



## Подходы к антитромботической модификации сосудистых имплантатов

Виктория Владимировна Севостьянова,  
Евгения Олеговна Кривкина\*, Лариса Валерьевна Антонова

Научно-исследовательский институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия

### Реферат

Сосудистые имплантаты, контактирующие с кровью, должны обладать высокой тромборезистентностью. Однако в некоторых случаях их имплантация сопряжена с тромбообразованием и последующим нарушением проходимости кровеносного сосуда. Наиболее часто эта проблема затрагивает имплантаты, предназначенные для реконструкции сосудов малого диаметра, что связано с особенностями гемодинамики в данной части кровеносного русла. К ним можно отнести протезы кровеносных сосудов, тканеинженерные сосудистые графты и эндоваскулярные стенты. Особенности материала имплантата имеют большое значение при выборе способа его модификации с целью улучшения биосовместимости и тромборезистентности. В настоящем обзоре проанализирован современный опыт по использованию различных способов иммобилизации лекарственных препаратов к поверхности сосудистых протезов и эндоваскулярных стентов, изготовленных из стабильных и биodeградируемых полимеров. Оценена перспективность создания тромборезистентных сосудистых протезов и стентов путём совместной иммобилизации на поверхности полимерного материала лекарственных препаратов с атромбогенными свойствами и биологически активных молекул, регулирующих реакцию на инородное тело и ремоделирование имплантата. Многочисленные исследования, приведённые в настоящем обзоре, демонстрируют широкий спектр способов модификации протезов кровеносных сосудов, тканеинженерных сосудистых графтов и эндоваскулярных стентов антитромботическими препаратами для увеличения их тромборезистентности. К основным подходам антитромботической модификации можно отнести конъюгирование лекарственных средств и биологически активных молекул на поверхности имплантата. При этом новые технологии направлены не только на ингибирование процесса тромбообразования, но и на снижение интенсивности воспаления и стимуляцию восстановления сосудистой ткани.

**Ключевые слова:** сосудистые протезы, сосудистые графты, эндоваскулярные стенты, антикоагулянты, антиагреганты, тромборезистентность, биodeградируемые полимеры.

**Для цитирования:** Севостьянова В.В., Кривкина Е.О., Антонова Л.В. Подходы к антитромботической модификации сосудистых имплантатов. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (2): 232–242. DOI: 10.17816/KMJ2020-232.

### Approaches to antithrombotic modification of vascular implants

V.V. Sevostyanova, E.O. Krivkina, L.V. Antonova

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

### Abstract

Vascular implants in contact with blood must have high thrombotic resistance. However, in some cases, their implantation is associated with thrombosis and subsequent impaired patency of the blood vessel. Most often, this problem affects implants intended for reconstruction of small diameter vessels, which is associated with hemodynamic features in this part of the bloodstream. These include blood vessel prostheses, tissue-engineered vascular grafts, and endovascular stents. The features of the implant material are of great importance when choosing a method for its modification in order to improve biocompatibility and thromboresistance. The review analyzes current experience in using various methods of immobilizing drugs to the surface of vascular prostheses and endovascular stents made from stable and biodegradable polymers. The prospects of creating thromboresistant

vascular grafts and stents by joint immobilization on the surface of the polymer material of drugs with antithrombogenic activity and biologically active molecules that regulate the reaction to a foreign body and implant remodeling were evaluated. Numerous studies in the review demonstrating a wide range of ways to modify blood vessel prostheses, tissue-engineered vascular grafts, and endovascular stents with antithrombotic drugs to increase their thrombosis resistance. The main approaches of antithrombotic modification include conjugation of drugs and biologically active molecules on the implant surface. At the same time, new technologies are aimed not only at inhibiting the process of thrombus formation, but also at reducing the intensity of the inflammation process and stimulating the reparation of vascular tissue.

**Keywords:** vascular prostheses, vascular grafts, endovascular stents, anticoagulants, antiplatelet agents, thromboresistance, biodegradable polymers.

**For citation:** Sevostyanova V.V., Krivkina E.O., Antonova L.V. Approaches to antithrombotic modification of vascular implants. *Kazan medical journal*. 2020; 101 (2): 232–242. DOI: 10.17816/KMJ2020-232.

Стеноз и окклюзия кровеносных сосудов становятся причинами или ассоциированы с рядом сердечно-сосудистых заболеваний и патологических состояний, таких как ишемическая болезнь сердца, нарушение мозгового кровообращения, тромбоз внутренних вен и др. [1]. Хирургическое лечение данных состояний заключается в замене повреждённого кровеносного сосуда аутологичной веной или артерией, либо протезом [1]. В некоторых случаях просвет сосуда может быть восстановлен с использованием малоинвазивных процедур: баллонной дилатации и установки стента [2]. В ситуациях, требующих замены кровеносного сосуда, золотым стандартом имплантата служат аутологичные сосуды, однако они не всегда могут быть доступны вследствие их использования в более ранних операциях или атеросклеротического повреждения [1].

Альтернативой аутоветны и аутоартерии служат синтетические сосудистые протезы из полиэтилентерефталата (PET — от англ. polyethylene terephthalate, Dacron) и политетрафторэтилена (PTFE — от англ. polytetrafluoroethylene) [3]. Они демонстрируют высокую эффективность при протезировании крупных сосудов с внутренним диаметром более 6 мм. Высокая скорость кровотока в крупных сосудах, относительно инертные свойства и прочность PTFE и PET способствуют сохранению проходимости и целостности стенки данных синтетических имплантатов в условиях высокого давления. В свою очередь сосудистые протезы малого диаметра (менее 6 мм) из PTFE и PET имеют высокую склонность к тромбозу, что обусловлено низкой скоростью кровотока в этих сосудах и несоответствием комплаентности материала имплантата и комплаентности тканей кровеносного сосуда, что также становится и причиной гиперплазии неоинтимы в зоне анастомоза с последующим стенозом сосуда [3].

