 在这里所述的研究中存在局限性。所述的 sham 对照组不能与所述的 spun 动脉静脉嫁接物进行匹配(即,来自于同一个猪)这一事实给我们的研究提供了较弱的统计学支持。然而,为了避免所述的动物发生手术后的并发症,我们所使用的未成对的试验设计似乎是必要的。我们认识到进行单侧的外科手术来代替双侧外科手术是更加安全的,这样一来从脑部流回的静脉血不会发生过分的变化。另外一个局限性来自于完成所述操作的外科医生的经验的不同。如果所述动脉静脉嫁接物的开放速率增加,所得到的结果可能更加具有统计学显著意义。如果所述的操作全部由最有经验的外科医生来完成,则与 sham 对照组相比,所述的静电纺生物可降解性聚合物覆盖物可能显著的降低动脉静脉嫁接物的内膜增生。第三个局限性是所述的 30 天的植入持续过程太短。需要进行更长期的试验,可能长达 6 个月,用以确定我们用来降低动脉静脉嫁接物的内膜增生的方法的作用是否能够长时间的持续。

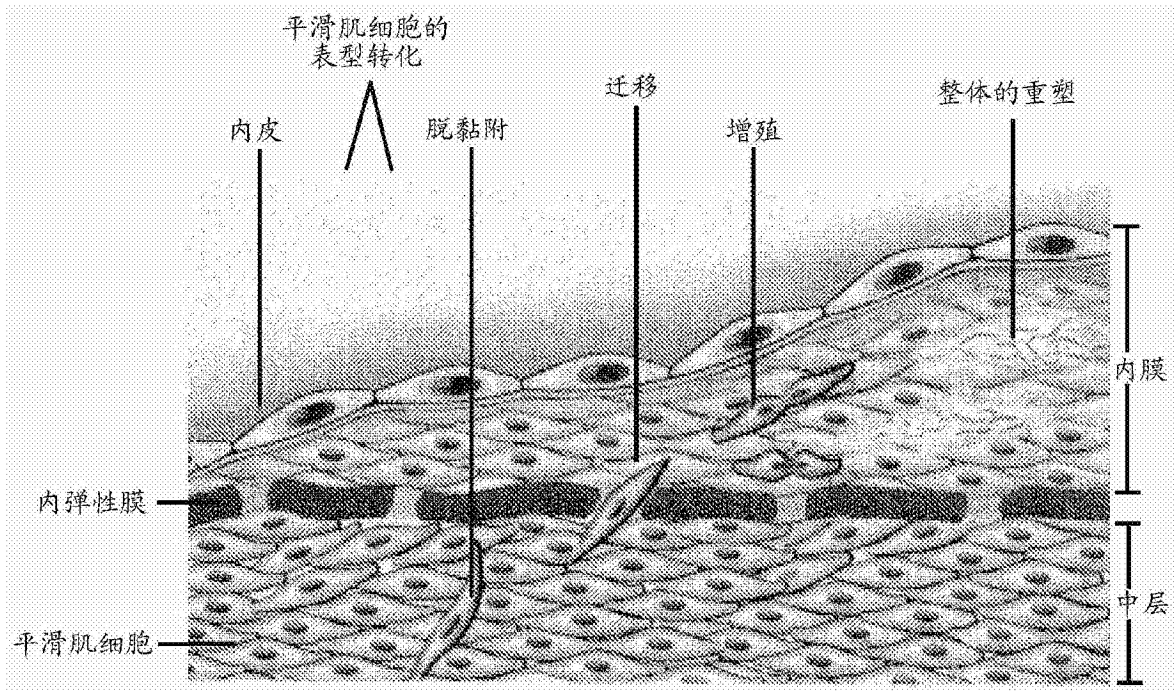


图 1

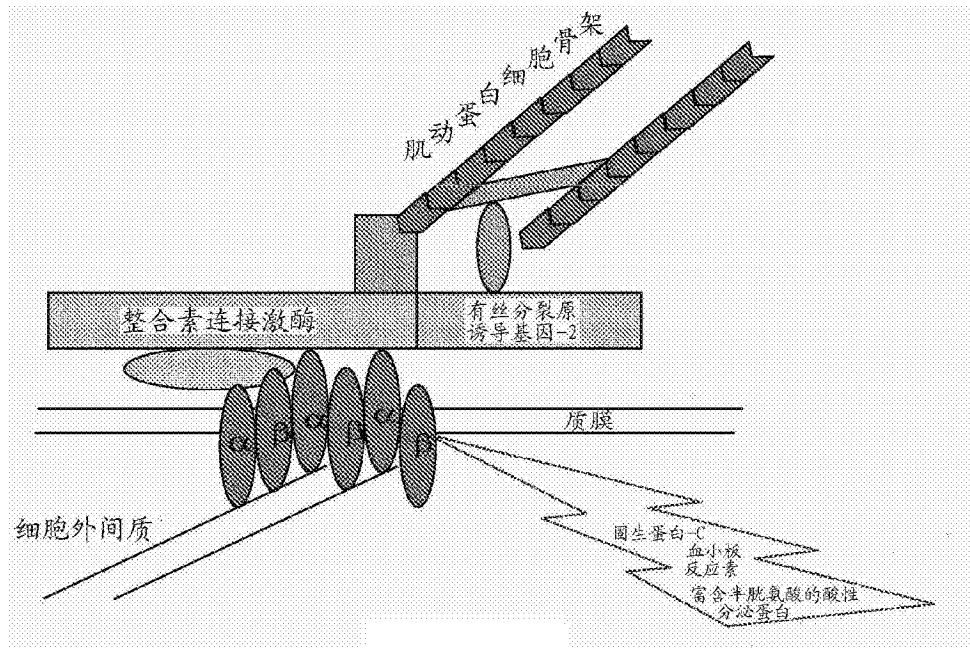


图 2

