

Модификация поливиниловым спиртом эпоксипроцессованного ксеноперикарда повышает его резистентность к кальцификации in vitro

А.Е. Костюнин[✉], М.А. Резцова, Т.В. Глушкова, Д.К. Шишкова,
А.Г. Кутихин, Т.Н. Аментьева, Е.А. Овчаренко
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний»,
650002, Россия, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6

[✉]Автор, ответственный за переписку: Александр Евгеньевич Костюнин, канд. биол. наук, научный сотрудник
лаборатории новых биоматериалов НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
rhabdophis_tigrina@mail.ru

Аннотация

Актуальность. До половины имплантируемых реципиентам биологических протезов клапанов сердца подвержены развитию дисфункций через 15 лет функционирования. Основной причиной несостоятельности биологических протезов является структурная дегенерация, обусловленная кальцификацией створчатого аппарата. Таким образом, особую актуальность для увеличения долговечности биологических протезов приобретает защита биоматериала от кальцификации.

Цель. Разработать модификацию биоматериала поливиниловым спиртом для повышения резистентности биологических протезов к кальцификации.

Материал и методы. Фрагменты эпиксипроцессованного бычьего перикарда инкубировали в водных растворах с разной концентрацией (5, 10, 12 и 15%) поливинилового спирта и подвергали криообработке для формирования геля. Поверхность модифицированного поливиниловым спиртом биоматериала изучали методом сканирующей электронной микроскопии, внутреннюю структуру – посредством флуоресцентной микроскопии и методом сканирующей электронной микроскопии. Механические свойства модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда оценивали одноосным растяжением. Для оценки гемосовместимых свойств определяли степень гемолиза, агрегации и адгезии тромбоцитов после контакта донорской крови с образцами. Резистентность модифицированного поливинилового спиртом биоматериала к кальцификации оценивали путем инкубации образцов в насыщенном ионами кальция (10 ммоль) и фосфат-ионами растворе в течение 3 и 6 недель с последующим количественным определением содержания кальция в биоткани спектрофотометрическим методом. В качестве группы контроля при проведении вышеперечисленных тестов использовали немодифицированный эпиксипроцессованный бычий перикард.

Результаты. При модификации эпиксипроцессованного ксеноперикарда поливиниловым спиртом получен композитный материал, представляющий собой матрицу коллагеновых волокон, заполненную гелем. Оптимальный результат, подразумевающий полное закрытие гелем пор на поверхности ксеноперикарда и равномерное заполнение межфибриллярного пространства в его толще, достигнуто при использовании 12% раствора поливинилового спирта. Модификация не ухудшила механические и гемосовместимые свойства эпиксипроцессованного ксеноперикарда. После 3 и 6 недель инкубации в насыщенном кальцием растворе модифицированные поливиниловым спиртом образцы содержали соответственно в 5 и 3 раза меньше кальция по сравнению с образцами в контрольной группе.

Выводы. Предложенный способ обработки ксеноперикарда поливиниловым спиртом повышает его устойчивость к кальцификации и может быть взят за основу при разработке новой модификации биологического компонента биологических протезов.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца, бычий перикард, криотропное гелеобразование, поливиниловый спирт, кальцификация

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 21-75-10107)

Для цитирования: Костюнин А.Е., Резцова М.А., Глушкова Т.В., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г., Аментьева Т.Н. и др. Модификация поливиниловым спиртом эпиксипроцессованного ксеноперикарда повышает его резистентность к кальцификации in vitro. Трансплантология. 2023;15(1):34–45. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45>

Polyvinyl alcohol improves resistance of epoxy-treated bovine pericardium to calcification in vitro

A.E. Kostyunin✉, M.A. Rezvova, T.V. Glushkova, D.K. Shishkova,
A.G. Kutikhin, T.N. Akentyeva, E.A. Ovcharenko

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6 Sosnovy Blvd., Kemerovo 650002 Russia

✉Corresponding author: Alexander E. Kostyunin, Cand. Sci. (Biol.), Research Fellow, Laboratory for Novel Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, rhabdophis_tigrina@mail.ru

Abstract

Background. Around half of bioprosthetic heart valves become dysfunctional 15 years postimplantation because of structural valve deterioration notable for the degradation and calcification of the prosthetic tissue. Protection of bioprosthetic heart valves from structural valve deterioration requires innovative materials, science approaches including enveloping of the bioprosthetic heart valves into the polymer sheath.

Aim. To develop a polyvinyl alcohol sheath for improving resistance of bioprosthetic heart valves to calcification.

Material and methods. Bovine pericardium fixed with ethylene glycol diglycidyl ether was incubated with distinct concentrations of polyvinyl alcohol (5, 10, 12, or 15%) with the following freezing and thawing to perform cryotropic gelation. Surface and structure of unmodified and polyvinyl alcohol-modified bovine pericardium have been investigated by fluorescence microscopy and scanning electron microscopy, whilst tensile testing was carried out by uniaxial tension test. Haemocompatibility was assessed through the measurements of haemolysis and platelet aggregation/adhesion upon the contact of donor blood with the samples. Resistance to calcification was tested by incubation of the samples in calcium and phosphate supersaturated (10 $\mu\text{mol/L}$) cell culture medium for 3 and 6 weeks with the following tissue lysis and colorimetric measurement of Ca^{2+} ions.