Ещё один вид сосудистых протезов, которые в настоящее время начинают демонстрировать положительные и многообещающие результаты в клинических испытаниях, — тканеинженерные сосудистые графты [4]. Значительный прогресс в области сосудистой тканевой инженерии позволил получить сосудистый графт малого диаметра, который обладает необходимыми механическими свойствами, имитирует структуру внеклеточного матрикса и подвергается ремоделированию с образованием тканей кровеносного сосуда при участии клеток организма. Однако ремоделирование имплантата и формирование эндотелия требуют времени, поэтому материал графта, который контактирует с кровью, также должен обладать высокой тромборезистентностью [5].

При восстановлении просвета кровеносных сосудов малоинвазивными хирургическими методами используют стенты на основе биосовместимых металлов или/и полимеров, которые доставляют в стенозированные сосуды через небольшое отверстие в бедренной артерии [2]. Эндоваскулярные стенты должны обладать ультратонкой толщиной стенки, механической прочностью и поверхностью с антитромботическими свойствами.

Таким образом, одно из главных требований, предъявляемых ко всем сосудистым имплантатам, — высокая гемосовместимость, в том числе тромборезистентность. В настоящее время существует три основные стратегии, используемые для увеличения тромборезистентности поверхностей, контактирующих с кровью. К ним относятся создание биоактивной поверхности с использованием антитромботических агентов, пассивация поверхности имплантатов гидрофильными и цвиттер-ионными полимерами, которые препятствуют контакту основного материала изделия с кровью и предотвращают неспецифическую адгезию белка, и эндотелизация внутренней поверхности имплантата [5–7].

Следует отметить, что создание эндотелиального слоя необходимо в основном при разработке тканеинженерных сосудистых графтов, тогда как две первые стратегии применимы при модификации всех типов сосудистых имплантатов.

В настоящей статье рассмотрены основные подходы к модификации поверхности сосудистых протезов, стентов и тканеинженерных сосудистых графтов с использованием антитромботических лекарственных средств и биосовместимых полимеров.

**Антитромботические лекарственные средства, используемые для модификации поверхности имплантатов.** Для увеличения гемосовместимости имплантатов, контактирующих с кровью, широко применяют антитромботические агенты, такие как антикоагулянты и антиагреганты, которые иммобилизуются на поверхности изделия. Антикоагулянты представляют группу препаратов, угнетающих активность свёртывающей системы крови и препятствующих образованию тромбов.

Наиболее используемым антитромботическим агентом для модификации сосудистых имплантатов и тканеинженерных сосудистых графтов служит гепарин. Он представляет собой антикоагулянт прямого действия, эндогенный сульфатированный гликозаминогликан, содержащийся в тучных клетках [8]. Антикоагулянтное действие гепарина обусловлено его связыванием с антитромбином III, который ингибирует активированные факторы коагуляции, в частности тромбин (фактор II), Ха, XIIIa и IXa. Связывание гепарина с антитромбином III вызывает конформационное изменение, которое открывает реактивный сайт антитромбина III, в несколько раз увеличивая его способность ингибировать факторы свёртывания крови [9, 10]. Более того, гепарин взаимодействует с большим количеством факторов роста, которые имеют гепарин-связывающий домен. Системы доставки на основе этого антикоагулянта могут предотвращать ферментативную деградацию связанных факторов роста, тем самым усиливая их биологические функции [11].

Значительные перспективы применения для антитромбогенной модификации имеют и другие антикоагулянты. К примеру, гирудин, пептид, состоящий из 65 аминокислот, который служит высокоселективным прямым ингибитором тромбина, не зависит от антитромбина III или кофакторов и не инактивируется тромбоцитарным фактором 4 [12, 13]. Существуют его аналоги: лепирудин, полученный по рекомбинантной технологии из медицинской пиявки и используемый для лечения гепарин-инду-

цированной тромбоцитопении, представляющий собой полипептид из 65 аминокислот, способный прочно связываться как с каталитическим сайтом, так и с расширенным сайтом распознавания субстрата тромбина [14], а также бивалирудин, синтетический полипептид из 20 аминокислот, который напрямую ингибирует тромбин по механизму, аналогичному механизму лепирудина [15].

Увеличение тромборезистентности сосудистых имплантатов показано и при их модификации антиагрегантами, особенно в сочетании с антикоагулянтами. Наиболее известный лекарственный препарат, ингибирующий активацию и агрегацию тромбоцитов, — ацетилсалициловая кислота. Механизм её действия заключается в подавлении биосинтеза тромбоксана A<sub>2</sub>, находящегося в тромбоцитах. Кроме того, ацетилсалициловую кислоту применяют как противовоспалительное и жаропонижающее средство [16, 17]. Большой интерес исследователей в качестве антитромботического агента для обработки сосудистых протезов также вызывает илопрост, так как он не только угнетает функции тромбоцитов, но и препятствует спазму сосудов, способствуя их расширению, а также защищает эндотелий [18, 19].

Перечисленные антикоагулянты и антиагреганты активно используют при разработке сосудистых имплантатов: протезов, стентов, тканеинженерных графтов. При этом существуют различные подходы к иммобилизации лекарственных средств на поверхности изделий.

**Сосудистые имплантаты с тромборезистентными свойствами.** Имплантация любого сосудистого протеза или устройства вызывает адгезию белка на его поверхности, активирует систему комплемента и тромбоциты, а также вызывает реакцию на инородное тело [6]. Характер взаимодействия имплантата с кровью определяется главным образом его типом, свойствами материала, параметрами кровотока и местом имплантации. Также особенности материала имплантата имеют большое значение и при выборе способа его модификации с целью улучшения биосовместимости и тромборезистентности.

*Синтетические сосудистые протезы.* Синтетические протезы кровеносных сосудов на основе PTFE и Dacron обладают высокой прочностью и демонстрируют высокую эффективность при протезировании крупных сосудов, например при реконструкции аорто-подвздошного сегмента. Однако при этом протезы малого диаметра, которые имплантируют в сосуды с медленным током крови и высоким сопро-

тивлением кровотоку при аортокоронарном шунтировании, инфраингинальных и других реконструкциях, имеют плохую проходимость в результате ранних тромбозов и гиперплазии неоинтимы. Это делает необходимой дополнительную антитромботическую модификацию внутренней поверхности синтетических протезов.