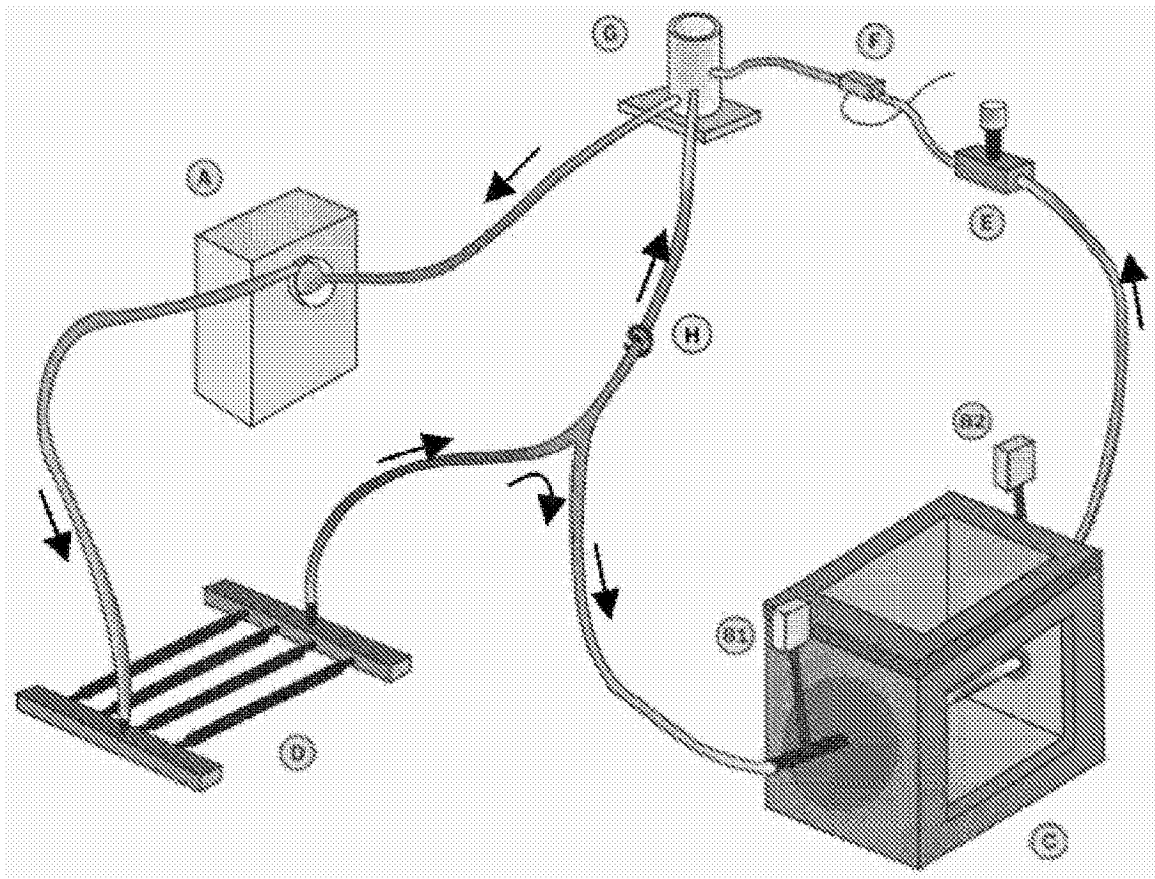


图 3

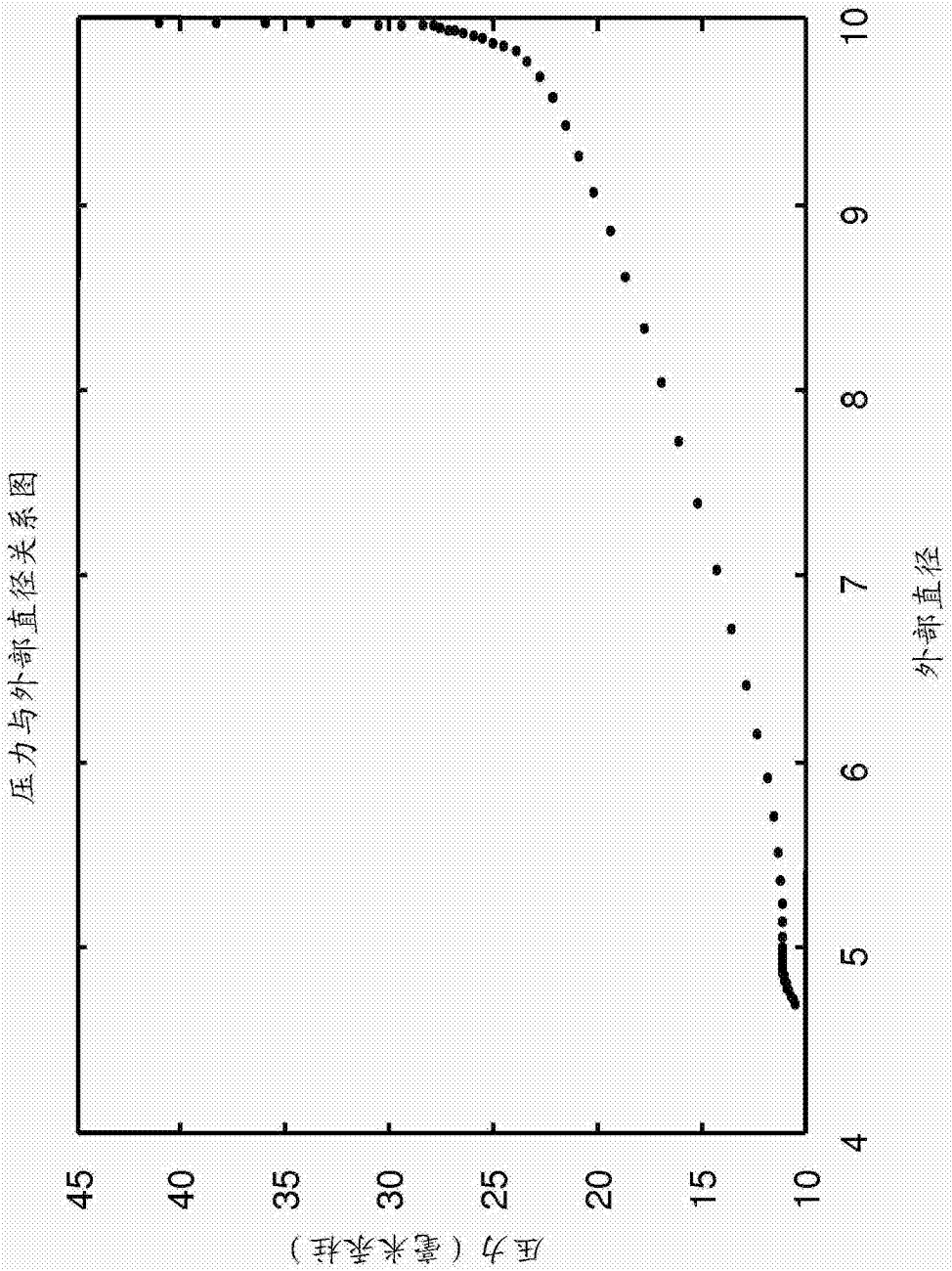


图 4

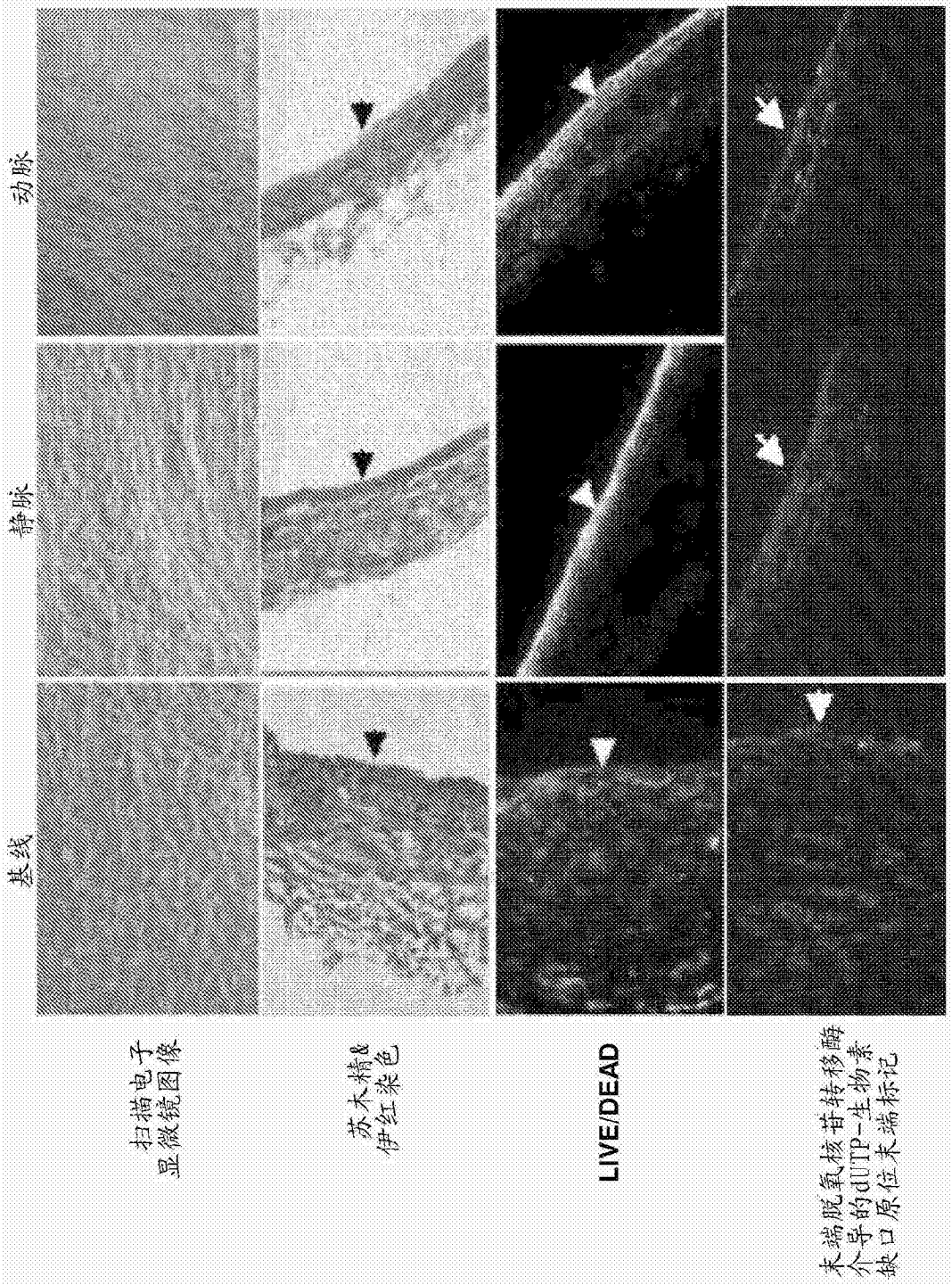


图 5

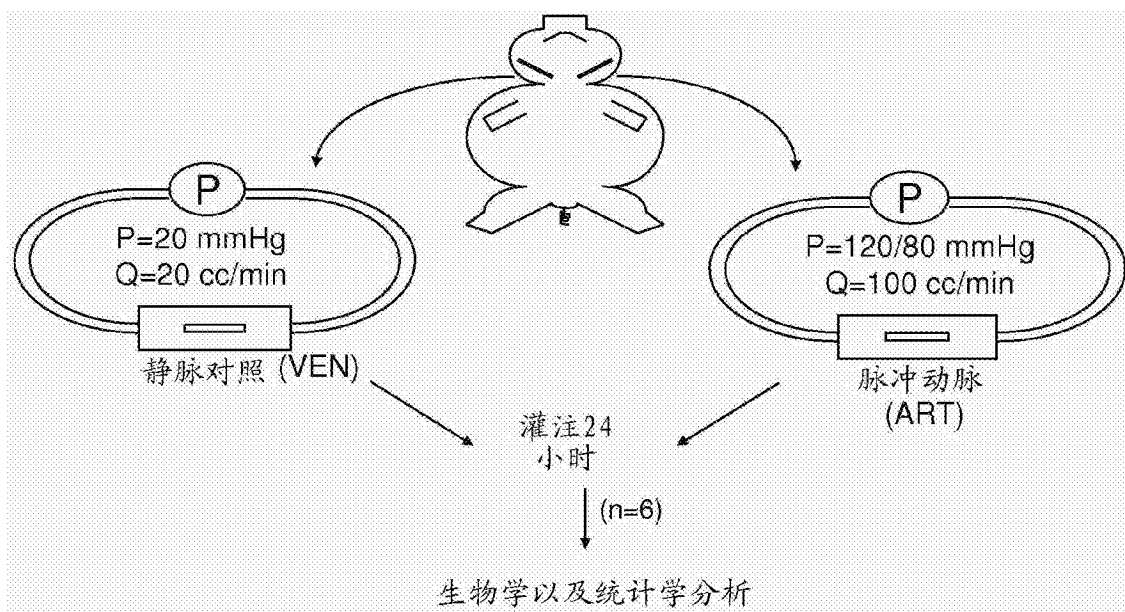


图 6

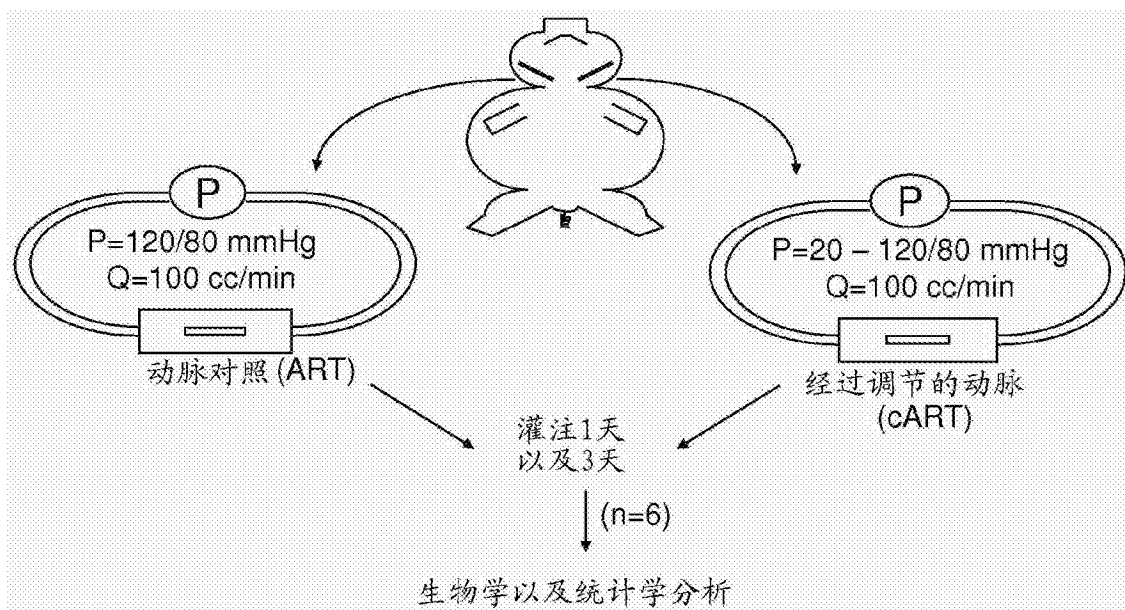


图 7