Results. Using cryotropic gelation, we obtained a polyvinyl alcohol-coated and filled bovine pericardium matrix. Out of all polyvinyl alcohol concentrations, 12% polyvinyl alcohol solution sealed pores and hollows within the bovine pericardium (what was not achieved using 5% or 10% polyvinyl alcohol solutions) and demonstrated the best processability as compared to 15% polyvinyl alcohol solution. Cryotropic gelation did not deteriorate durability, elasticity, or haemocompatibility of bovine pericardium. After 3 and 6 weeks of the incubation in calcium-supersaturated solution, polyvinyl alcohol-modified bovine pericardium contained 5- and 3-fold reduced amount of calcium compared to unmodified bovine pericardium.

Conclusions. Enveloping of bovine pericardium into polyvinyl alcohol increases its calcification resistance, retains its tensile properties and haemocompatibility, and can be considered as a promising approach for the modification of bovine pericardium during the manufacturing of bioprosthetic heart valves.

Keywords: bioprosthetic heart valves, bovine pericardium, cryotropic gelation, polyvinyl alcohol, calcification

CONFLICT OF INTERESTS Authors declare no conflict of interest

FINANCING The study was funded by the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10107)

For citation: Kostyunin AE, Rezvova MA, Glushkova TV, Shishkova DK, Kutikhin AG, Akentyeva TN, et al. Polyvinyl alcohol improves resistance of epoxy-treated bovine pericardium to calcification in vitro. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2023;15(1):34–45. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45>

БП – биологические протезы
ИОТП – интактная обогащенная тромбоцитами плазма
МП – ксеноперикард, модифицированный поливинило-
вым спиртом
НП – немодифицированный ксеноперикард

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма
ПВС – поливиниловый спирт
ППС – приобретенные пороки сердца
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ФМ – флуоресцентная микроскопия

Актуальность

Приобретенные пороки сердца (ППС) являются одной из основных причин снижения трудоспособности, качества и продолжительности жизни, особенно в пожилом возрасте [1]. В каче-

стве радикального метода лечения ППС выступает протезирование пораженных клапанов сердца механическими и биологическими протезами (БП) [2]. Последние выгодно отличаются от механических аналогов низкой тромбогенностью, освобождая реципиентов от необходимости в пожизнен-

ном приеме антикоагулянтов [3]. В то же время до половины БП подвержены развитию дисфункций через 15 лет функционирования из-за структурной дегенерации их биологического компонента [4, 5]. Эта особенность ограничивает возможность применения БП при хирургической коррекции ППС, в частности у пациентов моложе 65 лет, чья ожидаемая продолжительность жизни превышает среднюю долговечность БП [2].

Результаты современных исследований демонстрируют, что важную роль в развитии структурной дегенерации играет имбиция в биоматериал БП различных веществ, циркулирующих в крови реципиентов [6]. В частности, поступление в БП ионов кальция, кальций-связывающих белков и протеаз ведет к обызвествлению и разрывам створчатого аппарата [6]. Соответственно перспективным направлением в поиске способа увеличить долговечность БП становится разработка модификации, предотвращающей аккумуляцию в биоматериале ионов кальция и химически агрессивных соединений.

Решением заявленной проблемы могут стать инновационные методы обработки биоткани, основанные на заполнении ее внутренней структуры гелями полимеров [7]. Гели формируют физическую преграду, препятствующую поступлению в межфибрилярное пространство биоматериала растворенных в крови веществ, а также их взаимодействию с коллагеновыми волокнами [7].

Цель. Целью исследования стала разработка оригинальной модификации поливиниловым спиртом (ПВС) используемого в производстве БП ксеноперикарда для его защиты от кальцификации. В ходе реализации цели мы применили метод криотропного гелеобразования ПВС с последующей оценкой внутренней и поверхностной структуры модифицированного биоматериала, а также его механических, гемосовместимых и антикальциевых свойств.

Материал и методы

Модифицируемый биоматериал и модифицирующий агент

В качестве материала для модификации использовали перикардальные лоскуты «КемПерипласНео» (КРi7080М, ЗАО «НеоКор») толщиной 0,6–0,7 мм. Данный вид биоматериала применяют в производстве ксеноперикардальных БП, клинически используемых в Российской Федерации [8]. Немодифицированные

перикардальные лоскуты выступали в качестве контрольных.

В качестве модифицирующего агента использован линейный ПВС с молекулярной массой 89–98 кДа и степенью гидролиза ацетатных групп более 99% (341584, Sigma Aldrich). К важнейшим преимуществам гелей на основе ПВС, которые обусловили выбор конкретного полимера для реализации цели исследования, относятся их стабильность в воде и биологических жидкостях, сопоставимость с биологическими тканями по жесткостным характеристикам, нетоксичность для клеток и резистентность к неспецифической адсорбции белков [9–11].

Модификация ксеноперикарда поливиниловым спиртом

Цель обработки ксеноперикарда ПВС состояла в получении композитного материала: мы ожидали образования геля, который сформирует пленку на поверхности биоматериала и заполнит межфибрилярное пространство в его толще. При этом для формирования геля и его связывания с коллагеновой матрицей биоткани применяли метод криотропного гелеобразования ПВС.

Для подбора оптимальных условий модификации ксеноперикарда было подготовлено четыре вида модифицирующих водных растворов, различающихся концентрацией в них ПВС (5, 10, 12 и 15%). Приготовление растворов выполняли перед началом модификации, для чего брали навеску ПВС, которую добавляли в дистиллированную воду при нагревании до 95°C и постоянном перемешивании до получения однородного прозрачного раствора.

Лоскуты ксеноперикарда (из расчета 1 см² биоматериала на 1 мл жидкости) выдерживали в охлажденных до комнатной температуры растворах в течение 24 часов при постоянном перемешивании для их эффективного пропитывания ПВС. Далее образцы извлекали из растворов и замораживали при -40°C в течение 24 часов, после чего инкубировали по 12 часов сначала при -5°C, затем при 5°C для формирования ПВС-геля. Наконец, образцы оставляли на 30 минут при комнатной температуре.