Для увеличения тромборезистентности сосудистых PTFE-протезов Lin и соавт. покрывали внутреннюю поверхность имплантатов гепарином с применением технологии CARMEDA Bioactive surface (W.L. Gore & Associates, Inc. и Berlin Heart GmbH) [20]. Данная технология заключается в предварительной частичной деполимеризации нефракционированного гепарина дезаминированием азотистой кислоты, что позволяет получить молекулы гепарина с пониженной молекулярной массой, которые содержат отдельные реакционноспособные альдегидные группы. Далее на поверхности протеза формируют базальный слой, состоящий из чередующихся слоёв анионного полисахарида декстрансульфата и катионного полимера полиэтиленimina. Полученный субстрат содержит функциональные аминокислоты, которые используются для ковалентного связывания гепарина через его альдегидную группу.

Функционирование модифицированных протезов оценивали *in vivo* на модели билатерального наложения шунта на бедренную артерию собак. Каждому животному имплантировали PTFE с гепарином с одной стороны и немодифицированный PTFE — с другой стороны в качестве контроля. Исследование показало, что на поверхности протезов, содержащих антикоагулянт, адгезия тромбоцитов через 24 ч была ниже на 72% по сравнению с контролем. Также доля проходимости имплантатов с гепариновым покрытием составила 89% против 44% в контрольных образцах. Более того, иммобилизованный гепарин способствовал значительному снижению гиперплазии неоинтимы [20]. Позднее результаты были подтверждены в аналогичном длительном эксперименте с имплантацией протезов сроком на 2 года [21].

В свою очередь Al Meslmani и соавт. иммобилизовали гепарин в сочетании с коллагеном на внутренней поверхности протезов Dacron [22]. Коллаген использовали для увеличения биосовместимости имплантатов. Два вида протезов Dacron, тканый и вязанный, модифицировали в несколько этапов. Сначала на поверхность PET вводили функциональные карбоксильные группы. Далее материал подвергали реакции аминолиза с использованием

этилендиамина для получения аминокислот. Гепарин и коллаген ковалентно связывали с поверхностью PET, содержащим аминокислоты, с помощью глутарового альдегида. Данная технология присоединения позволяет сохранить активные центры гепарина доступными для связывания с антитромбином III. Модификация антикоагулянтом ингибировала адгезию тромбоцитов, а также формирование фибринового сгустка как на тканном протезе Dacron, так и на вязанном. При этом дополнительное введение коллагена на внутреннюю поверхность имплантатов стимулировало адгезию фибробластов [22].

Ещё одним из способов создания лекарственных покрытий служит использование биосовместимых полимеров в качестве носителя [23]. Так, была показана возможность гепаринизации сосудистого протеза из PTFE с использованием хитозана. Для того чтобы привязать полимер к имплантату, в молекулу хитозана предварительно вводили светочувствительную азидную группу. После чего хитозан, содержащий азидную группу, наносили на PTFE-протез и пришивали с помощью ультрафиолетового облучения. Гепарин иммобилизовали на хитозановом покрытии благодаря способности данных веществ к комплексообразованию.

Комплекс хитозан/гепарин препятствовал адгезии тромбоцитов и других клеток на внутренней поверхности протезов, что было показано в эксперименте *in vitro* после контакта имплантатов с кровью. Более того, в модифицированных PTFE-протезах, имплантированных в подкожную вену собак, не отмечали образования тромбов в просвете, но при этом наблюдали активный процесс ремоделирования стенки кондуитов, особенно на внутренней поверхности, с привлечением клеток, их пролиферацией и васкуляризацией новых тканей. Основная цель такого подхода заключается в постепенной деградации комплекса хитозан/гепарин и его замене эндотелиальным слоем [23].

Снижение уровня тромбоза PTFE-протезов отмечали также и при их модификации илопростом в сочетании с тканевым активатором плазминогена (tPA — от англ. tissue plasminogen activator), превращающим плазминоген в фибринолитический фермент плазмин [24]. Илопрост и tPA фиксировали на внутренней поверхности имплантатов с помощью сурфактанта тридодecilметиламмония хлорида, который обеспечивает нековалентное связывание лекарственных средств, имеющих отрицательный заряд. Недельный срок имплантации

модифицированных протезов в брюшную часть аорты крыс показал значительное снижение вероятности раннего тромбоза по сравнению с обычными кондуитами PTFE [24].

Интересные результаты были получены в работе Neise и соавт., которые для создания антитромботического покрытия использовали комбинацию антикоагулянта, PEG-гирудина и антиагреганта илопроста [25]. Лекарственные средства вводили в раствор биосовместимого биodeградируемого полимера, полимолочной кислоты (PLA — от англ. polylactide acid). Полученной смесью дважды обрабатывали сосудистые PTFE-протезы для получения плотного покрытия. В результате 6-недельной имплантации модифицированных кондуитов в бедренную артерию свиней была показана их полная проходимость с сохранением объема тока крови на дооперационном уровне и незначительной неointимой в дистальном анастомозе. Такой результат был достигнут благодаря медленной деградации PLA и постепенному локальному высвобождению лекарственных средств.

Также авторы обращают внимание на то обстоятельство, что гирудин служит оптимальной заменой гепарину при антитромботической модификации имплантатов, поскольку сами гепаринизированные протезы имеют ряд недостатков. Это обусловлено тем, что гепарин осуществляет свою функцию, активируя анти-тромбин III, который в свою очередь способен ингибировать тромбин, но при этом гепарин не имеет эффективности в отношении тромбина, связанного с фибриновым сгустком. Кроме того, длительное высвобождение гепарина из протеза может провоцировать развитие тромбоцитопении у некоторых пациентов и как следствие приводить к кровотечению и тромбоэмболическим осложнениям [25].