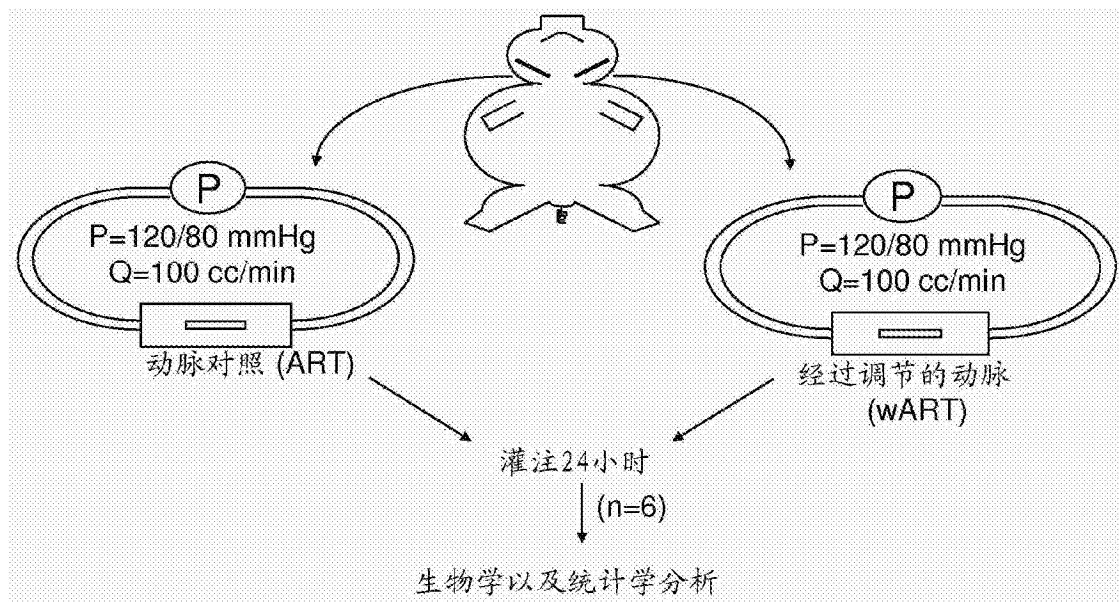


图 8

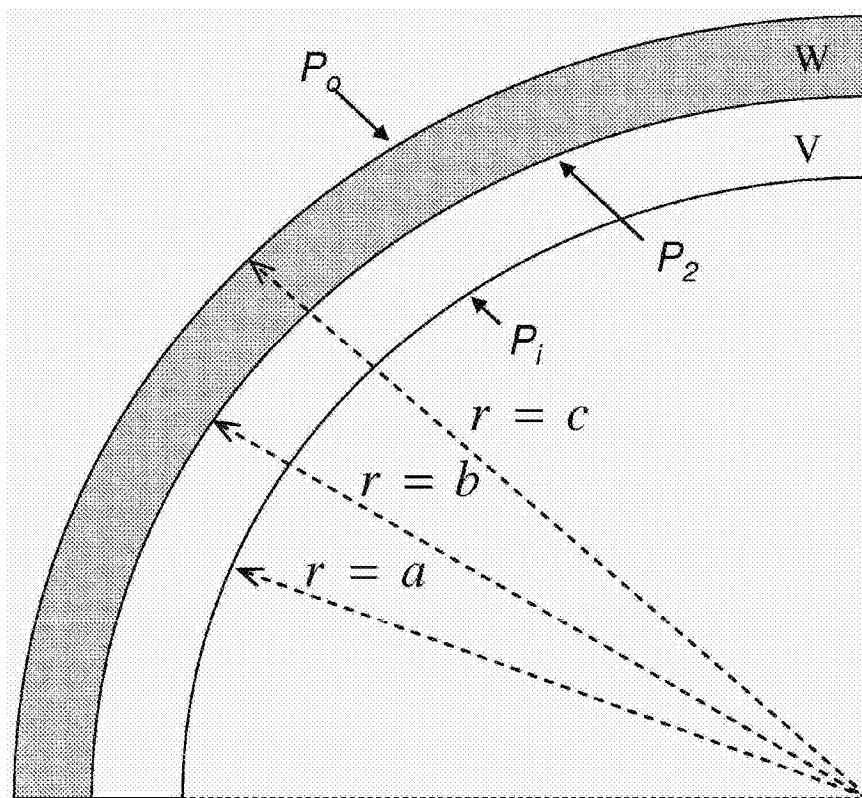


图 9

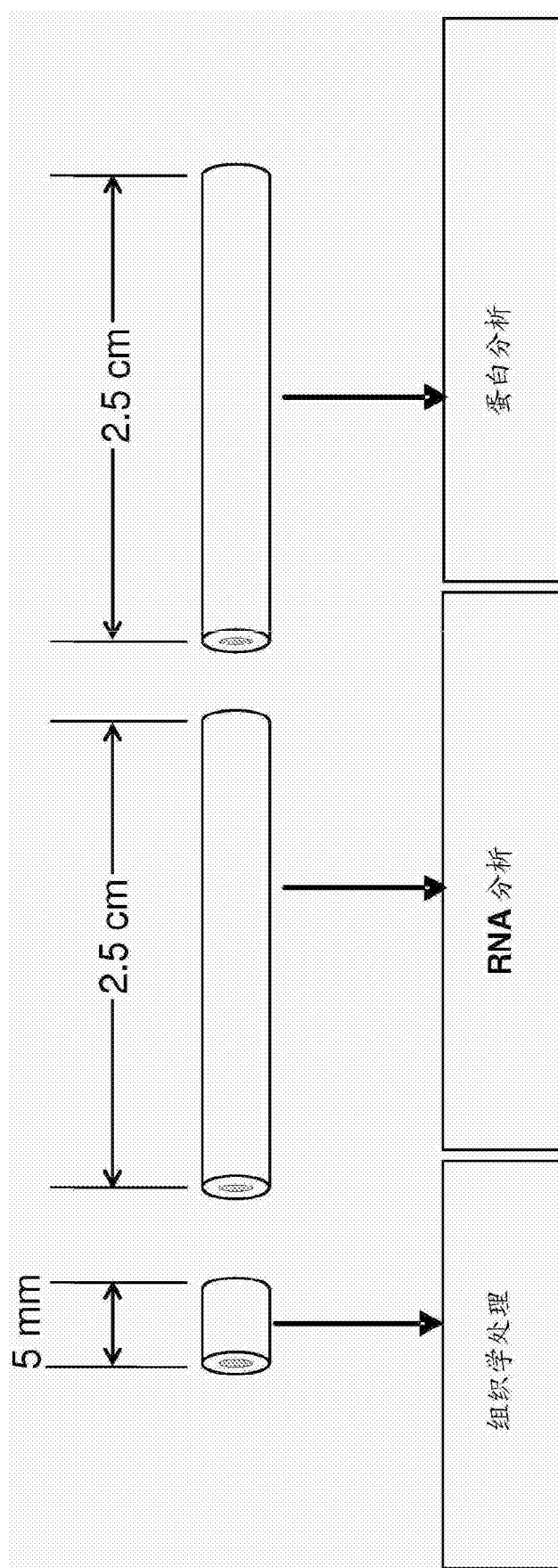


图 10

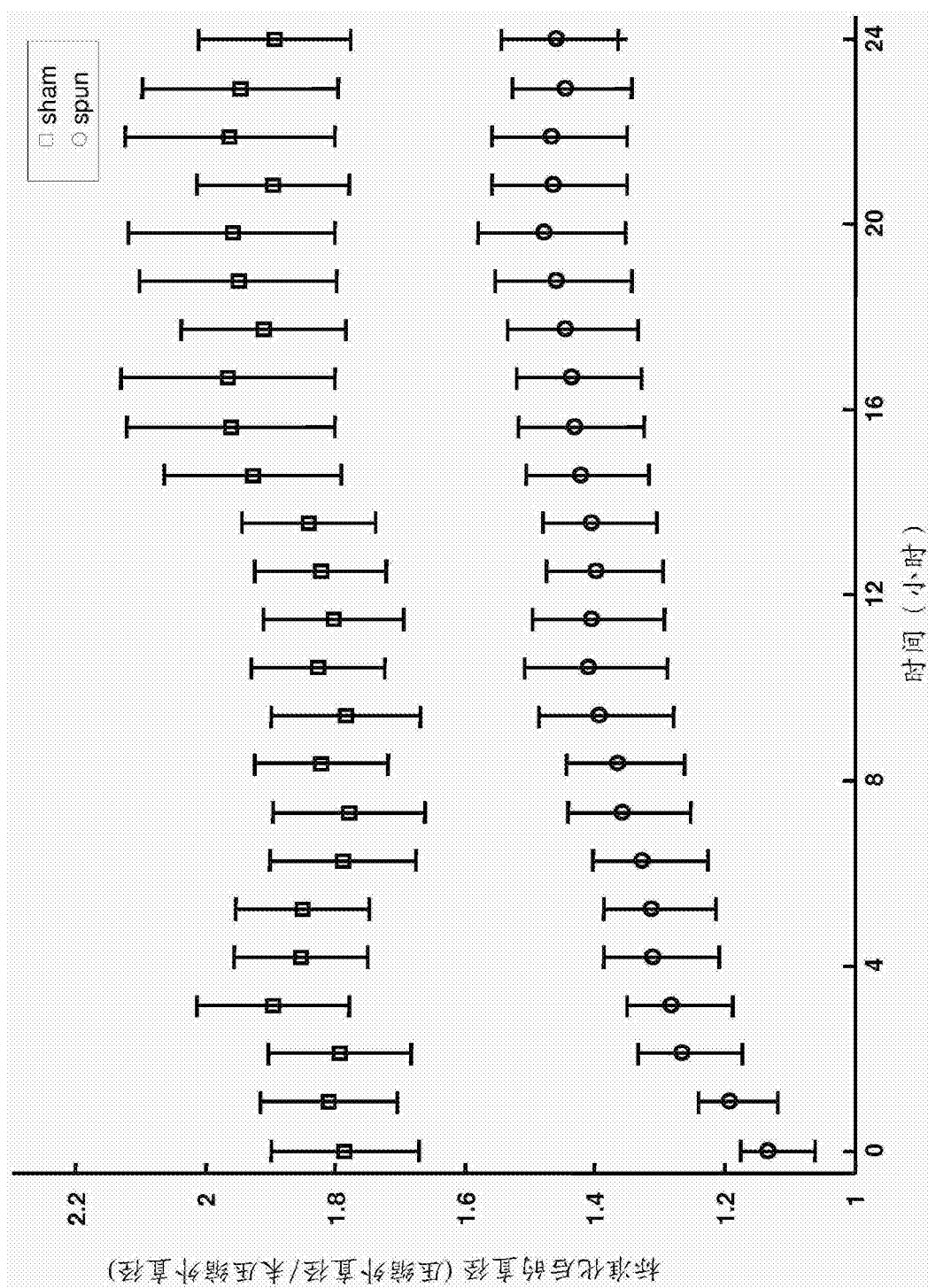


图 11

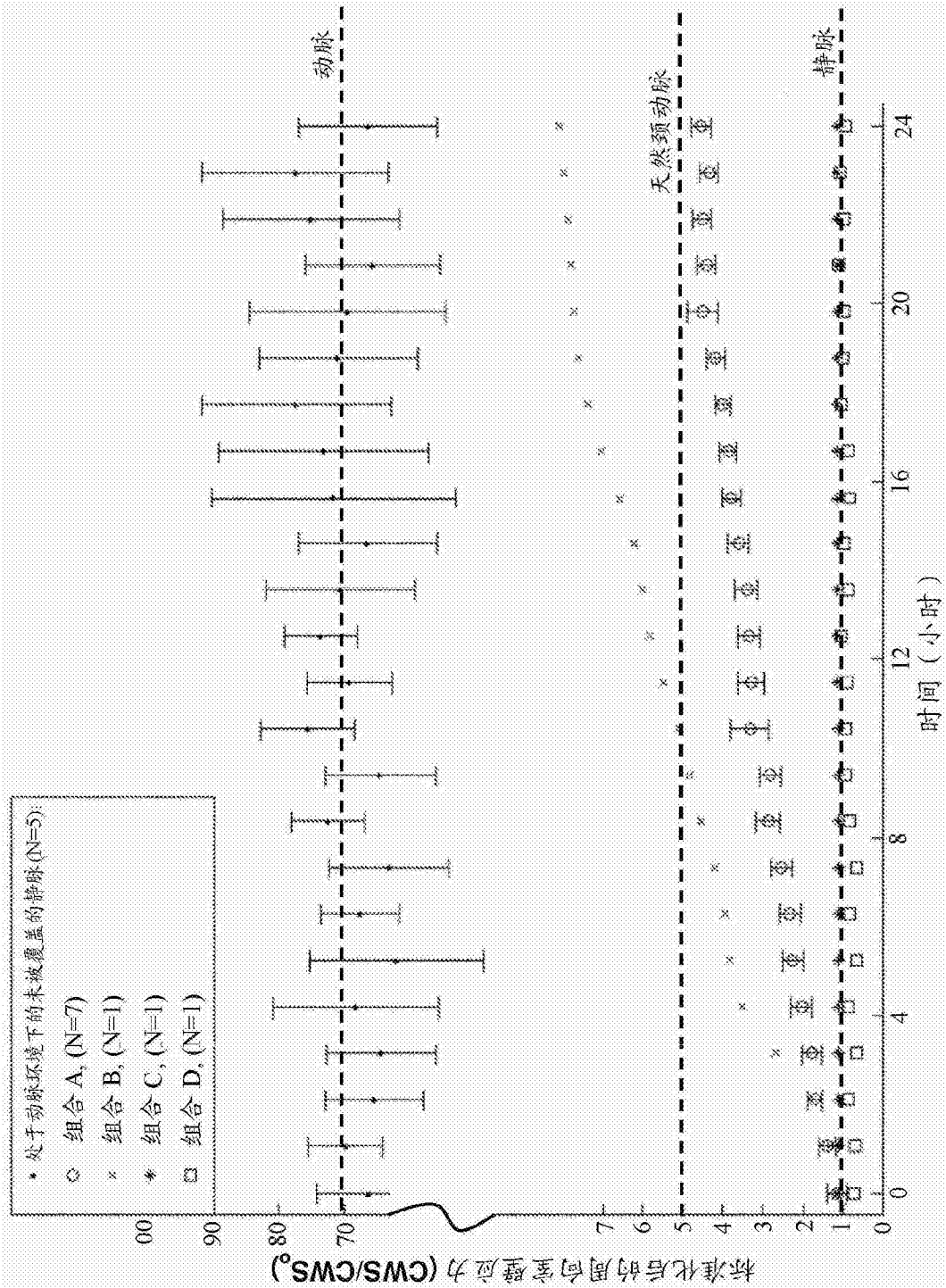


图 12

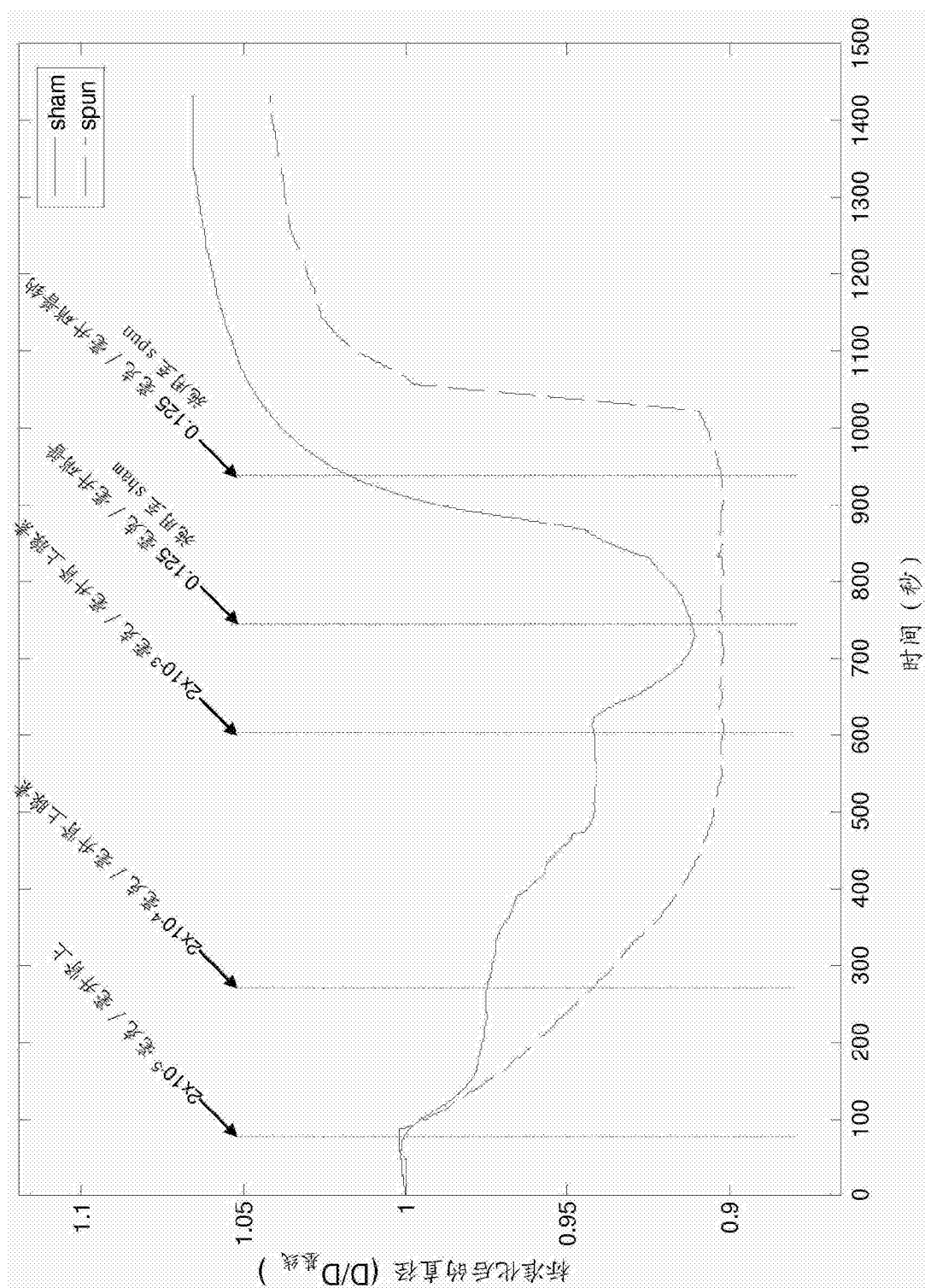