Полученные образцы модифицированного биоматериала в течение суток отмывали от остатков ПВС в физиологическом растворе и готовили для тестирования.

Исследование поверхностной микроструктуры биоматериала

Изучение структуры поверхности биоматериала осуществляли методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого готовили по 3 фрагмента модифицированного и контрольного ксеноперикарда площадью 1 см², которые сутки лиофилизировали в установке FreeZone 2.5 Plus (Labconco) при температуре -40°C и давлении менее 0,04 мбар. Затем образцы монтировали на столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее (Au-Pd) покрытие, используя систему ЕМ АСЕ200 (Leica Microsystems). Анализ биоматериала проводили на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Исследование внутренней микроструктуры биоматериала

Для изучения внутренней структуры ПВС-модифицированных образцов применяли методы СЭМ и флуоресцентной микроскопии (ФМ). С этой целью на криотоме Microm HM 525 (Thermo Scientific) из фрагментов ксеноперикарда площадью 1 см² готовили криосрезы толщиной 14 и 6 мкм (для выполнения СЭМ и ФМ соответственно), размещая их на предметные стекла.

При пробоподготовке к СЭМ стекла с нанесенными на них срезами 2 часа отмывали в бидистиллированной воде и выполняли процедуры, описанные в предыдущем разделе (лиофилизация, монтирование, напыление и визуализация СЭМ).

Для дополнительного подтверждения присутствия ПВС в толще перикарда применяли метод ФМ, предварительно окрасив срезы гематоксилином Майера и эозином по стандартной методике. Для визуализации использовали микроскоп AxioImager.A1 (Carl Zeiss) и программу для обработки изображений AxioVision (Carl Zeiss).

Оценки механических свойств биоматериала

Механические свойства образцов оценивали посредством одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75. Для теста на вырубном прессе ZCP 020 (Zwick GmbH & Co. KG) готовили по 10 фрагментов модифицированного и контрольного ксеноперикарда, используя специальный нож (B083, соответствующий стандарту ISO 37). Тестирование проводили на испытательной машине «Zwick/Roell» (Zwick GmbH &

Co. KG) с датчиком с номинальной силой 50 Н. Предел прочности образцов оценивали по максимальному напряжению при растяжении с учетом площади поперечного сечения рабочего сегмента, упруго-деформативные свойства – по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов, и модулю Юнга, определяемому в диапазонах малых деформаций.

Оценка гемосовместимости биоматериала

В соответствии с требованиями к медицинским изделиям, контактирующим с кровью (ГОСТ Р ИСО 10993.4), мы оценили степень агрегации и адгезии тромбоцитов, а также степень гемолиза после контакта крови с ПВС-модифицированным ксеноперикардом. Забор крови для всех экспериментов производили у одного условно здорового добровольца в пробирки Improvacuter, содержащие забуференный раствор цитрата натрия (9NC 0,129M). Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали из свежей цитратной крови путем ее центрифугирования в течение 10 минут при 1200 об/мин.

Агрегацию тромбоцитов оценивали на полуавтоматическом 4-канальном анализаторе АРАСТ 4004 (LABiТес). Для калибровки прибора использовали бедную тромбоцитами плазму, полученную благодаря центрифугированию цитратной крови в течение 15 минут при 3000 об/мин. Длительность контакта образцов модифицированного и контрольного ксеноперикарда (по 7 на группу) площадью 0,25 см² с 250 мкл ОТП до измерения составила 3 минуты, после чего в последнюю добавляли индуктор агрегации тромбоцитов – 5-дифосфат (АГ-6, АГРЕНАМ) в концентрации 20 мкмоль/л. В качестве контроля использовали интактную ОТП (ИОТП). Интенсивность агрегации через 5 минут измерения выражали значениями максимального процента агрегации, срока до начала агрегации после добавления индуктора, угла наклона кинетической кривой агрегации и срока достижения максимального процента агрегации.

Для оценки степени адгезии и трансформации тромбоцитов брали по 3 образца модифицированного и контрольного ксеноперикарда площадью 0,25 см², которые инкубировали в течение часа при 37°C в 300 мкл ОТП. Далее с целью удаления неадгезированных компонентов ОТП их трижды отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,4) с последующей фиксацией в 2% глутаральдегиде в течение ночи. Затем образцы отмывали

вали в дистиллированной воде и подготавливали к СЭМ по ранее описанной методике.

Для оценки степени гемолиза эритроцитов по 5 образцов модифицированного и контрольного ксеноперикарда площадью 5 см² помещали в бюксы, добавляли по 10 мл физиологического раствора и ставили в термостат при 37°C на 2 часа. В качестве отрицательного и положительного контролей были использованы физиологический раствор и дистиллированная вода соответственно. После инкубации в каждый бюкс добавляли по 200 мкл свежей цитратной крови и вновь выдерживали в термостате при 37°C в течение часа. После инкубации отбирали растворы из бюксов в пластиковые пробирки и центрифугировали их в течение 10 минут при 2800 об/мин для осаждения эритроцитов. Измерение оптической плотности полученных растворов проводили при длине волны 545 нм на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo Scientific). Степень гемолиза определяли по формуле $(Dt - Dne) / (Dpe - Dne) \times 100\%$, где Dt – оптическая плотность пробы, инкубируемой с образцом, Dne – оптическая плотность пробы, добавленной в физиологический раствор, Dpe – оптическая плотность пробы после полного гемолиза. За отсутствие гемолиза принимали среднее арифметическое значение оптической плотности при измерении физиологического раствора с цитратной кровью, за полный гемолиз – среднее арифметическое значение оптической плотности при измерении дистиллированной воды с цитратной кровью.