Научные разработки покрытий с антитромботическими средствами для модификации синтетических сосудистых протезов привели к созданию ряда коммерческих технологий, которые сегодня существуют на рынке медицинских изделий, таких как BIOLINE Coating (Maquet Cardiovascular, LLC), CARMEDA Bioactive surface (W.L. Gore & Associates, Inc. и Berlin Heart GmbH), Flowline BIPORE Heparin (Jotec GmbH), PM Flow Plus Heparin (Perouse Medical) [26].

*Тканеинженерные сосудистые графты.* На сегодняшний день тканеинженерные сосудистые графты представляют собой многообещающую альтернативу синтетическим протезам кровеносных сосудов. При разработке эффективных сосудистых графтов и создании

тромборезистентной поверхности следует учитывать сложность используемых комбинаций различных материалов для их изготовления и структуру, имитирующую нативный внеклеточный матрикс. Основными материалами для создания тканеинженерных графтов служат биосовместимые биodeградируемые полимеры, имеющие высокую прочность и оптимальные упруго-деформативные свойства, такие как поликапролактон (PCL — от англ. polycaprolactone), PLA, полигликолевая кислота (PGA — от англ. polyglycolic acid) и их сополимеры, например сополимер молочной и гликолевой кислот [poly(lactic acid-co-glycolic acid) — PLGA], сополимер молочной кислоты и поликапролактона [poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) — PLCL] [5].

Разработка сосудистых графтов, изготовленных методом электроспиннинга из PCL, ковалентно связанного с молекулами гепарина, была продемонстрирована в работе Duan и соавт. [27]. Прикрепление гепарина к PCL осуществляли с помощью реакционной смеси N-гидроксисукцинимида (NHS — от англ. N-hydroxy-succinimide) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide — EDC] до начала изготовления графта. Такое связывание лекарственного средства гораздо прочнее и эффективнее, чем простое введение в полимер или адсорбция на поверхности готового изделия. Исследования *in vitro* показали наличие у сосудистых графтов из гепарин-связанного PCL великолепных антикоагулянтных свойств, а также большую скорость биodeградации и гидрофильность по сравнению с PCL. Положительное влияние этих свойств на проходимость и регенерацию сосудистой стенки было показано при имплантации графтов с гепарином в бедренную артерию собак [27].

Тканеинженерный сосудистый графт более сложной конструкции был предложен Nogouzi и Shamloo [28]. Внутренний слой имплантата изготавливали ко-электроспиннингом PCL и желатина с получением двух типов волокон. Создание внешнего слоя осуществляли лиофилизацией желатинового гидрогеля, что позволяло получить материал с крупными порами для эффективной инфильтрации клеток в стенку графта из окружающих тканей. Для того чтобы придать данной конструкции антитромботические свойства, в растворы PCL и желатина предварительно вводили гепарин, а далее осуществляли эмульсионный электроспиннинг. Благодаря данному подходу молекулы антикоагулянта были запечатаны внутри волокон, их высвобождение происходило в процессе

деградации полимера и способствовало снижению адгезии тромбоцитов на поверхности имплантата [28].

Успешная иммобилизация гепарина с помощью ионных связей также была показана на сосудистых графтах, изготовленных ко-электроспиннингом PCL и хитозана [29]. Добавление природных биodeградируемых полимеров, таких как хитозан, желатин, коллаген, к синтетическим (PCL, PLA, PGA, PLGA) позволяет повысить биосовместимость имплантатов, при этом сохранив их прочность. Относительно прочные ионные связи обеспечивали стабильный выход гепарина с поверхности полимерных волокон графта в окружающую среду. Оценка гемосовместимости *in vitro* продемонстрировала снижение адгезии тромбоцитов, удлинение активированного частичного тромбопластинного времени и тромбинового времени, а также предотвращение тромбообразования *in vivo* после гепариновой модификации графта [29].

Для увеличения биосовместимости тканеинженерных графтов из PLA, также полученных методом электроспиннинга, Aslani и соавт. наносили на поверхность имплантата лизат человеческой амниотической мембраны, так как она богата структурными и функциональными белками внеклеточного матрикса, коллагеном, эластином, ламинином и протеогликанами [30]. При этом для обеспечения тромборезистентности имплантата авторы использовали ацетилсалициловую кислоту, которую вводили в раствор PLA при проведении электроспиннинга. Биodeградация PCL обеспечивала медленное высвобождение лекарственного средства из графта. При этом антитромботическая обработка и покрытие элементами внеклеточного матрикса способствовали высокой гемосовместимости имплантата, что было подтверждено исследованиями *in vitro* гемолиза и свёртываемости крови [30].

Перспективные результаты по созданию эффективного тромборезистентного сосудистого графта демонстрируют и подходы, заключающиеся в совместной иммобилизации на поверхности полимерного материала гепарина и других биологически активных молекул, регулирующих реакцию на инородное тело и ремоделирование имплантата. К примеру, Gao и соавт. использовали технологию послойной самосборки для создания покрытия из гепарина и полиэтиленimina, модифицированного селеном, на волокнистых PCL-графтах [31]. Модифицированный полиэтиленимин был выбран в качестве катализатора высвобождения оксида азота (NO) из эндогенных NO-доноров,

S-нитрозотиолов. В свою очередь NO способен снижать реакцию воспаления, рост неоинтимы и стимулирует образование эндотелия, который служит естественной тромборезистентной выстилкой кровеносных сосудов [31].

Для ускорения формирования эндотелиального слоя в сосудистых графтах часто применяют сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF — от англ. vascular endothelial growth factor), так как он способен стимулировать миграцию эндотелиальных клеток. Комбинация VEGF с гепарином должна обеспечить антитромбогенные свойства поверхности на ранних сроках имплантации до формирования монослоя эндотелиальных клеток. Так, при изготовлении сосудистого графта гепарин и VEGF вводили внутрь полимерного волокна из смеси PLPCL, коллагена и эластина с помощью коаксильного электроспиннинга [32]. Стенка полученного имплантата состояла из двуслойных волокон, внутренний слой которых содержал биоактивные вещества. Высвобождение VEGF и гепарина при деградации внешнего слоя волокна обеспечивало их дозированную доставку, препятствовало чрезмерному поступлению в кровь и возможным осложнениям в результате передозировки. Данные графты демонстрировали хорошую проходимость и отсутствие тромбообразования при имплантации в брюшной отдел аорты кроликов [32].