图 13

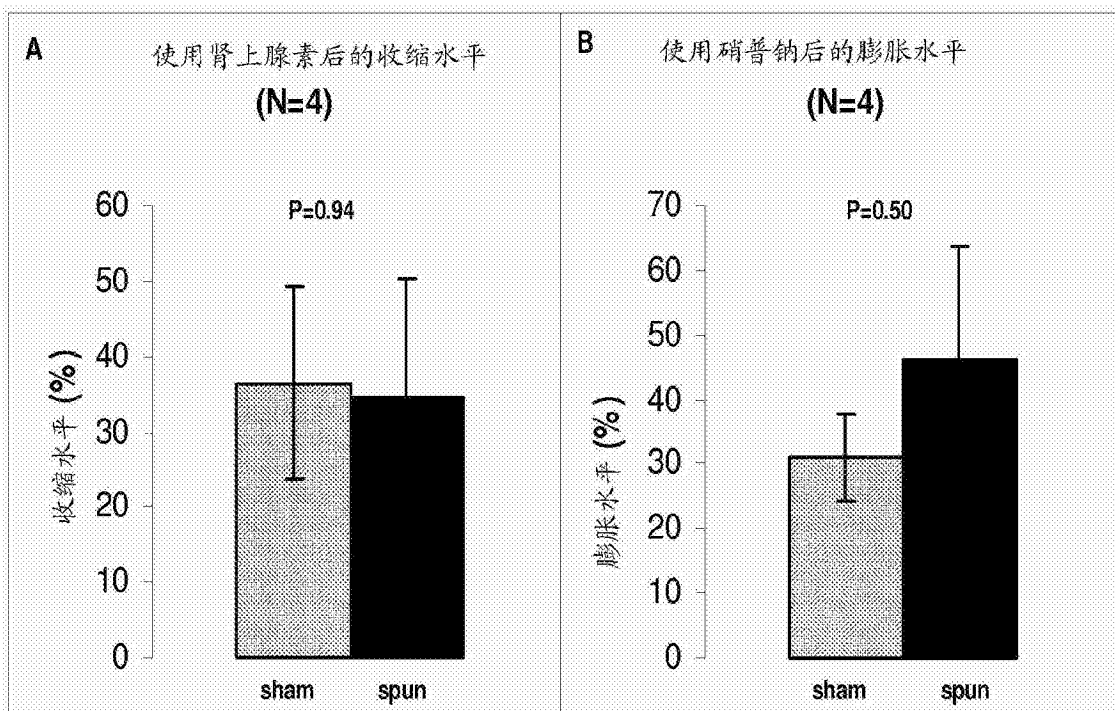


图 14

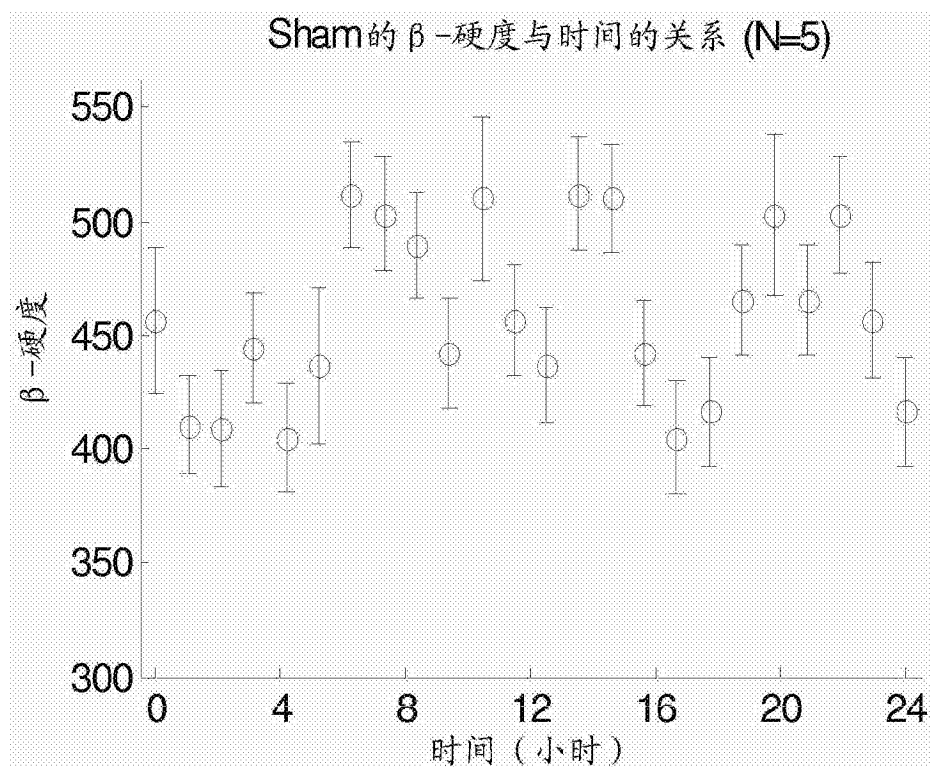


图 15A

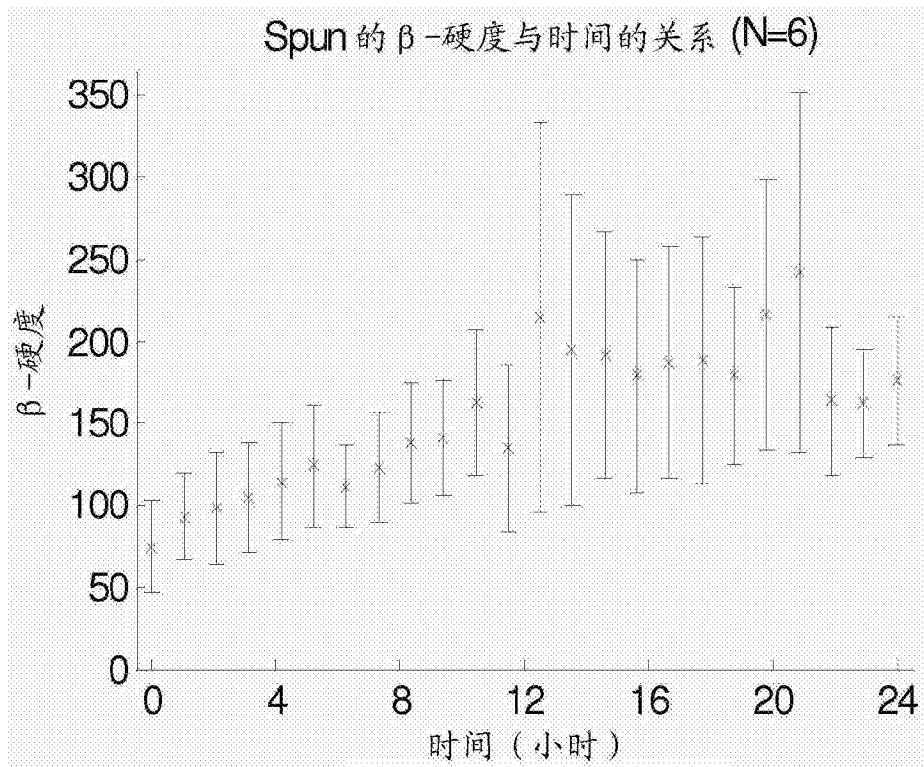


图 15B

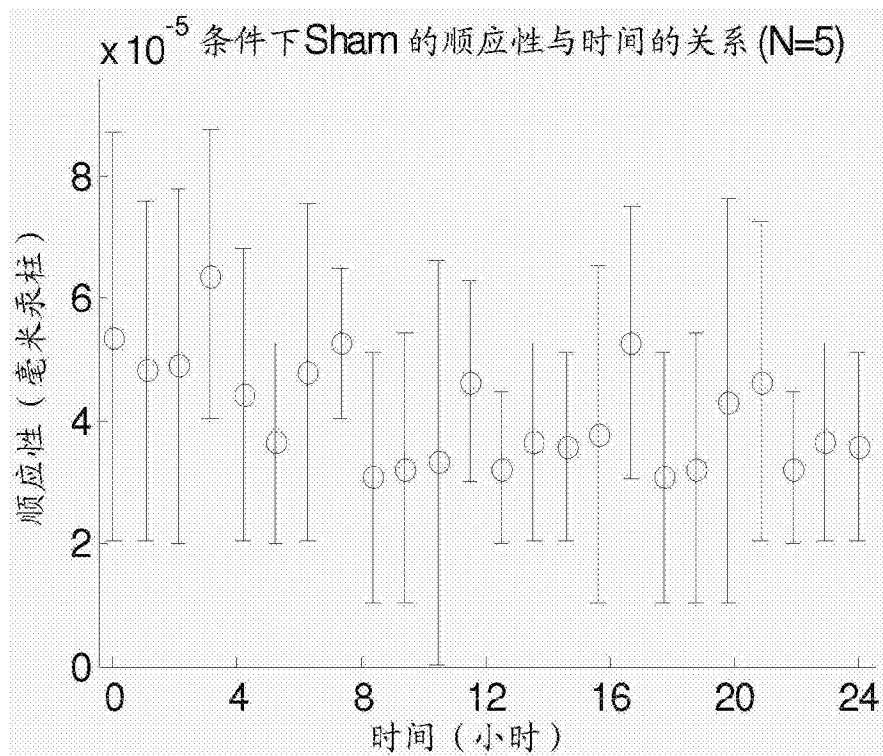


图 15C

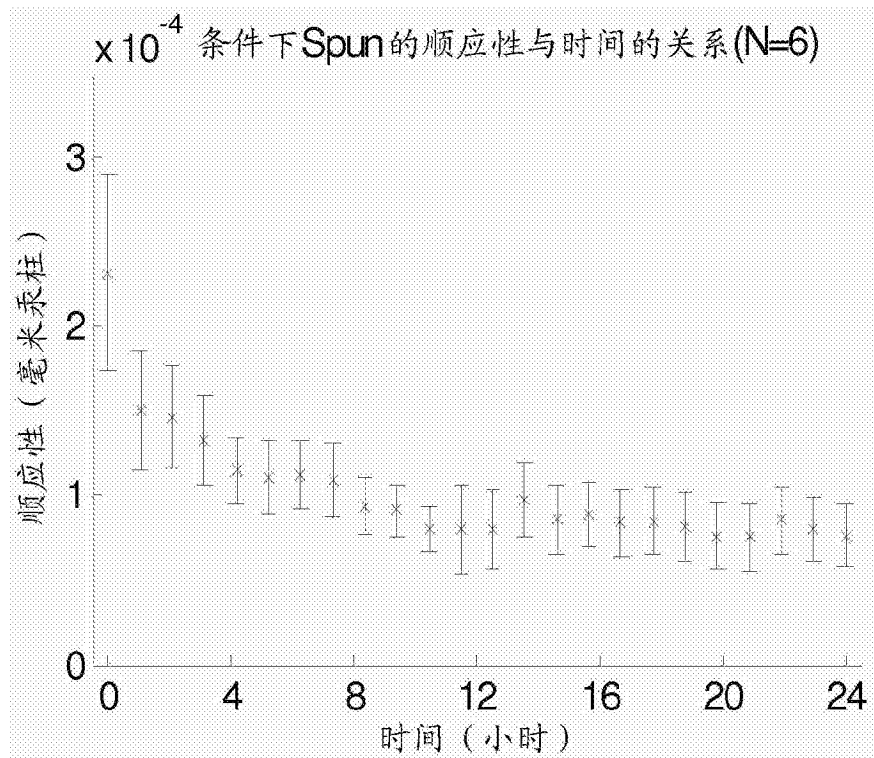