Оценка подверженности биоматериала кальцификации

С целью изучения подверженности модифицированного и контрольного ксеноперикарда кальцификации соответствующие образцы инкубировали в растворе, имитирующем физиологическую среду организма с повышенным уровнем ионов кальция и фосфатов. Так, по 10 фрагментов биоматериала каждой группы площадью 0,25 см² помещали индивидуально в 2 мл раствора, содержащего 10 ммоль кальция, где инкубировали 3 и 6 недель при 37°C в углекислотном инкубаторе. Для приготовления раствора использовали 1,655 мл стерильной питательной среды для выращивания клеточных культур (D0697, Sigma-Aldrich), 0,20 мл эмбриональной бычьей сыворотки (F2442, Sigma-Aldrich, США), 0,05 мл кальция хлорида и 0,1 мл моногидрофосфата натрия.

Количественное содержание кальция в исследуемых образцах определяли спектрофотомет-

рическим методом. Для этого фрагменты биоматериала сутки лиофилизировали и измеряли их массу. После образцы подвергали гидролизу в 0,5 мл 65% хлорной кислоты на песочной бане (150–180°C) до полного растворения. Объем полученной смеси доводили до 5 мл стерильной водой для инъекций. Содержание кальция в растворе определяли на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 575 нм с использованием коммерческого набора Calcium Assay Kit (ab102505, Abcam) согласно протоколу производителя.

Для оценки характера локализации микрокальцификатов подготавливали криосрезы толщиной 6 мкм, используя по 2 образца от каждой исследуемой группы. Затем криосрезы окрашивали ализариновым красным С по стандартной методике и изучали посредством световой микроскопии на микроскопе Axiomager.A1 (Carl Zeiss).

Статистический анализ

Статистическая обработка данных, полученных в ходе вышеописанных экспериментов, выполнена в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Тип распределения данных определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение в группах было отличным от нормального, данные представлены в виде медианы, процентилей, минимальных и максимальных значений. Межгрупповое сравнение проводили с применением критерия Краскела–Уоллиса с поправкой на множественное сравнение (FDR), межгрупповые различия считали статистически значимыми при максимально допустимой вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу ($p < 0,05$).

Результаты

Микроструктура и механические свойства модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда

Поверхность немодифицированного эпоксиобработанного ксеноперикарда имела типичную для перикарда структуру: гладкая серозная поверхность состояла из плотно упакованных коллагеновых волокон с порами диаметром от 200 нм до 15 мкм, тогда как фиброзная – из рыхло расположенных коллагеновых волокон (рис. 1). Внутренняя структура немодифицированного ксеноперикарда была неплотной, с крупными полостями между волокнами (рис. 2).

В свою очередь на поверхности ПВС-модифицированного биоматериала присутствовал гель, формирующий рыхлое частичное (при использовании раствора ПВС в концентрации 5%) или плотное монолитное (при использовании растворов ПВС в концентрации 10% и выше) покрытие с ячеистой структурой (рис. 1). Внутренняя структура ПВС-модифицированного ксеноперикарда демонстрировала тенденцию к более плотному заполнению межфибриллярного пространства гелем при увеличении концентрации полимера от 5 до 12% (рис. 2). Различий между образцами биоткани, обработанными 12 и 15% растворами ПВС, по этому параметру нами не выявлено.

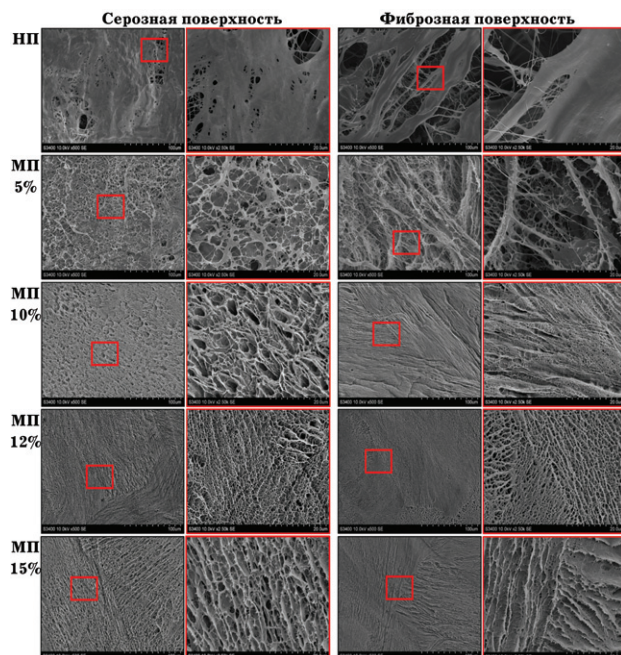


Рис. 1. Электронная микроскопия поверхности изученных образцов. НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом. В процентах указана концентрация поливинилового спирта, использованная при модификации

Fig. 1. Electron microscopy examination of the surface of unmodified (UP, top row) and polyvinyl alcohol-modified (MP, other rows) bovine pericardium. 5%, 10%, 12%, and 15% are concentrations of polyvinyl alcohol

Результаты тестирования механических свойств продемонстрировали, что по напряжению, степени удлинения и модулю Юнга ПВС-модифицированные образцы ксеноперикарда не имеют статистически значимых отличий от контрольных образцов и между собой вне зависи-