Другими биоактивными молекулами, которые используют совместно с антитромботическими агентами, служат хемоаттрактанты. При этом гепарин может выступать не только как антикоагулянт, но и как молекула, связывающая хемоаттрактантные молекулы с поверхностью имплантата. Эффективность такого подхода была показана Wang и соавт. [33]. Они изготавливали тканеинженерный матрикс из смеси PLA, PLGA и PLCL методом термически индуцированного фазового разделения. Данный метод позволяет создавать полимерные матриксы с микро- и наноструктурой. Гепарин конъюгировали на поверхности матрикса с применением смеси EDC/NHS и линкера — диаминополиэтиленгликоля. К гепаринизированному матриксу добавляли раствор стромального фактора 1α (SDF-1α — от англ. cell-derived factor-1 alpha). Благодаря способности SDF-1α, связываться с гепарином на поверхности матрикса получали покрытие, которое обладает антитромботическими свойствами и привлекает эндотелиальные клетки [33].

Кроме введения антитромботических средств непосредственно в полимер или их ковалентной конъюгации на поверхности материала,

в качестве средств доставки также могут быть использованы наночастицы. В недавнем исследовании представлена разработка композитного тканеинженерного графта, имеющего в составе мезопористые наночастицы кремнезёма, которые обладают высокой биосовместимостью, большой удельной поверхностью и упорядоченной системой пор [34]. Иммобилизацию гепарина на поверхность наночастиц осуществляли посредством молекулы этиленгликоля. Выполняя функцию линкера, этиленгликоль также усиливал антитромботический эффект гепарина за счёт своей способности ингибировать адгезию белков. Наночастицы, нагруженные этиленгликолем и гепарином, вводили во внутренний слой стенки графтов, изготовленный электроспиннингом из PLGA с коллагеном. Внешний слой графта формировали из полиуретана для обеспечения длительной механической поддержки. Высвобождение наночастиц с биоактивными веществами способствовало увеличению антикоагуляционных свойств материала графта, снижало адгезию тромбоцитов на его поверхности. Кроме того, при имплантации в каротидную артерию кроликов модифицированные графты демонстрировали высокую проходимость, а внутренний слой полностью биодеградировал через 8 нед, препятствуя тромбообразованию и стимулируя регенерацию тканей сосудистой стенки [34].

В целом широкий спектр технологий изготовления тканеинженерных сосудистых графтов, а также используемых материалов и их комбинаций позволяет создавать имплантаты с различными антитромботическими модификациями. При этом возможно введение в конструкции как антикоагулянтов и антиагрегантов, так и нетромбогенных материалов, например эластина и этиленгликоля [5].

*Эндovasкулярные стенты.* Необходимость антитромботической модификации эндovasкулярных стентов связана с высоким риском их тромбоза при контакте с кровью, что обусловлено тромбогенностью самого стента, особенностью процедуры его установки и повреждением стенки сосуда в месте установки имплантата [35]. В настоящее время основным подходом для предотвращения тромбоза сосудистого стента служит создание полимерных покрытий, нагруженных антитромботическими агентами.

В 1996 г. были опубликованы результаты исследования пяти типов покрытий из биодеградируемых полимеров (PLGA, PCL, полигидроксibuтират-валерат, полиортоэфир, полиэтиленоксид-полибутилентерефталат)

и трёх — из недеградируемых (PET, полиуретан, силикон), нанесённых на расширяемые баллоном коронарные стенты Wiktor (Medtronic Inc). Имплантация стентов в венечные артерии свиней выявила процессы тромбообразования, воспаления и гиперплазии фиброзной ткани в имплантатах как с биодеградируемыми, так и с небиодеградируемыми покрытиями [36].

Позже Alt и соавт. предложили использовать PLA с введёнными антитромботическими лекарственными средствами для нанесения на коронарные стенты. Palmaz-Schatz стенты из нержавеющей стали (Johnson & Johnson) покрывали раствором из PLA, содержащим PEG-гирудин и илопрост, с получением полимерного слоя толщиной 10 мкм и имплантировали в венечные артерии овец и свиней [37]. Результаты исследования на обеих животных моделях были схожи: биоактивное покрытие значительно снижало воспалительную реакцию на инородное тело и способствовало сохранению просвета и проходимости стентированного сосуда.

Большой потенциал для применения в клинической практике имеют коронарные стенты, покрытые ацетилсалициловой кислотой, так как у пациентов с атеросклерозом венечных артерий нарушено эндогенное ингибирование тромбоцитов, что вызывает их повышенную восприимчивость к агонистам, высвобождаемым из воспалённого эндотелия, и активацию. Так, для модификации расширяемых баллоном стентов из нержавеющей стали ацетилсалициловой кислотой был использован метод электроспиннинга, в качестве депо лекарственного средства выступил PLGA [38]. При этом электроспиннинг полимера, содержащего растворённый антиагрегант, осуществляли непосредственно на поверхность стента, получая имплантат, покрытый нановолокнами с инкорпорированной ацетилсалициловой кислотой. Установка стентов в брюшной отдел аорты кроликов показала способность лекарственного покрытия эффективно ингибировать адгезию тромбоцитов и ускорять реэндотелизацию.

Также в ряде работ была показана возможность комбинирования антитромботических агентов с другими лекарственными препаратами и ростовыми факторами для уменьшения воспаления и регуляции процесса заживления повреждённой стенки сосуда. Choi и соавт. разработали стратегию модификации поверхности коронарных стентов гепарином, VEGF и фактором роста гепатоцитов (HGF — от англ. hepatocyte growth factor), который так же, как и VEGF, обладает способностью стимулировать деление эндотелиальных клеток [39].