图 15D

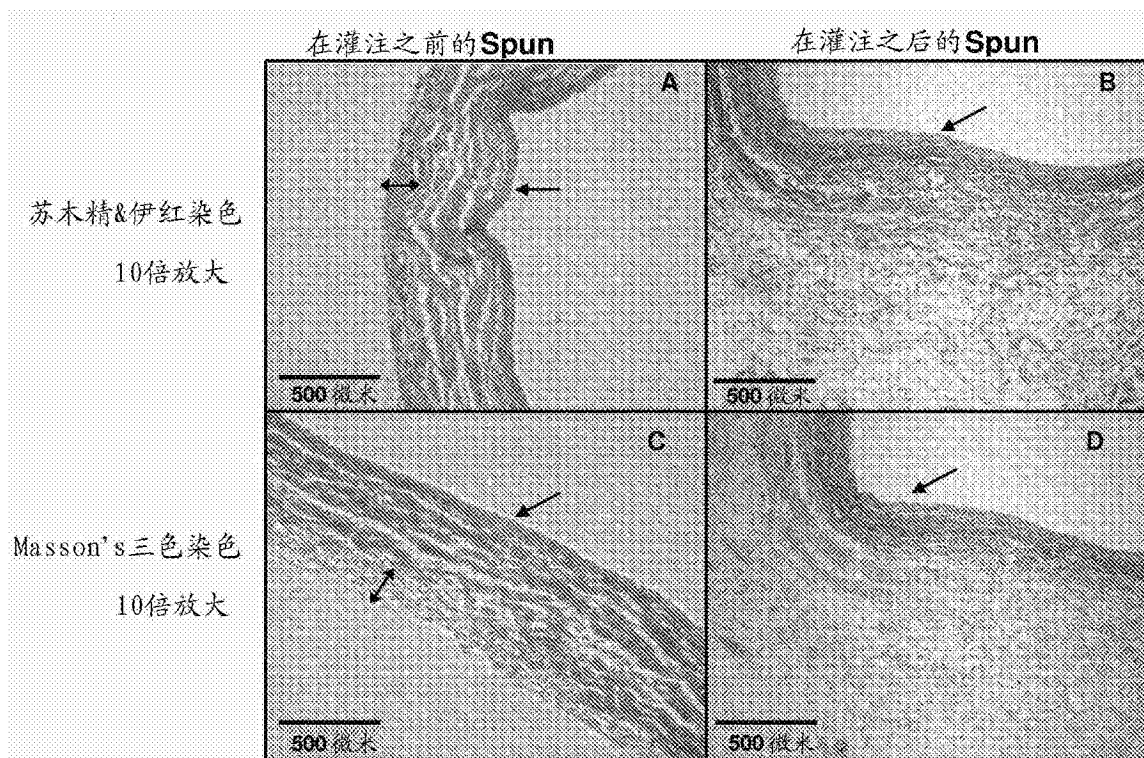


图 16

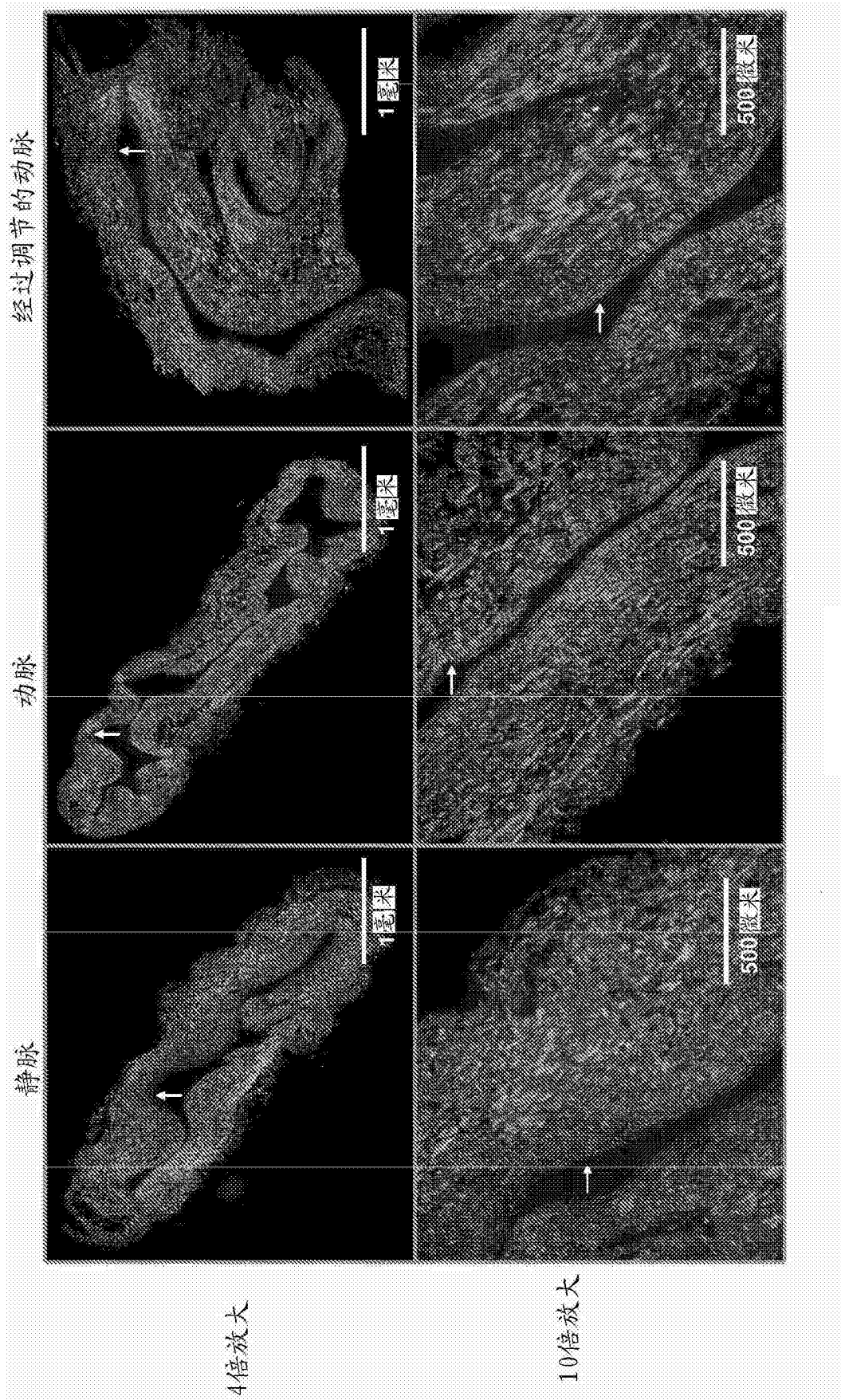


图 17

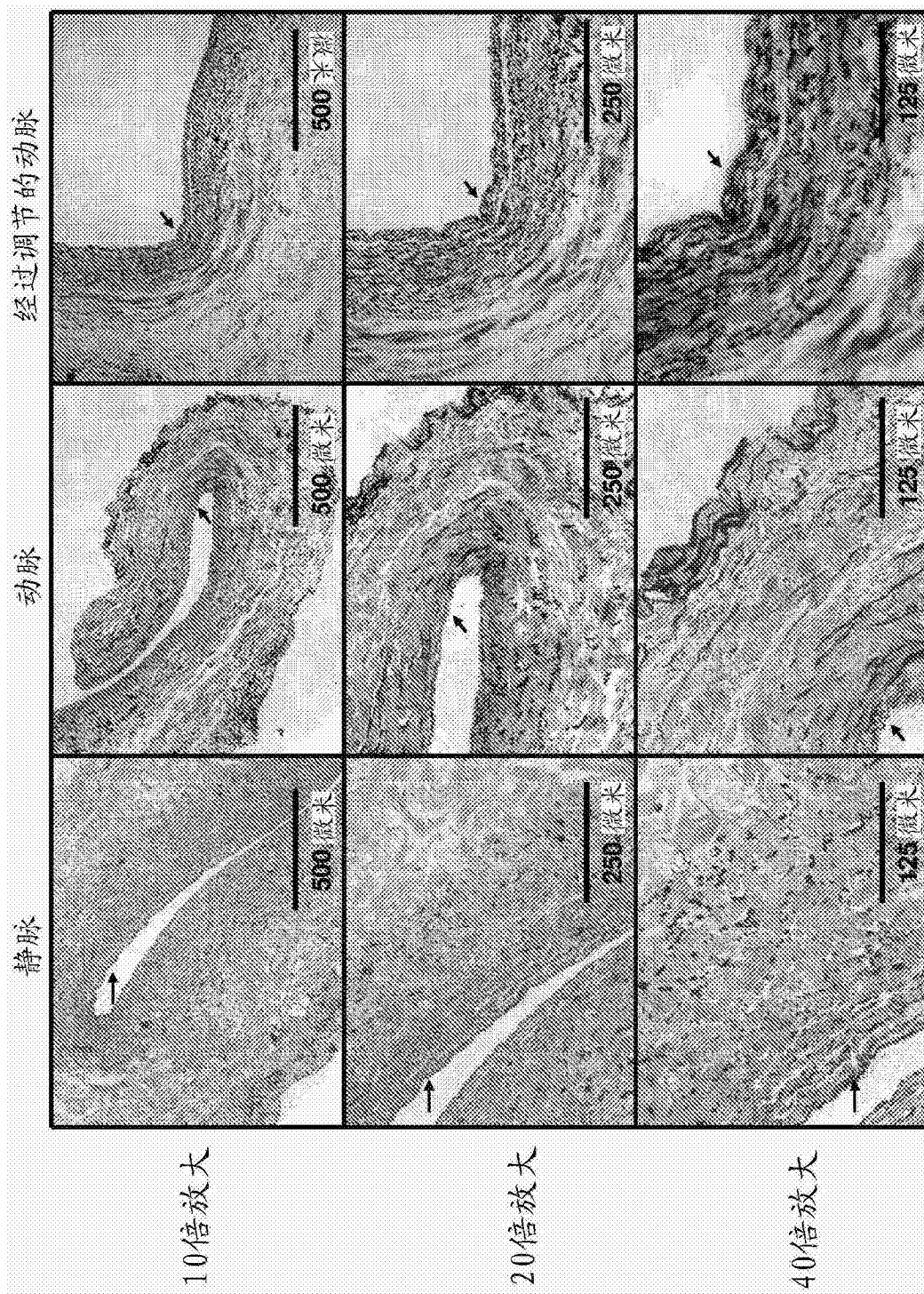


图 18

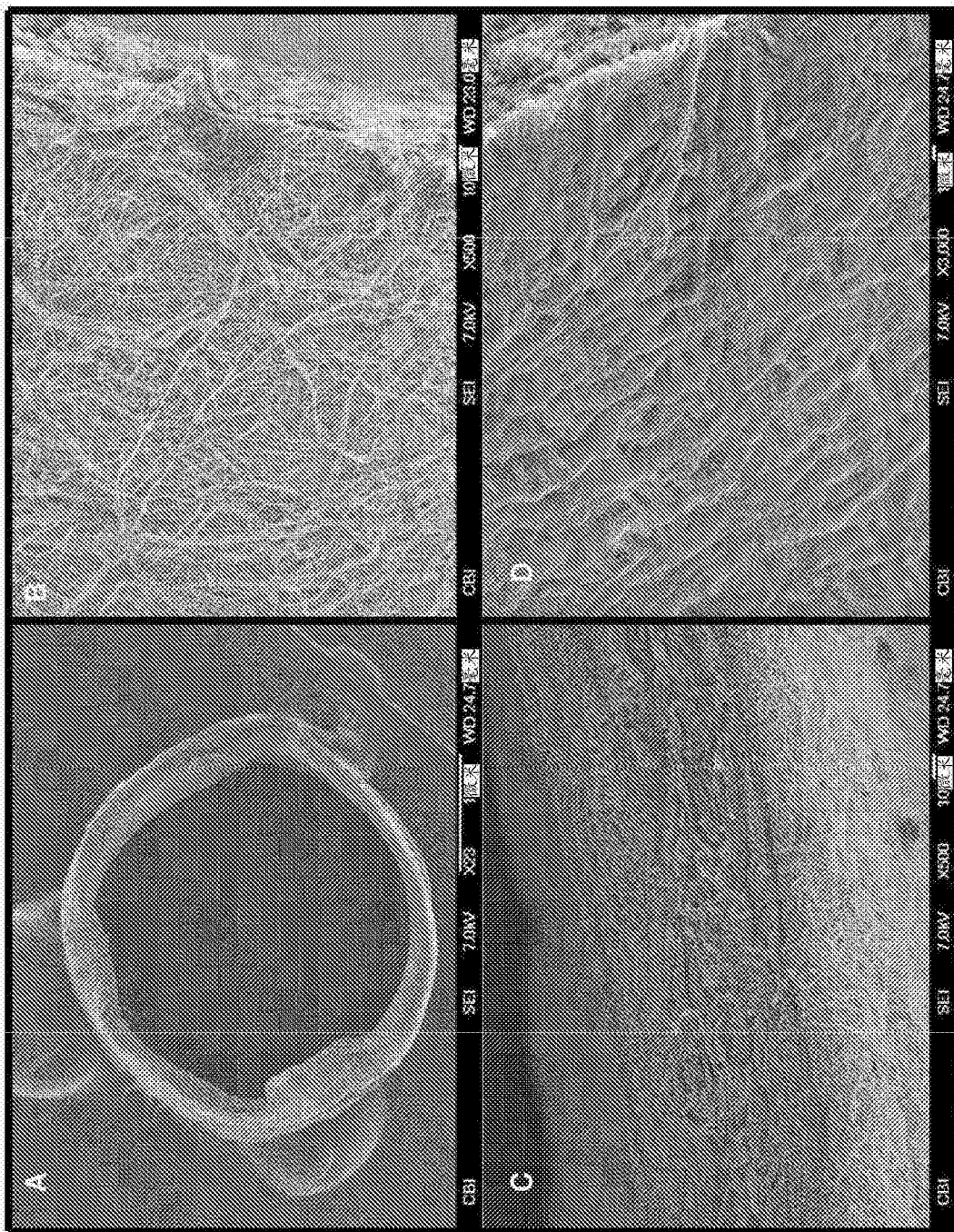


图 19

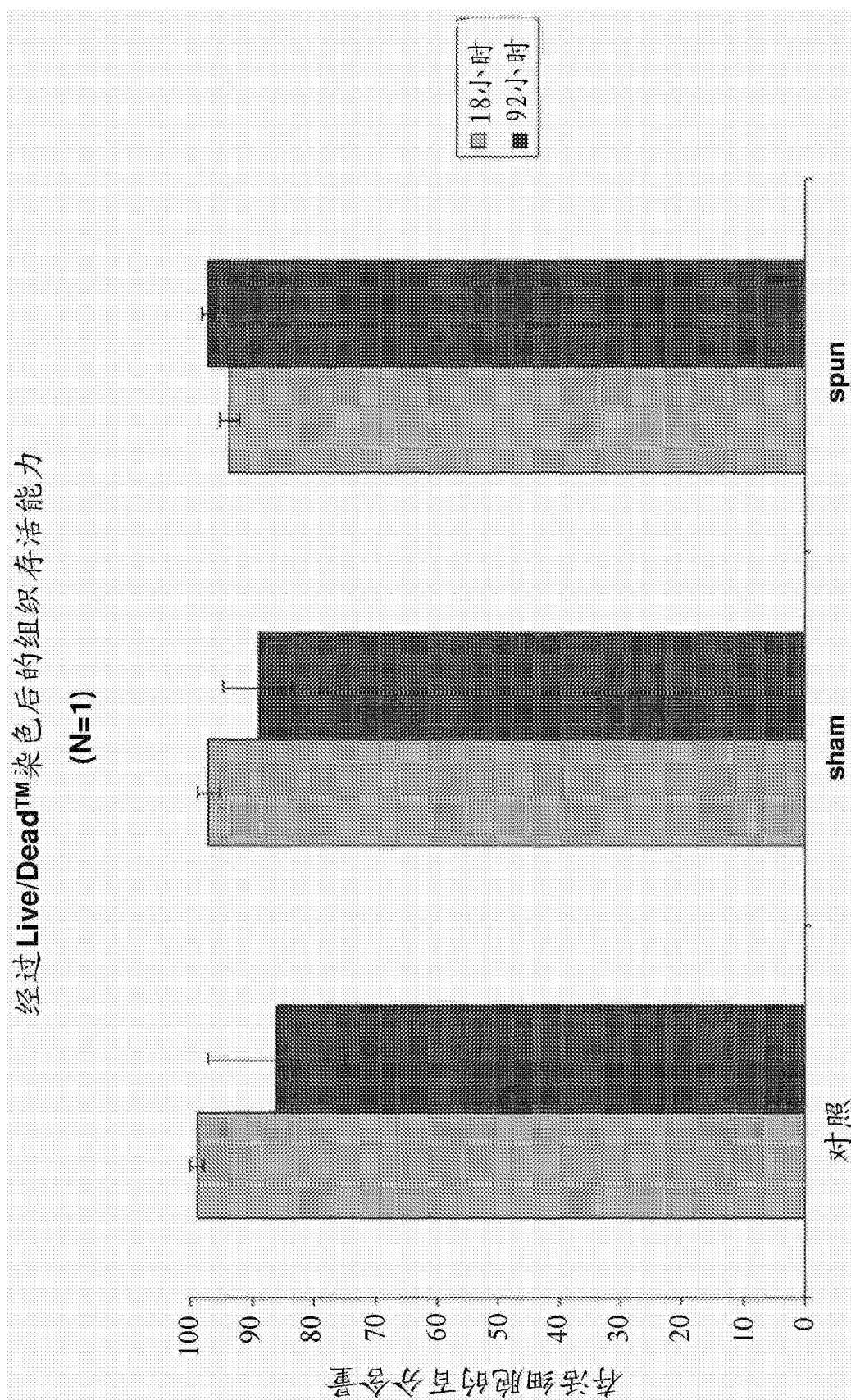