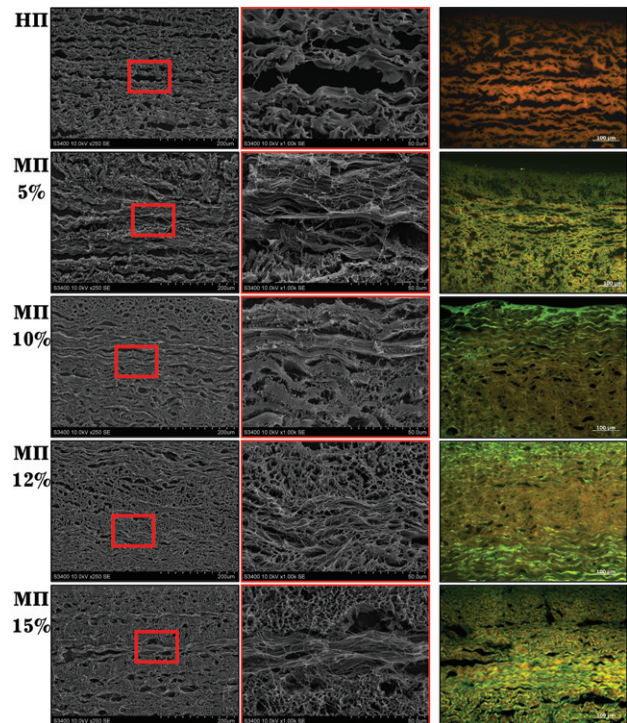


Рис. 2. Электронная микроскопия срезов изученных образцов (две колонки слева). Изображения в колонке справа подтверждают присутствие геля (зеленое свечение) среди волокон ксеноперикарда (красное свечение) посредством флуоресценции (окрашивание гематоксилином и эозином). НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом. В процентах указана концентрация поливинилового спирта, использованная при модификации

Fig. 2. Structure of unmodified (UP, top row) and polyvinyl alcohol-modified (MP, other rows) bovine pericardium. Images in the right column confirm the successful cryotropic gelation (green colour) within the collagen fibers (orange colour) at haematoxylin and eosin staining and subsequent fluorescence microscopy. 5%, 10%, 12%, and 15% are concentrations of polyvinyl alcohol

мости от концентрации модифицирующего агента ($p > 0,05$) (рис. 3).

С учетом полученных результатов для дальнейших испытаний гемосовместимых и антикальциевых свойств в качестве оптимальной выбрана модификация в 12% растворе ПВС. При использовании менее концентрированных растворов ПВС нам не удалось добиться полного и равномерного заполнения гелем межфибриллярного пространства ксеноперикарда, тогда как применение 15% раствора ПВС не демонстрировало дополнительных преимуществ, приводя к избыточному расходованию модифицирующего агента.

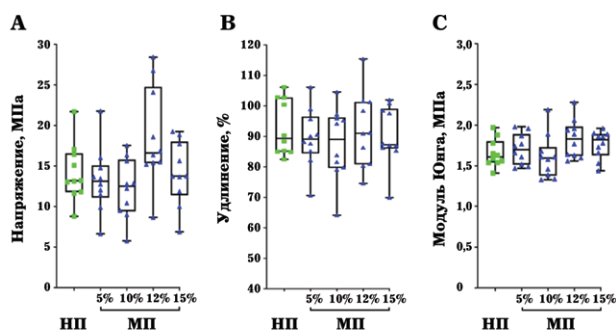


Рис. 3. Механические свойства изученных образцов ксеноперикарда: А – напряжение (предел прочности), В – относительное удлинение, С – модуль Юнга. НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом. В процентах указана концентрация поливинилового спирта, использованная при модификации

Fig. 3. Tensile properties of unmodified (UP, left) and polyvinyl alcohol-modified (MP, right) bovine pericardium. A – durability (ultimate tensile strength, MPa), B – tensile elongation at break (%), C – tensile elasticity (elastic modulus, MPa). 5%, 10%, 12%, and 15% are concentrations of polyvinyl alcohol

Гемосовместимые свойства модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда

Не выявлено статистически значимых различий в максимальном проценте агрегации между ИОТП и инкубируемой с контрольными и модифицированными фрагментами ксеноперикарда ($p > 0,05$) (рис. 4). Агрегация начиналась раньше в ОТП, контактировавшей с контрольными образцами, нежели в ИОТП или инкубированной с ПВС-модифицированным ксеноперикардом ($p = 0,002$ и $p = 0,01$ соответственно, статистически значимо в обоих случаях). При этом данная группа характеризовалась более низкой скоростью формирования тромбоцитарных агрегатов, о чем свидетельствует меньший угол наклона кривой агрегации по сравнению с ИОТП и контактировавшей с ПВС-модифицированным биоматериалом ($p = 0,001$ и $p = 0,002$ соответственно, статистически значимо в обоих случаях). В конечном итоге, несмотря на различия в скорости агрегации, сроки достижения максимального процента агрегации между всеми образцами оказались одинаковыми ($p > 0,05$). Таким образом, нами выявлены несущественные различия гемосовместимых свойств между контрольными и модифицированными образцами, затрагивающие кинетику агрегации. Они не позволяют говорить об ухудшении гемосовместимости ксеноперикарда при его модификации ПВС.

При изучении адгезии тромбоцитов на поверхности ксеноперикарда в контрольной группе отмечены многочисленные тромбоциты 2–3-й степени активации, количественно преобладавшие на фиброзной поверхности. На ПВС-модифицированном ксеноперикарде тромбоциты не обнаружены (рис. 5).