Для создания базового биосовместимого покрытия стента, которое также выступало как депо гепарина, использовали гиалуроновую кислоту. Стенты из кобальт-хромового сплава покрывали гиалуроновой кислотой, конъюгированной с дофамином и нагруженной молекулами гепарина. VEGF и HGF иммобилизовали на покрытии благодаря наличию у ростовых факторов гепарин-связывающего домена. Данное покрытие ускоряло формирования монослоя эндотелиальных клеток [39].

Комбинация гепарина с VEGF также была использована при разработке стентов для лечения аневризм [40]. При этом металлический стент покрывали нановолокнами из PLCL, изготовленными методом эмульсионного электроспиннинга с инкорпорированием биоактивных молекул. Изучение функционирования имплантата с лекарственным покрытием на модели аневризмы подключичных артерий у кроликов выявило отделение купола аневризмы от тока крови и полную проходимость артерии. Кроме того, высвобождение гепарина и VEGF предотвращало адгезию тромбоцитов, тромбоз и гиперплазию неоинтимы в установленном стенте [40].

Похожие результаты имплантации при разработке стентов для лечения аневризм были показаны Liu и соавт., которые для создания антитромботического покрытия использовали гепарин с гипополидемическим препаратом розувастатином кальция [41]. Розувастатин относится к классу статинов и, кроме снижения уровня холестерина в крови, имеет свойство ингибировать пролиферацию гладкомышечных клеток кровеносных сосудов и активацию тромбоцитов, стимулировать эндотелизацию и подавлять реакцию воспаления. Покрытие, как и в предыдущем исследовании, изготавливали из нановолокон PLCL. Однако нановолокна получали коаксиальным электроспиннингом, в результате чего они имели в своей структуре полимерную оболочку и ядро, содержащее лекарственные препараты. Такой способ введения биоактивных веществ позволяет обеспечить их более пролонгированный выход из полимерных волокон по сравнению с эмульсионным электроспиннингом [41].

Также возможность применения гепарина с розувастатином была показана при создании покрытия для различных типов коммерческих стентов: кобальт-хромовый (Medtronic Hellas), нитиноловый Complete SE (Medtronic Hellas) и из нержавеющей стали Visi-Pro (Bard PV Hellas) [42]. Стенты покрывали двумя слоями нановолокон, полученных эмульсионным

электроспиннингом биodeградируемого ацетата целлюлозы. Первый слой состоял из полимерных волокон с розувастатином, второй слой содержал гепарин. Исследования продемонстрировали устойчивый выход лекарственных средств из покрытия в течение 4 нед, при этом в первые 8 дней происходил выход около 50% введённых препаратов [42].

Создание антитромботических покрытий актуально и для неметаллических стентов. Так, группой китайских учёных был разработан бесшовный бифуркационный тканый эндovasкулярный стент на основе PET и фиброина шёлка для реконструкции брюшного отдела аорты [43]. При этом поверхность стента модифицировали гепарином, так как, несмотря на свою высокую биосовместимость, фиброин шёлка, как и PET, не обладает достаточной тромборезистентностью. Гепарин конъюгировали с использованием реакционной смеси NHS/EDC после предварительного покрытия имплантата полиэтиленмином. Позже авторами был предложен вариант данного стента с тканной основой из PET, покрытой фиброином шёлка с введённым гепарином, для пролонгированной доставки лекарственного препарата в место установки имплантата [44].

Таким образом, несмотря на успешное применение в клинической практике эндovasкулярных стентов, в том числе и имеющих лекарственные покрытия, активно продолжают разработки наиболее эффективных способов их антитромботической модификации для снижения риска возможных осложнений у пациентов.

**Применение в клинической практике.** На сегодняшний день большая часть медицинских изделий с антитромботической модификацией, существующих на рынке, изготовлена с применением технологии CARMEDA BioActive Surface. Данная технология позволяет создавать покрытия с невысвобождающимся гепарином, иммобилизованным на поверхности имплантата [26].

Гепаринизированные по данной технологии PTFE-протезы сосудов Gore Propaten (W.L. Gore & Associates) демонстрировали проходимость, аналогичную аутологичным трансплантатами, при краткосрочных наблюдениях после проведения бедренно-подколенного шунтирования [45]. В свою очередь анализ 5-летней имплантации, проведённый Samson и соавт., показал достоверно лучшую проходимость модифицированных гепарином протезов PTFE (85,2%) в сравнении с PTFE без покрытия (53,9%) также при бедренно-подколенном шун-

тировании [46]. Кроме того, в недавнем многоцентровом ретроспективном исследовании долгосрочной имплантации 1401 протеза Gore Progratep установленная первичная проходимость имплантатов составила 67%, что лучше значений этого показателя для протезов PTFE, который по данным разных источников не превышает 35% [47].

Технологию CARMEDA BioActive Surface также использовали для модификации коронарных стентов гепарином до появления сосудистых имплантатов с покрытиями, обеспечивающими высвобождение антипролиферативных препаратов. Примером гепаринизированных стентов служит HEPASOAT (Cordis, Johnson & Johnson Interventional Systems), который демонстрировал положительные результаты по снижению адгезии тромбоцитов и уменьшению риска ранних тромбозов в экспериментальных исследованиях [26]. Однако в международном многоцентровом проспективном исследовании на 3098 пациентах различий по количеству тромбозов между гепарин-модифицированными и немодифицированными стентами установлено не было [48].

**Заключение.** Многочисленные исследования, приведённые в настоящем обзоре, демонстрируют широкий спектр способов модификации протезов кровеносных сосудов, тканеинженерных сосудистых графтов и эндоваскулярных стентов антитромботическими препаратами для увеличения их тромборезистентности. К основным подходам антитромботической модификации можно отнести конъюгирование лекарственных средств на поверхности имплантата и использование для создания покрытия биodeградируемых полимеров, выполняющих роль депо и обеспечивающих пролонгированную локальную доставку препаратов. При этом новые технологии направлены не только на ингибирование процесса тромбообразования, но также и на снижение интенсивности воспаления и стимуляцию восстановления сосудистой ткани. Совместное использование антитромботических агентов с биологически активными молекулами, участвующими в регуляции регенерации стенки сосуда, является основным вектором разработок эффективных сосудистых имплантатов.