图 20

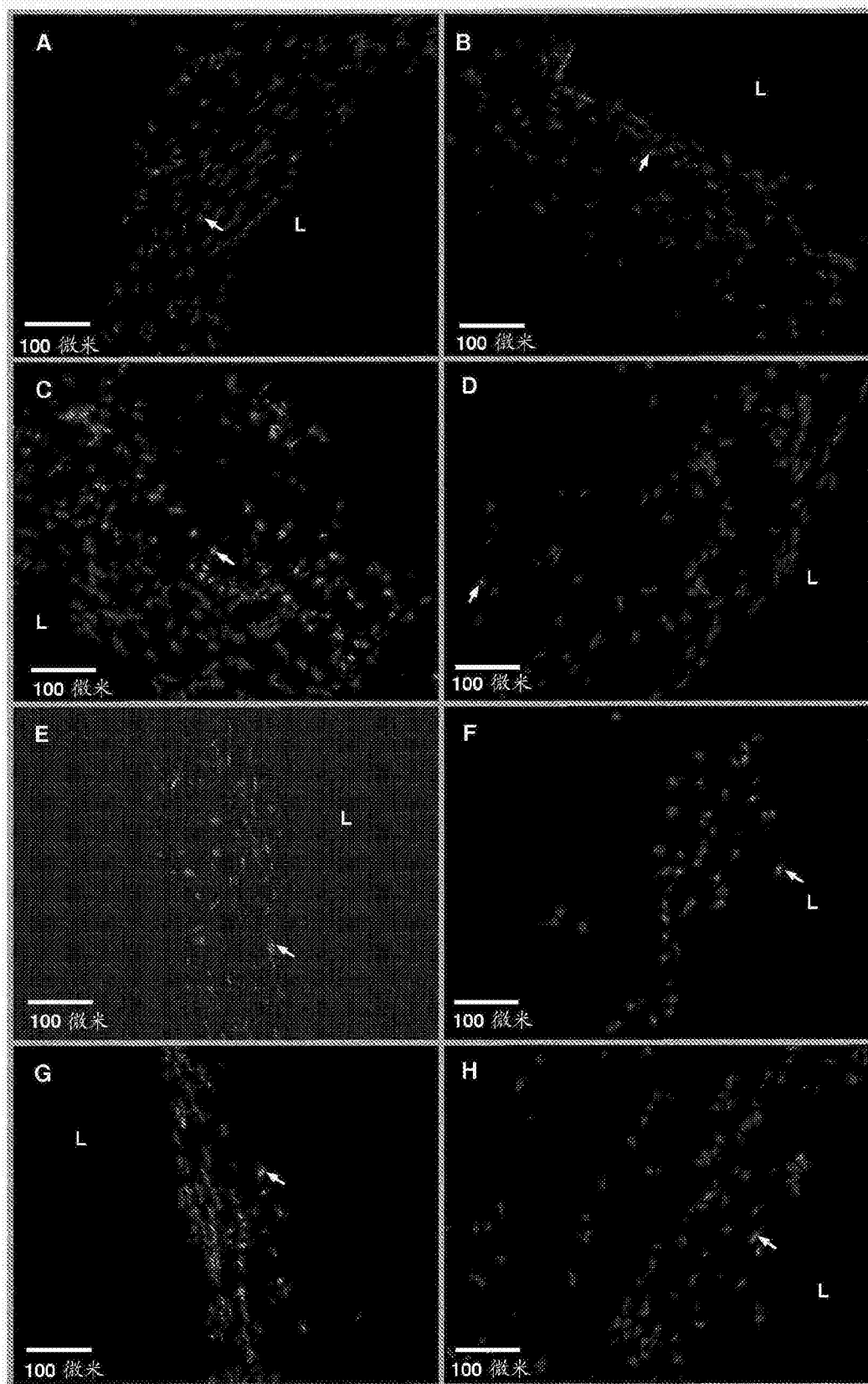


图 21

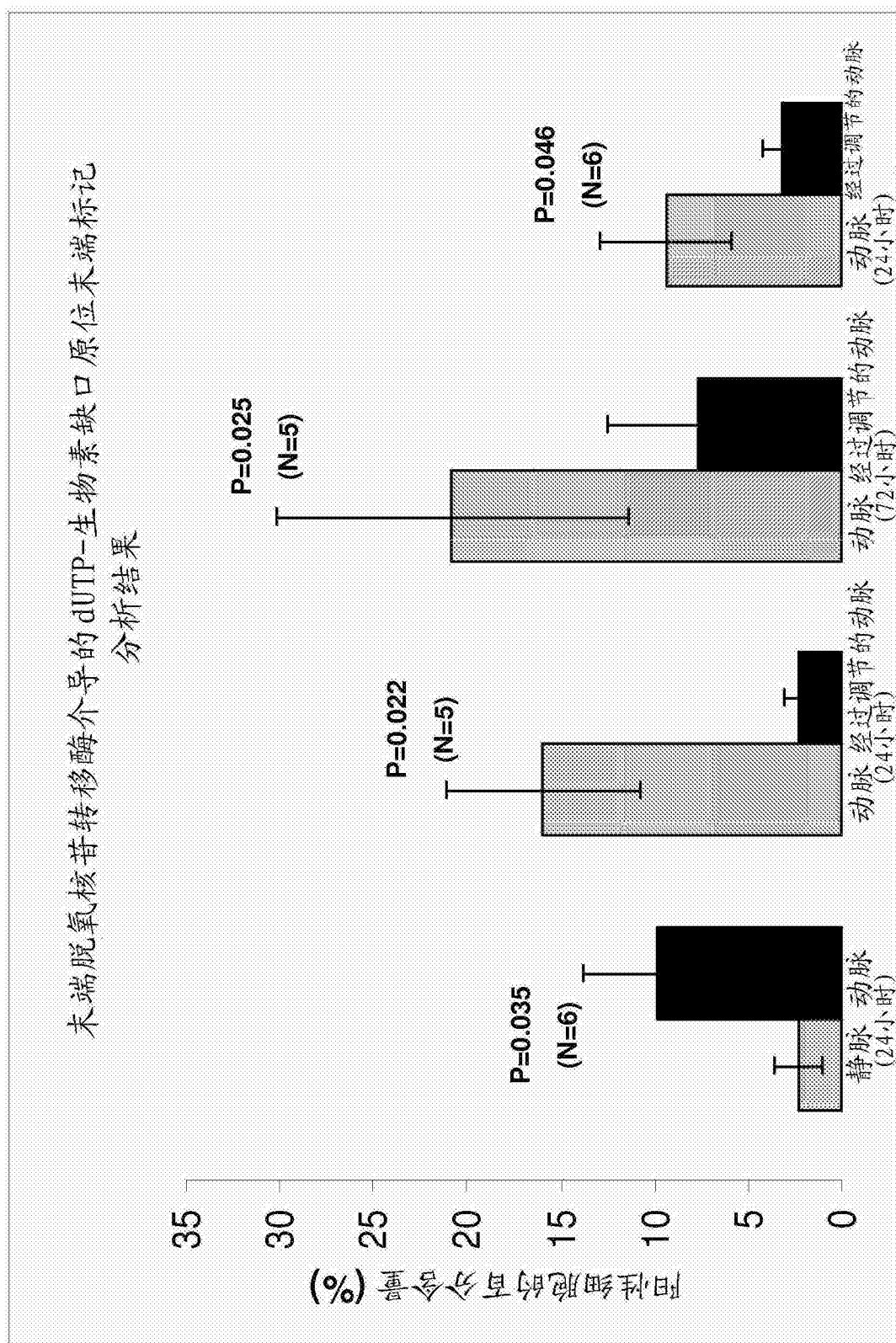


图 22

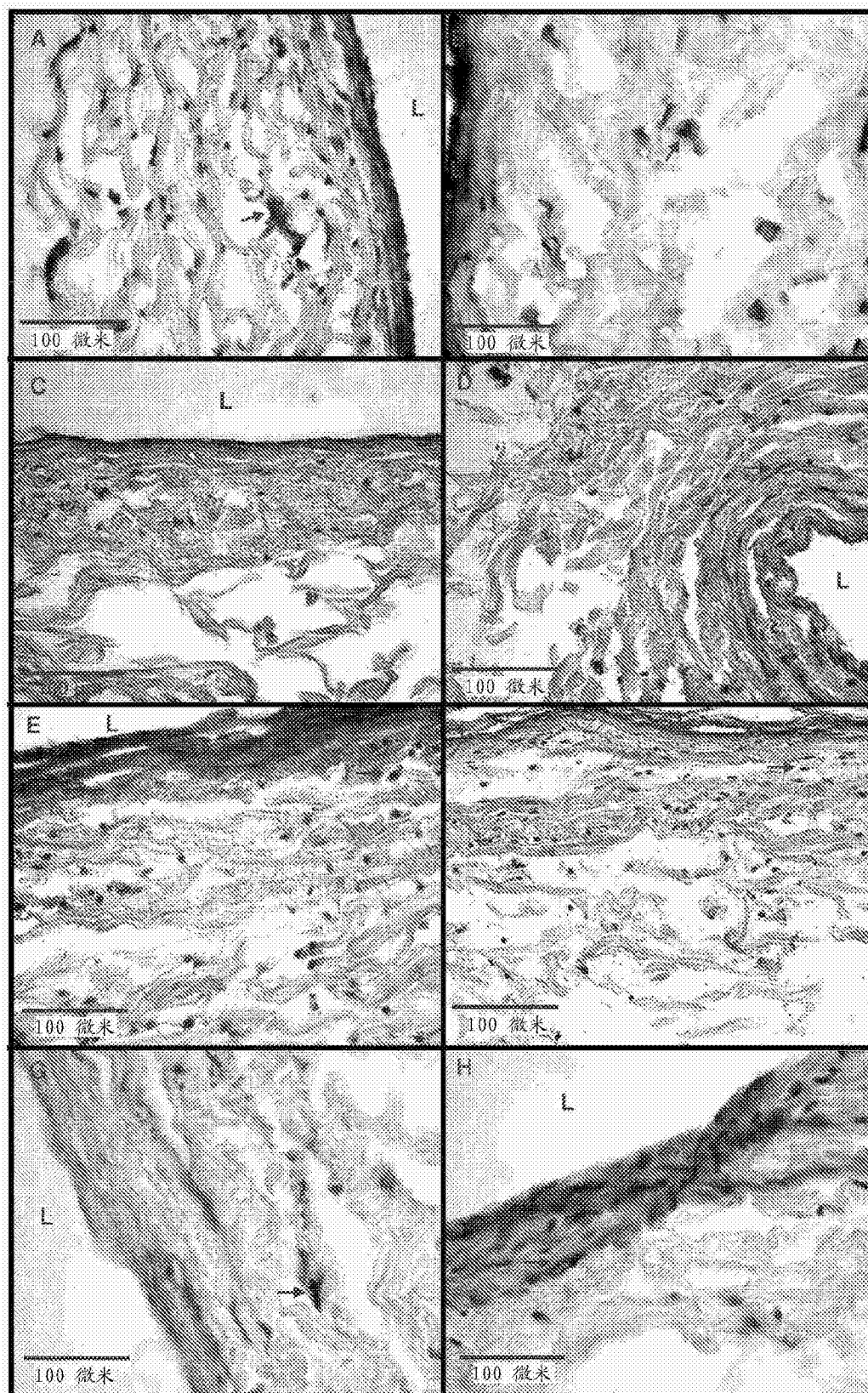


图 23

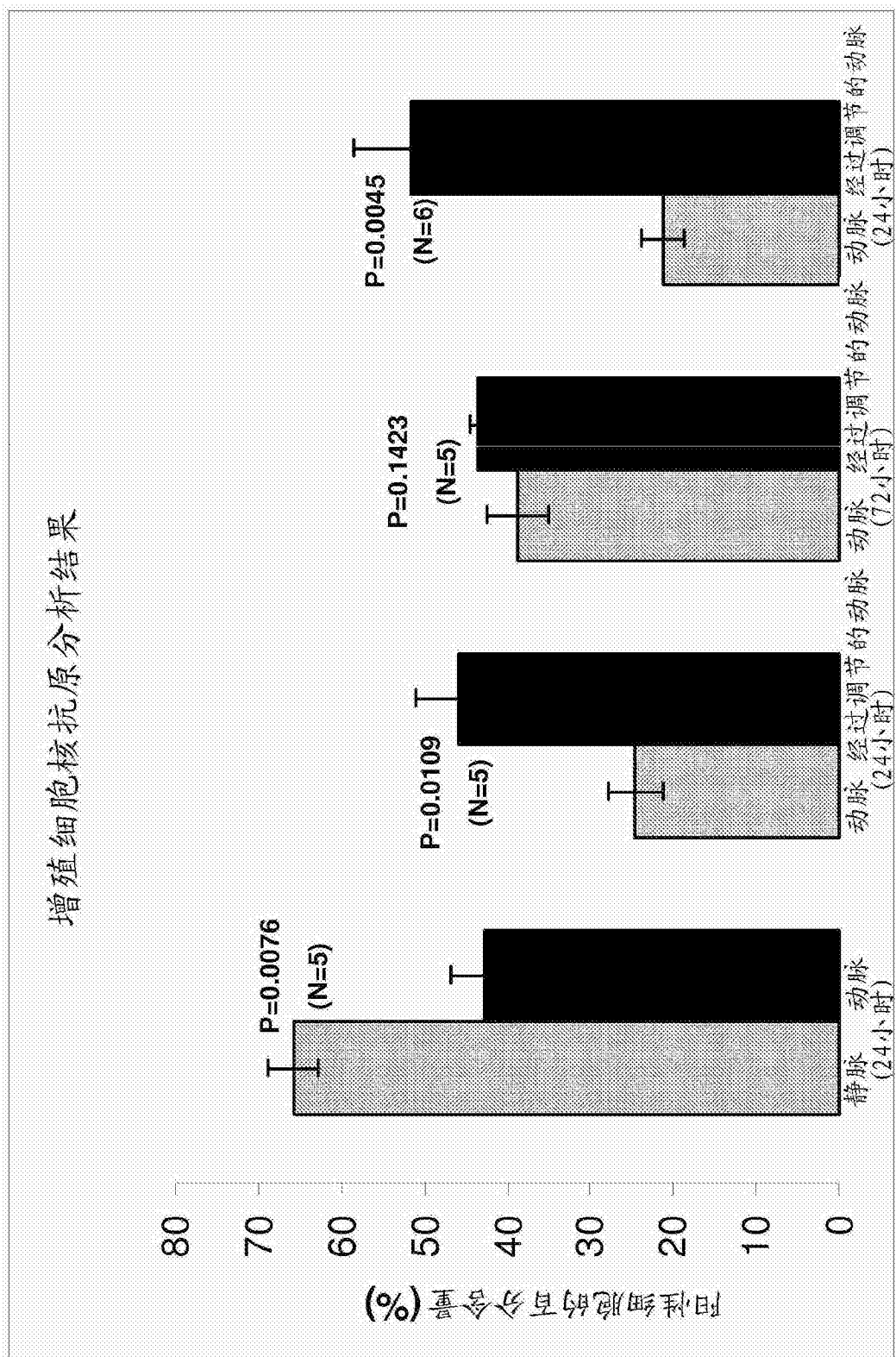


图 24

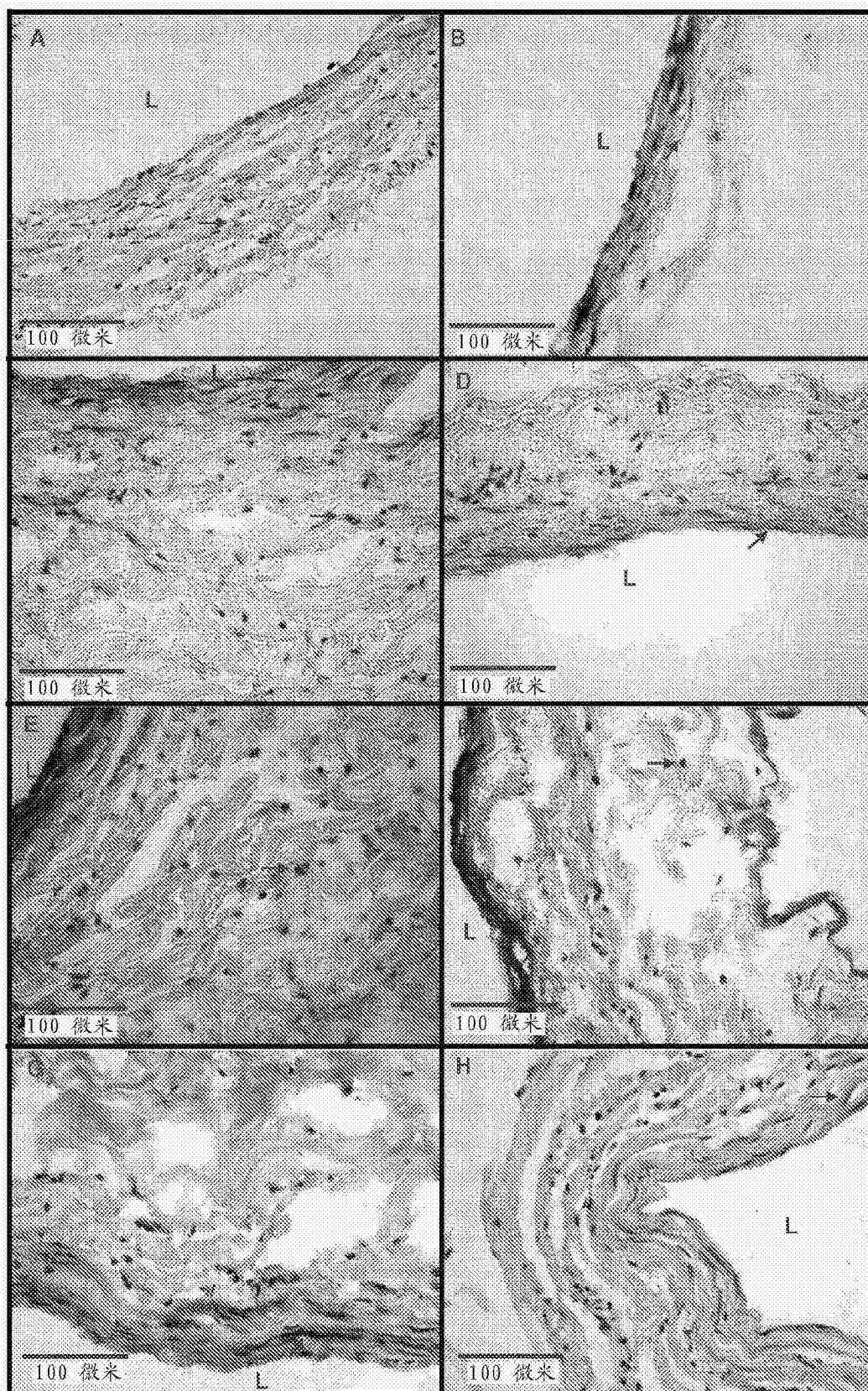


图 25