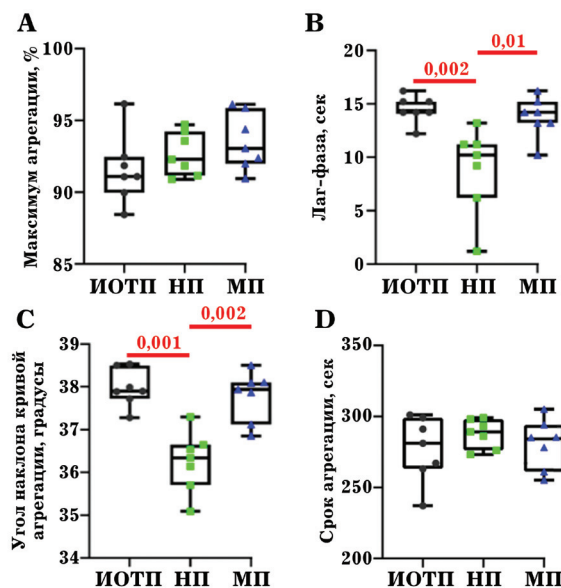


Рис. 4. Характеристика гемосовместимости исследуемых образцов: А – максимальный процент агрегации; В – срок до начала агрегации после добавления индуктора агрегации; С – угол наклона кривой агрегации; D – срок достижения максимального процента агрегации. ИОТП – интактная обогащенная тромбоцитами плазма, НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом

Fig. 4. Haemocompatibility of intact platelet-rich plasma (IPRP, left), unmodified (UP, center) and polyvinyl alcohol-modified (MP, right) bovine pericardium. A – maximum aggregation percent; B – lag phase (time to the beginning of the aggregation curve, seconds); C – maximum slope of the aggregation curve (degrees); D – time to the maximum aggregation (seconds)

Результаты, полученные в ходе анализа гемолиза при контакте крови с исследуемыми биоматериалами, свидетельствуют о том, что и контрольный, и ПВС-модифицированный ксеноперикард не оказывают существенного влияния на лизис эритроцитов. Показатели гемолиза для обоих видов биоматериалов составили менее 1% (данные не показаны).

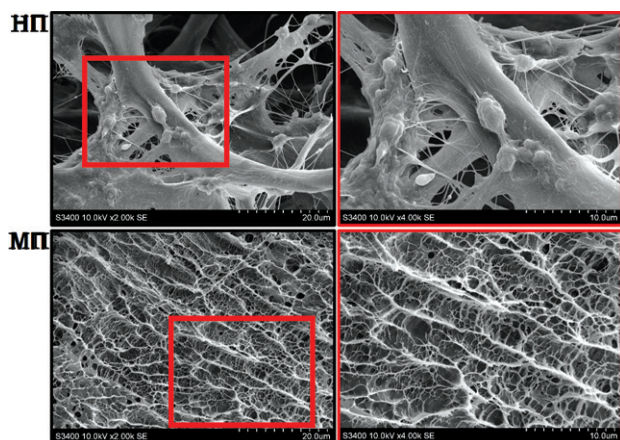


Рис. 5. Адгезия тромбоцитов на поверхности исследуемых образцов. Обратите внимание на отсутствие адгезировавшихся тромбоцитов на поверхности модифицированного ксеноперикарда. НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом

Fig. 5. Electron microscopy examination of platelet adhesion at unmodified (UP, center) and polyvinyl alcohol-modified (MP, right) bovine pericardium. Note the absence of platelets at the surface of polyvinyl alcohol-modified pericardium

Устойчивость модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда к кальцификации

Содержание кальция в ПВС-модифицированных образцах после 3 и 6 недель инкубации в насыщенном ионами кальция и фосфат-ионами растворе составило в среднем 1,52 и 6,89 мг/г сухой ткани соответственно (рис. 6). Для образцов немодифицированного (контрольного) ксеноперикарда – 8,22 и 23,07 мг/г. Таким образом, образцы ПВС-модифицированного ксеноперикарда содержали статистически значимо меньше кальция по сравнению с контрольными при инкубации в течение 3, и 6 недель ($p=0,0001$ и $p=0,0004$ соответственно).

Изучение паттернов локализации кальцификатов в образцах показало, что в немодифицированном ксеноперикарде кальцификация может быть визуализирована уже через 3 недели инкубации, при этом микрокальцификаты формировались преимущественно в поверхностных слоях биоматериала вдоль коллагеновых волокон (рис. 6). Через 6 недель инкубации микрокальцификация распространилась на всю толщину контрольных образцов. В свою очередь присутствия кальция в ПВС-модифицированном ксеноперикарде после 3 недель инкубации методом световой микроскопии выявить не удалось,

однако микрокальцификация зафиксирована через 6 недель инкубации. Следует отметить, что микрокальцификаты локализовались преимущественно вблизи края биоткани, рассеченного при подготовке фрагментов для тестирования. Таким образом, полученные данные указывают на превосходные изолирующие свойства ПВС-геля, сформированного в биоматериале.