**Участие авторов.** В.В.С., Е.О.К. — литературный поиск, анализ литературы, написание статьи, Л.В.А. — литературный поиск, анализ литературы, написание статьи, руководитель работы.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундамен-

тальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ №0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Pashneh-Tala S., MacNeil S., Claeysens F. The tissue-engineered vascular graft — past, present, and future. *Tissue Eng. Part. B. Rev.* 2016; 22 (1): 68–100. DOI: 10.1089/ten.teb.2015.0100.
2. Nakamura K., Keating J.H., Edelman E.R. Pathology of endovascular stents. *Interv. Cardiol. Clin.* 2016; 5 (3): 391–403. DOI: 10.1016/j.iccl.2016.02.006.
3. Hiob M.A., She S., Muiznieks L.D., Weiss A.S. Biomaterials and modifications in the development of small-diameter vascular grafts. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017; 3 (5): 712–723. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00220.
4. Shoji T., Shinoka T. Tissue engineered vascular grafts for pediatric cardiac surgery. *Transl. Pediatr.* 2018; 7 (2): 188–195. DOI: 10.21037/tp.2018.02.01.
5. Radke D., Jia W., Sharma D. et al. Tissue engineering at the blood-contacting surface: A review of challenges and strategies in vascular graft development. *Adv. Healthc. Mater.* 2018; 7 (15): 1701461. DOI: 10.1002/adhm.201701461.
6. Ren X., Feng Y., Guo J. et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem. Soc. Rev.* 2015; 44 (15): 5680–5742. DOI: 10.1039/c4cs00483c.
7. Maitz M.F., Martins M.C.L., Grabow N. et al. The blood compatibility challenge. Part 4: Surface modification for hemocompatible materials: Passive and active approaches to guide blood-material interactions. *Acta. Biomater.* 2019; 94: 33–43. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.06.019.
8. Linhardt R.J. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J. Med. Chem.* 2003; 19: 2551–2554. DOI: 10.1021/jm030176m.
9. Sasisekharan R., Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000; 4 (6): 626–631. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00145-9.
10. Linhardt R.J., Murugesan S., Xie J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Curr. Top. Med. Chem.* 2008; 8 (2): 80–100. DOI: 10.2174/156802608783378891.
11. Sakiyama-Elbert S.E. Incorporation of heparin into biomaterials. *Acta. Biomater.* 2014; 10 (4): 1581–1587. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.045.
12. Cannon C.P., Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J. Thromb. Thrombolysis.* 1995; 2 (2): 95–106. DOI: 10.1007/bf01064376.
13. Wallén N.H., Ladjevardi M., Albert J., Bröijersén A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb. Res.* 1997; 87 (1): 151–157. DOI: 10.1016/s0049-3848(97)00114-x.
14. Aronson J.K. *Side effects of drugs annual 26: A world-wide yearly survey of new data and trends in adverse drug reactions.* Elsevier. 2003; 662 p.