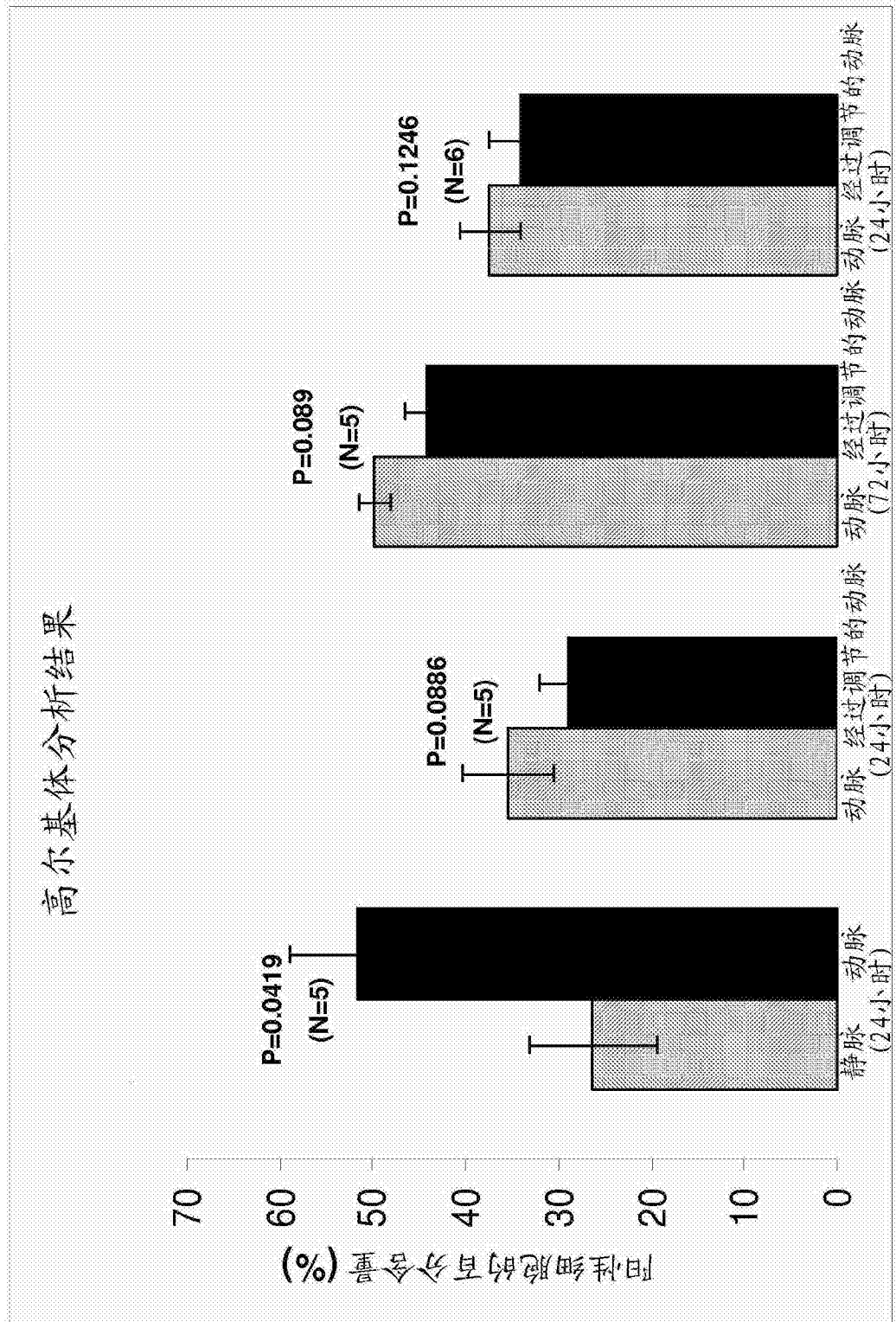


图 26



图 27

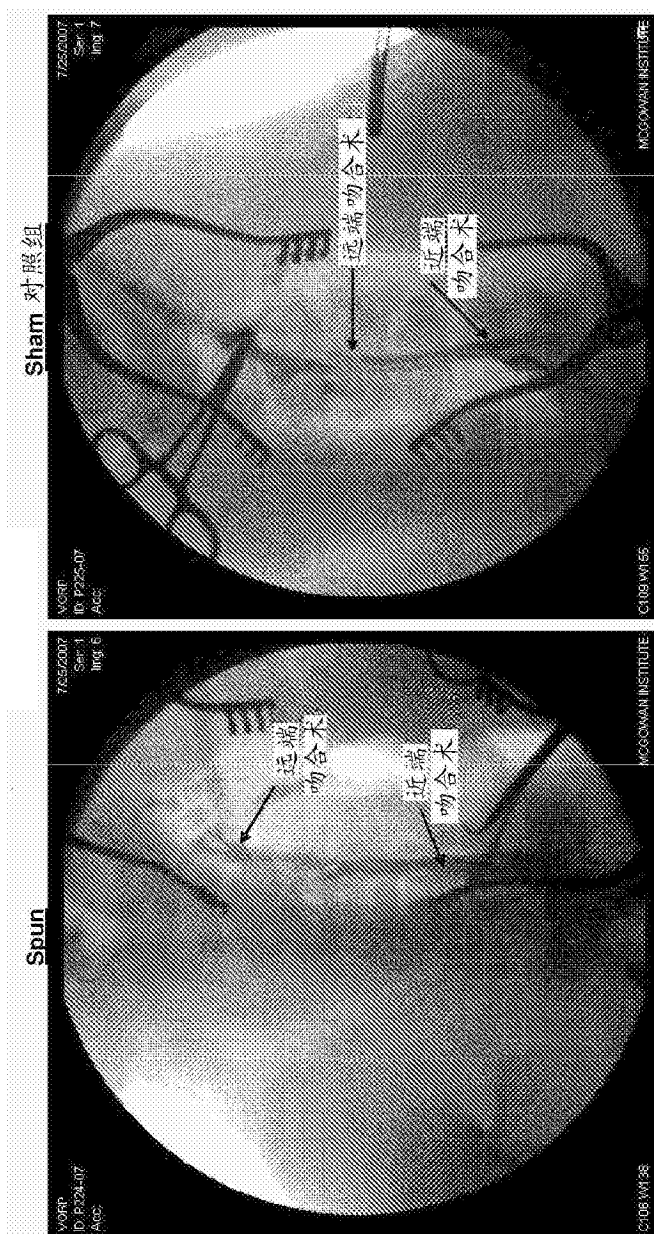


图 28

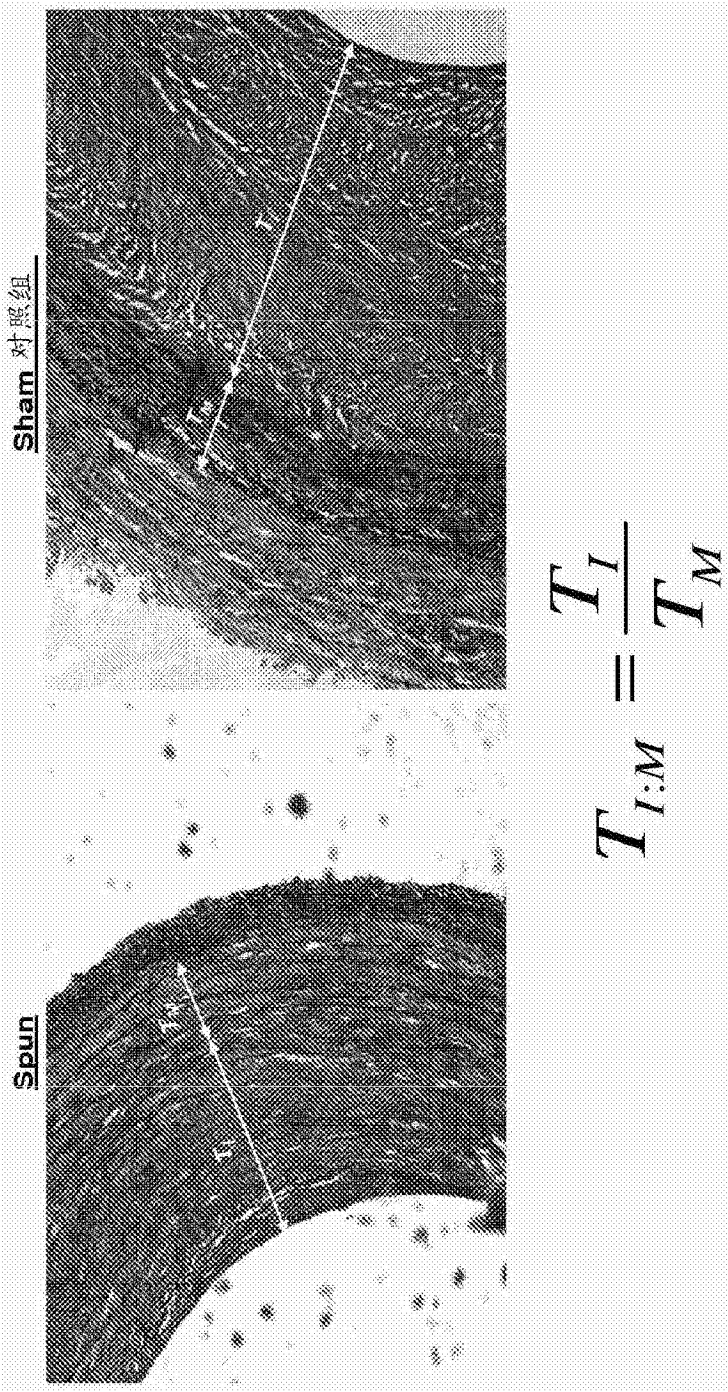


图 29

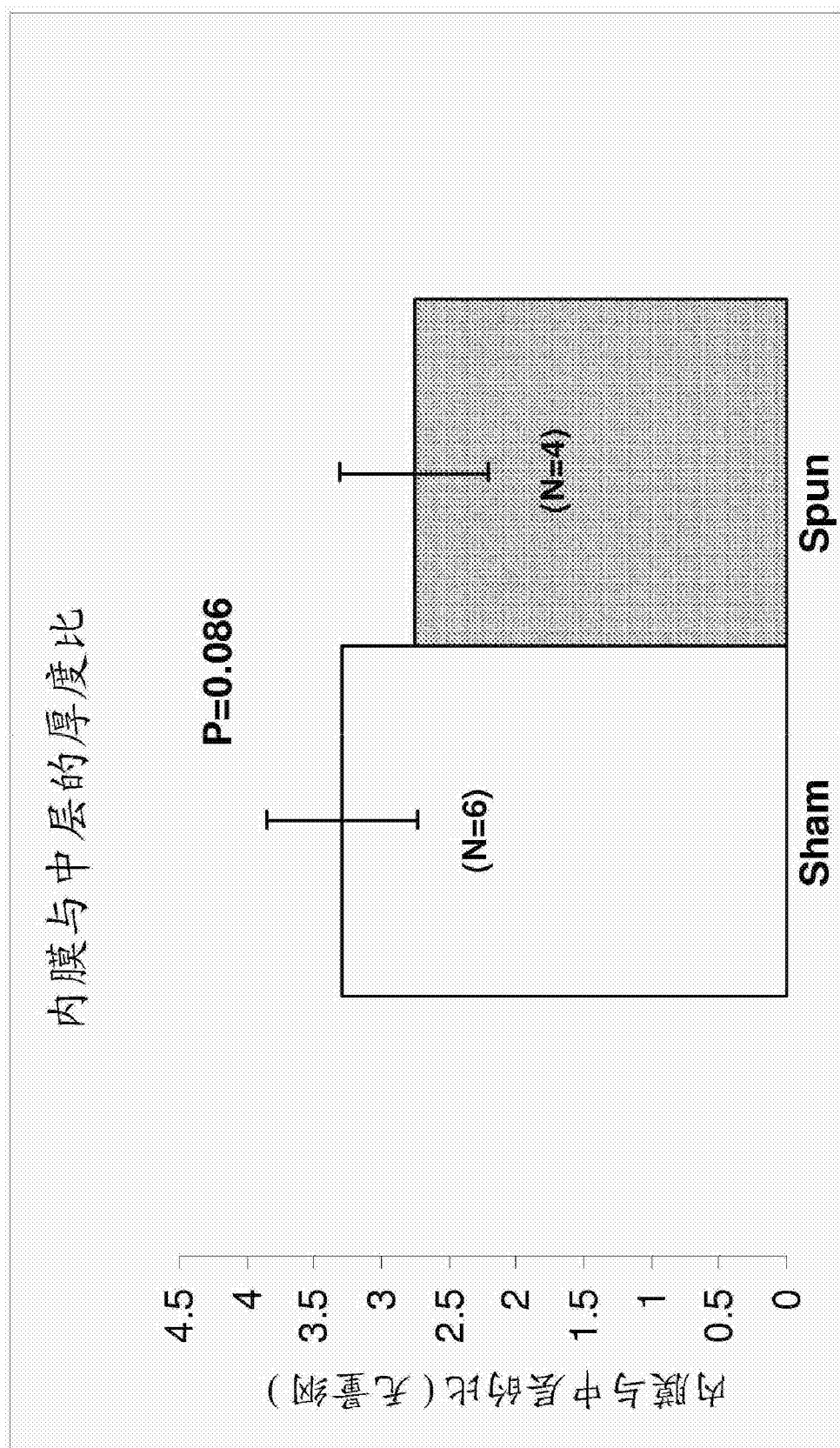


图 30

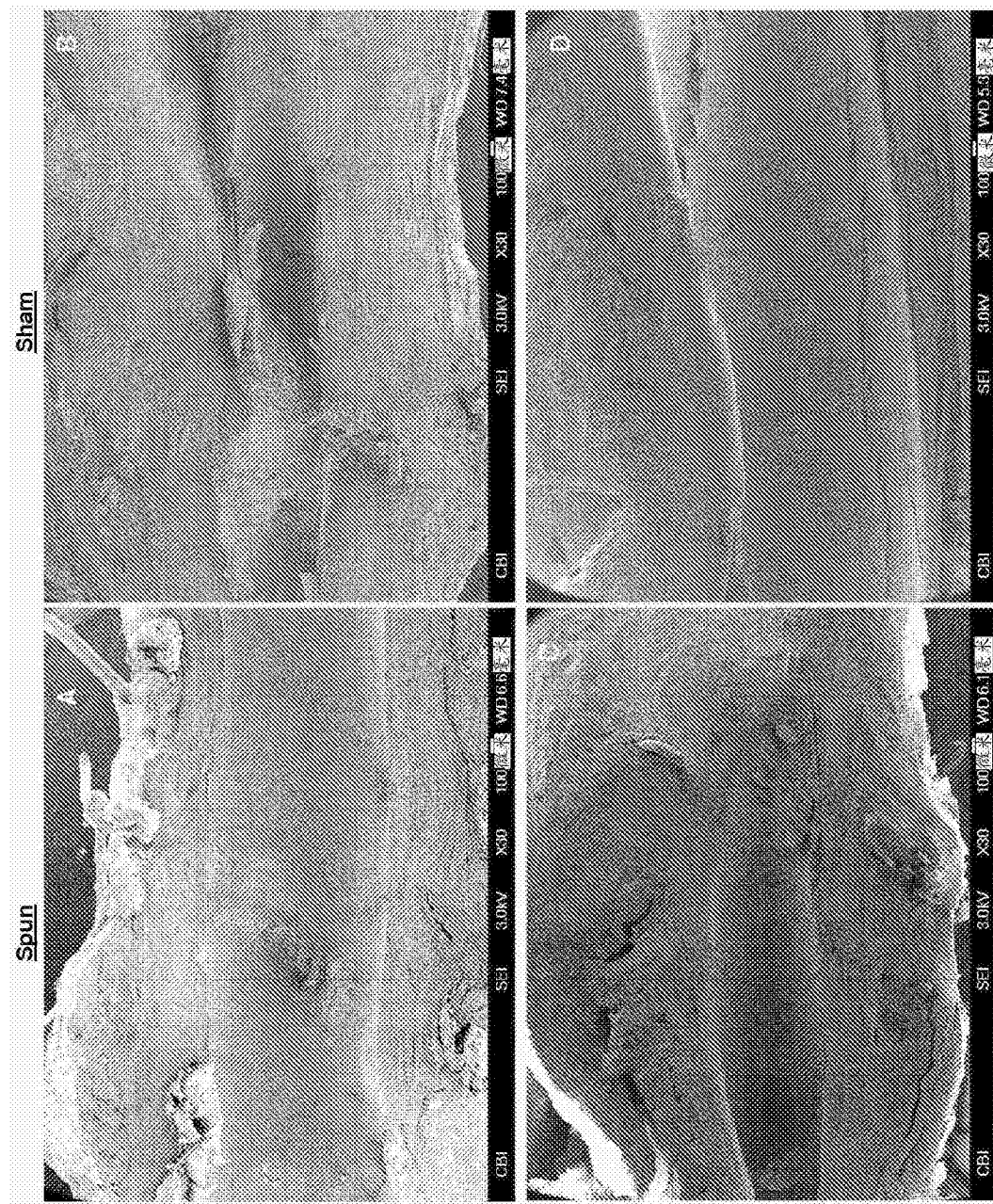


图 31