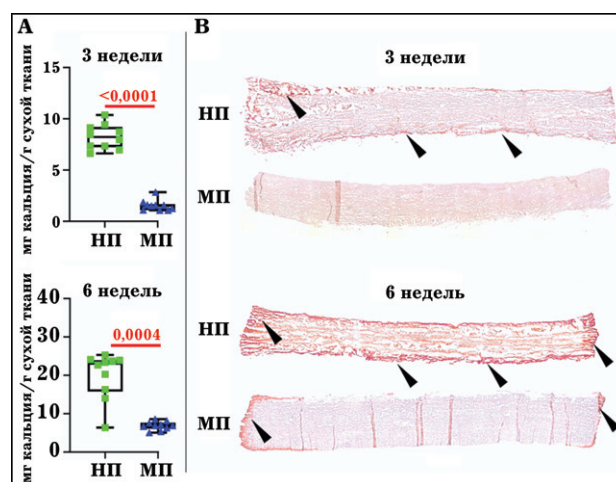


Рис. 6. Степень кальцификации изученных образцов. А – результаты количественного определения содержания кальция в образцах, В – визуализация паттернов кальцификации изученных образцов (окрашивание ализариновым красным С). Стрелками отмечены области с наибольшей кальцификацией. НП – немодифицированный ксеноперикард (контроль), МП – ксеноперикард, модифицированный поливиниловым спиртом

Fig. 6. Assessment of calcification of unmodified (UP) and polyvinyl alcohol-modified (MP) bovine pericardium. A – calcium measurement upon the tissue lysis, B – visualisation of calcification patterns by alizarin red S staining. Arrows indicate the most calcified areas

Обсуждение

Структурная дегенерация БП реализуется через несколько механизмов. К ним относится усталостное разрушение коллагеновых волокон биоматериала под действием циклических нагрузок, а также кальцификация и протеолиз, осуществляемые при участии ионов кальция, кальций-связывающих белков и протеолитических ферментов [12]. Перечисленные вещества накапливаются в биоматериале в результате пассивной имbibции из крови реципиента и при их секреции иммунными клетками, инфильтрирующими створки БП [13–15]. Важно отметить, что эффективных способов предотвращения структурной дегенерации БП в настоящее время не существует [4].

Основные направления разработок, нацеленных на снижение темпов структурной дегенерации БП, включают оптимизацию дизайна створчатого аппарата имплантатов и применение в их производстве низкоиммуногенного биоматериала, полученного от генетически модифицированных животных или путем децеллюляризации биоткани [12]. Первый подход позволяет снизить механическую нагрузку на створки протеза, замедляя усталостное разрушение их коллагеновой матрицы, тогда как второй призван уменьшить иммунный ответ на биоматериал [12]. Тем не менее попыток предотвратить пропитывание БП циркулирующими в крови реципиентов веществами до настоящего времени практически не предпринималось.

В перспективе предложенная нами модификация биоматериала может решить обозначенную проблему: ПВС-гель заполняет межфибрилярное пространство биоткани и создает физическую преграду для проникновения в нее соединений из плазмы крови, включая мелкоразмерные ионы кальция. Таким образом, обработка биоматериала ПВС позволяет замедлить темпы кальцификации, что подтверждают проведенные нами *in vitro* эксперименты. Кроме того, сформированный на поверхности биоматериала слой ПВС может препятствовать осаждению на БП клеточных элементов (включая тромбоциты), ингибируя развитие иммунного отторжения имплантатов и улучшая их тромборезистентные свойства.

Следует отметить, что поскольку БП функционируют в агрессивной механической среде, необходимы дополнительные исследования для выявления усталостно-прочностных свойств модифицированного биоматериала. В частности, пока неизвестно, сохранит ли ПВС-гель свои изолирующие свойства при воздействии циклических нагрузок. Также требуют изучения цитотоксические свойства ПВС-обработанного биоматериала, что позволит сделать выводы, касающиеся безопасности рассматриваемой модификации. Наконец, исследование антипротеазных свойств путем инкубации ПВС-модифицированного ксеноперикарда в коллагеназе, покажет, является ли этот вид модификации достаточным для замедления или протеолитической деграда-

ции биоматериала в организме реципиента. Вышеперечисленные *in vitro* тесты являются следующим этапом исследований, запланированных нашей группой в рамках работ по реализации гранта РНФ № 21-75-10107. В соответствии с их результатами появится возможность судить о целесообразности проведения доклинических испытаний на крупных лабораторных животных и перспективах внедрения ПВС-модифицированных БП в клиническую практику.

Заключение

В ходе исследования на основе метода криотропного гелеобразования поливиниловым спиртом разработана модификация эпоксиобработанного ксеноперикарда, используемого в производстве биологических протезов. Данная модификация не ухудшила механические и гемосовместимые свойства биоматериала, однако значительно изменила его поверхностную и внутреннюю структуру: гель образовал пленку на поверхности ксеноперикарда, запечатывал естественные поры биоткани, а также заполнил межфибрилярное пространство в его толще. Результаты *in vitro* тестирования продемонстрировали значительное замедление темпов кальцификации модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда по сравнению с немодифицированным. Таким образом, обработка биоматериала поливиниловым спиртом может быть взята за основу при разработке биологических протезов следующего поколения.

Вывод

Предложен новый способ модификации эпоксиобработанного ксеноперикарда 12% раствором поливинилового спирта с последующей криообработкой, в результате чего получен композитный материал, который продемонстрировал 5- и 3-кратно статистически значимо меньшее содержание кальция по сравнению с контрольным ксеноперикардом при их инкубации в кальцинирующем растворе в течение 3 и 6 недель соответственно.