15. Hogg K., Weitz J.I. Blood coagulation and anticoagulant, fibrinolytic, and antiplatelet drugs. In: *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 13th ed. New York: McGraw-Hill. 2017; 849–876.
16. Willard J.E., Lange R.A., Hillis L.D. The use of aspirin in ischemic heart disease. *New Engl. J. Med.* 1992; 327 (3): 175–181. DOI: 10.1056/NEJM199207163270308.
17. Topaz O. *Cardiovascular thrombus: From pathology and clinical presentations to imaging, pharmacotherapy and interventions*. Academic Press. 2018; 670 p.
18. Grant S.M., Goa K.L. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs*. 1992; 43 (6): 889–924. DOI: 10.2165/00003495-199243060-00008.
19. Shapiro J.R. Transient migratory osteoporosis in osteogenesis imperfecta. In: *Osteogenesis Imperfecta*. Academic Press. 2014; 359–370. DOI: 10.1016/B978-0-12-397165-4.00039-3.
20. Lin P.H., Bush R.L., Yao Q. et al. Evaluation of platelet deposition and neointimal hyperplasia of heparin-coated small-caliber ePTFE grafts in a canine femoral artery bypass model. *J. Surg. Res.* 2004; 118 (1): 45–52. DOI: 10.1016/j.jss.2003.12.026.
21. Freeman J., Chen A., Weinberg R.J. et al. Sustained thromboresistant bioactivity with reduced intimal hyperplasia of heparin-bonded polytetrafluoroethylene propaten graft in a chronic canine femoral artery bypass model. *Ann. Vasc. Surg.* 2018; 49: 295–303. DOI: 10.1016/j.avsg.2017.09.017.
22. Al Meslmani B., Mahmoud G., Strehlow B. et al. Development of thrombus-resistant and cell compatible crimped polyethylene terephthalate cardiovascular grafts using surface co-immobilized heparin and collagen. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2014; 43: 538–546. DOI: 10.1016/j.msec.2014.07.059.
23. Zhu A.P., Ming Z., Jian S. Blood compatibility of chitosan/heparin complex surface modified ePTFE vascular graft. *Applied Surf. Sci.* 2005; 241 (3–4): 485–492. DOI: 10.1016/j.apsusc.2004.07.055.
24. Greco R.S., Kim H.C., Donetz A.P., Harvey R.A. Patency of a small vessel prosthesis bonded to tissue plasminogen activator and iloprost. *Ann. Vasc. Surg.* 1995; 9 (2): 140–145. DOI: 10.1007/BF02139655.
25. Heise M., Schmidmaier G., Husmann I. et al. PEG-hirudin/iloprost coating of small diameter ePTFE grafts effectively prevents pseudointima and intimal hyperplasia development. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2006; 32 (4): 418–424. DOI: 10.1016/j.ejvs.2006.03.002.
26. Biran R., Pond D. Heparin coatings for improving blood compatibility of medical devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017; 112: 12–23. DOI: 10.1016/j.addr.2016.12.002.
27. Duan H.Y., Ye L., Wu X. et al. The *in vivo* characterization of electrospun heparin-bonded polycaprolactone in small-diameter vascular reconstruction. *Vascular.* 2015; 23 (4): 358–365. DOI: 10.1177/1708538114550737.
28. Norouzi S.K., Shamloo A. Bilayered heparinized vascular graft fabricated by combining electrospinning and freeze drying methods. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2019; 94: 1067–1076. DOI: 10.1016/j.msec.2018.10.016.
29. Yao Y., Wang J., Cui Y. et al. Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. *Acta. Biomater.* 2014; 10 (6): 2739–2749. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.042.
30. Aslani S., Kabiri M., Kehtari M., Hanaee-Ahvaz H. Vascular tissue engineering: Fabrication and characterization of acetylsalicylic acid-loaded electrospun scaffolds coated with amniotic membrane lysate. *J. Cell Physiol.* 2019; 234 (9): 16080–1609. DOI: 10.1002/jcp.28266.
31. Gao J., Jiang L., Liang Q. et al. The grafts modified by heparinization and catalytic nitric oxide generation used for vascular implantation in rats. *Regen. Biomater.* 2018; 5 (2): 105–114. DOI: 10.1093/rb/rby003.
32. Hu Y.T., Pan X.D., Zheng J. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a small-caliber coaxial electrospun vascular graft loaded with heparin and VEGF. *Int. J. Surg.* 2017; 44: 244–249. DOI: 10.1016/j.ijsu.2017.06.077.
33. Wang W., Liu D., Li D. et al. Nanofibrous vascular scaffold prepared from miscible polymer blend with heparin/stromal cell-derived factor-1 alpha for enhancing anticoagulation and endothelialization. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2019; 181: 963–972. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.065.
34. Kuang H., Yang S., Wang Y. et al. Electrospun bilayer composite vascular graft with an inner layer modified by polyethylene glycol and heparin to regenerate the blood vessel. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2019; 15 (1): 77–84. DOI: 10.1166/jbn.2019.2666.
35. Mori H., Gupta A., Torii S. et al. Clinical implications of blood-material interaction and drug eluting stent polymers in review. *Expert Rev. Med. Devices.* 2017; 14 (9): 707–716. DOI: 10.1080/17434440.2017.1363646.
36. Van der Giessen W.J., Lincoff A.M., Schwartz R.S. et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996; 94: 1690–1697. DOI: 10.1161/01.cir.94.7.1690.
37. Alt E., Haehnel I., Beilharz C. et al. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation.* 2000; 101 (12): 1453–1458. DOI: 10.1161/01.cir.101.12.1453.
38. Lee C.H., Lin Y., Cjhang S. et al. Local sustained delivery of acetylsalicylic acid via hybrid stent with biodegradable nanofibers reduces adhesion of blood cells and promotes reendothelialization of the denuded artery. *Int. J. Nanomedicine.* 2014; 9: 311–326. DOI: 10.2147/IJN.S51258.
39. Choi D.H., Kang S.N., Kim S.M. et al. Growth factors-loaded stents modified with hyaluronic acid and heparin for induction of rapid and tight re-endothelialization. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2016; 141: 602–610. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.028.
40. Wang J., An Q., Li D. et al. Heparin and vascular endothelial growth factor loaded poly (L-lactide-co-caprolactone) nanofiber covered stent-graft for aneurysm treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015; 11 (11): 1947–1960. DOI: 10.1166/jbn.2015.2138.
41. Liu P., Liu Y., Li P. et al. Rosuvastatin and heparin-loaded poly (l-lactide-co-caprolactone) nanofiber aneurysm stent promotes endothelialization via vascular endothelial growth factor type A modulation. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018; 10 (48): 41012–41018. DOI: 10.1021/acsami.8b11714.
42. Janjic M., Pappa F., Karagkiozaki V. et al. Surface modification of endovascular stents with rosuvastatin and heparin-loaded biodegradable nanofibers by electrospinning. *Int. J. Nanomedicine.* 2017; 12: 6343–6355. DOI: 10.2147/IJN.S138261.
43. Liu Z., Li G., Zheng Z. et al. Silk fibroin-based woven endovascular prosthesis with heparin surface modification. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018; 29 (4): 46. DOI: 10.1007/s10856-018-6055-3.

44. Liu Z., Zheng Z., Chen K. et al. A heparin-functionalized woven stent graft for endovascular exclusion. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2019; 180: 118–126. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.027.

45. Daenens K., Schepers S., Fourneau I. et al. Heparin-bonded ePTFE grafts compared with vein grafts in femoropopliteal and femorocrural bypasses: 1- and 2-year results. *J. Vasc. Surg.* 2009; 49 (5): 1210–1216. DOI: 10.1016/j.jvs.2008.12.009.

46. Samson R.H., Morales R., Showalter D.P. et al. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene femoropopliteal bypass grafts outperform expanded polytetrafluoroethylene

grafts without heparin in a long-term comparison. *J. Vasc. Surg.* 2016; 64 (3): 638–647. DOI: 10.1016/j.jvs.2016.03.414.

47. Piffaretti G., Dorigo W., Castelli P. et al. Results from a multicenter registry of heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene graft for above-the-knee femoropopliteal bypass. *J. Vasc. Surg.* 2018; 67 (5): 1463–1471. DOI: 10.1016/j.jvs.2017.09.017.

48. Mehran R., Nikolsky E., Camenzind E. et al. An Internet-based registry examining the efficacy of heparin coating in patients undergoing coronary stent implantation. *Am. Heart J.* 2005; 150 (6): 1171–1176. DOI: 10.1016/j.ahj.2005.01.027.