Список литературы/References

1. Coffey S, Roberts-Thomson R, Brown A, Carapetis J, Chen M, Enriquez-Sarano M, et al. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18(12):853–864. PMID: 34172950 <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00570-z>
2. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, et al. 2020 ACC/AHA guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines. *Circulation*. 2021;143(5):e72–e227. PMID: 33332149 <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000923>
3. Head SJ, Çelik M, Kappetein AP. Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement. *Eur Heart J*. 2017;38(28):2183–2191. PMID: 28444168 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx141>
4. Dvir D, Bourguignon T, Otto CM, Hahn RT, Rosenhek R, Webb JG, et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018;137(4):388–399. PMID: 29358344 <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729>
5. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009;119(7):1034–1048. PMID: 19237674 <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886>
6. Marro M, Kossar AP, Xue Y, Frasca A, Levy RJ, Ferrari G. Noncalcific mechanisms of bioprosthetic structural valve degeneration. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(3):e018921. PMID: 33494616 <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018921>
7. Ding K, Zheng C, Huang X, Zhang S, Li M, Lei Y, et al. A PEGylation method of fabricating bioprosthetic heart valves based on glutaraldehyde and 2-amino-4-pentenoic acid co-cross-linking with improved antithrombogenicity and cytocompatibility. *Acta Biomater*. 2022;144:279–291. PMID: 35365404 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.026>
8. Barbarash L, Rutkovskaya N, Barbarash O, Odarenko Y, Stasev A, Uchasova E. Prosthetic heart valve selection in women of childbearing age with acquired heart disease: a case report. *J Med Case Rep*. 2016;10:51. PMID: 26956734 <https://doi.org/10.1186/s13256-016-0821-y>
9. Barrett DA, Hartshome MS, Husain MA, Shaw PN, Davies MC. Resistance to nonspecific protein adsorption by poly (vinyl alcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. *Anal Chem*. 2001;73(21):5232–5239. PMID: 11721924 <https://doi.org/10.1021/ac010368u>
10. Jiang S, Liu S, Feng W. PVA hydrogel properties for biomedical application. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(7):1228–1233. PMID: 21783131 <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>
11. Hassan CM, Peppas NA. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv Polym Sci*. 2000;153:37–65. https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2
12. Kostyunin AE, Yuzhalin AE, Rezvovala MA, Ovcharenko EA, Glushkova TV, Kutikhin AG. Degeneration of bioprosthetic heart valves: update 2020. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(19):e018506. PMID: 32954917 <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018506>
13. Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J, et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(6):471–480. PMID: 19490057 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x>
14. Simionescu A, Simionescu DT, Deac RF. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovasc Pathol*. 1996;5(6):323–332. PMID: 25851789 [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(96\)00043-9](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(96)00043-9)
15. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest*. 1997;99(5):996–1009. PMID: 9062358 <https://doi.org/10.1172/JCI119265>

Информация об авторах

Александр Евгеньевич Костюнин	канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0001-6099-0315 , rhabdophis_tigrina@mail.ru 20% – анализ литературы, разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание рабочего варианта статьи
Мария Александровна Резвова	младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0002-4405-8904 , rezvovamaria@mail.ru 20% – разработка оригинального метода модификации эпоксиобработанного биологического материала поливиниловым спиртом, анализ полученных данных, редактирование текста статьи
Татьяна Владимировна Глушкова	канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0003-4890-0393 , bio.tvlg@mail.ru 20% – сбор материала согласно дизайну исследования, оценка механических свойств, световая, флуоресцентная и электронная микроскопии, анализ полученных данных, редактирование текста статьи
Дарья Кирилловна Шишкова	канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0002-1518-3888 , shishkovadk@gmail.com 10% – оценка гемосовместимости исследуемых биоматериалов, анализ полученных данных
Антон Геннадьевич Кутихин	канд. мед. наук, заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0001-8679-4857 , antonkutikhin@gmail.com 10% – редактирование текста статьи
Татьяна Николаевна Акентьева	младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», http://orcid.org/0000-0002-0033-9376 , takentyeva@mail.ru 10% – пробоподготовка исследуемых материалов, оценка количественного содержания кальция в биоматериале, статистическая обработка полученных данных
Евгений Андреевич Овчаренко	канд. техн. наук, заведующий лабораторией новых биоматериалов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», https://orcid.org/0000-0001-7477-3979 , ov.eugene@gmail.com 10% – редактирование и финальное утверждение текста статьи

Information about the authors

Alexander E. Kostyunin	Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0001-6099-0315 , rhabdophis_tigrina@mail.ru 20%, literature analysis, development of the study design, analysis of the obtained data, writing the working version of the article manuscript
Maria A. Rezvova	Junior Researcher of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0002-4405-8904 , rezvovamaria@mail.ru 20%, development of an original method for modifying epoxy-treated biomaterial with polyvinyl alcohol, analysis of the obtained data, editing the text of the article
Tatyana V. Glushkova	Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0003-4890-0393 , bio.tvg@mail.ru 20%, data collection according to the study design assessment of the biomaterial mechanical properties, light, fluorescence and electron microscopy, analysis of the obtained data, editing the text of the article
Daria K. Shishkova	Cand. Sci. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0002-1518-3888 , shishkovadk@gmail.com 10%, evaluation of the biomaterials hemocompatibility, analysis of the obtained data
Anton G. Kutikhin	Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0001-8679-4857 , antonkutikhin@gmail.com 10%, editing the text of the article
Tatyana N. Akentieva	Junior Researcher of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, http://orcid.org/0000-0002-0033-9376 , t.akentyeva@mail.ru 10%, sample preparation of the studied biomaterials, quantitative assessment of calcium content in the studied biomaterials, statistical processing of the received data
Evgeny A. Ovcharenko	Cand. Sci. (Tech.), Head of the Laboratory of New Biomaterials, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, https://orcid.org/0000-0001-7477-3979 , ov.eugene@gmail.com 10%, editing and approval of the article text

Статья поступила в редакцию 16.11.2022;
одобрена после рецензирования 04.12.2022;
принята к публикации 28.12.2022

The article was received on November 16, 2022;
approved after reviewing December 4, 2022;
accepted for publication December 28, 2022