

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-1-75-83

ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КАЛЬЦИФИКАЦИИ КСЕНОПЕРИКАРДА, ОБРАБОТАННОГО ПОЛИГИДРОКСИСОЕДИНЕНИЯМИ

М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко, Т.В. Глушкова, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараш
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

Кальцификация биологического материала, используемого при протезировании клапанов сердца, является актуальной проблемой сердечно-сосудистой хирургии. Цель настоящей работы – сравнительная оценка эффективности модифицирования поливиниловым спиртом (ПВС) и дубильной кислотой (ДК) ксеноткани, предварительно стабилизированной глутаровым альдегидом (ГА) и диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ), в снижении уровня кальцификации. Анализ механических свойств, оцененный в условиях одноосного растяжения, продемонстрировал значимое увеличение предела прочности на разрыв исследуемых образцов по сравнению с тем же показателем для контрольных (немодифицированных) образцов ($p < 0,05$). Дополнительная обработка ГА-фиксированной ткани ПВС и ДК позволила добиться значимого снижения количества кальция в образцах, имплантированных крысам на срок наблюдения 60 дней ($p < 0,05$). Уровень кальцификации образцов, предварительно стабилизированных ДЭЭ и обработанных ПВС и ДК, не отличался от контрольной группы ($p = 0,063$). Совокупный анализ результатов исследования продемонстрировал способность биоматериала, предварительно консервированного ГА и дополнительно модифицированного ПВС и ДК, к снижению кальций-связывающей активности и повышению прочности, что свидетельствует о перспективах клинического применения предложенных способов обработки. В то же время вопрос отдаленной реакции организма требует дальнейшего изучения долгосрочной стабильности модифицированного биоматериала в условиях физиологического кровотока.

Ключевые слова: ксеноперикард, поливиниловый спирт, дубильная кислота, диглицидиловый эфир этиленгликоля, глутаровый альдегид, кальцификация.

EVALUATION OF CALCIFICATION RESISTANCE OF XENOPERICARDIUM TREATED WITH POLYHYDROXY COMPOUNDS

M.A. Rezvova, E.A. Ovcharenko, T.V. Glushkova, Yu.A. Kudryavtseva, L.S. Barbarash
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Calcification of biomaterials used in prosthetic heart valves has been a challenging issue in cardiovascular surgery. The objective of this work is to compare the efficiency of polyvinyl alcohol (PVA) and tannic acid (TA) modification of xenomaterials, pre-stabilized with glutaraldehyde (GA) and ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE), in reducing calcification. Analysis of mechanical properties evaluated under uniaxial tension, showed a significant increase in the tensile strength of the test samples compared to the control (unmodified) samples ($p < 0.05$). Additional treatment of GA-fixed tissue with PVA and TA significantly reduced the amount of calcium in the samples implanted into rats for a 60-day follow-up ($p < 0.05$). The level of calcification of samples pre-stabilized with EGDE and treated with PVA and TA did not differ from the control group ($p = 0.063$). Cumulative analysis of the study results demonstrated that the GA-fixed biomaterial modified with PVA and TA can reduce calcium-binding activity and increase strength. This indicates the prospects for clinical application of the proposed treatment methods. This being said, the issue of long-term body response requires further study of the long-term stability of the modified biomaterial under physiologic blood flow conditions.

Keywords: xenopericardium, polyvinyl alcohol, tannic acid, ethylene glycol diglycidyl ether, glutaraldehyde, calcification.

Для корреспонденции: Резвова Мария Александровна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (913) 079-61-40. E-mail: rezvovama@gmail.com

Corresponding author: Maria Rezvova. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Phone: (913) 079-61-40. E-mail: rezvovama@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Проблему клапанных пороков сердца в настоящее время решают путем протезирования несостоятельного клапана механическим или биологическим протезом [1, 2]. Для биологических заменителей, изготовленных на основе ксенотканей животного происхождения, в отличие от механических устройств характерны: гемодинамика, сопоставимая с нативным клапаном, и высокая гемосовместимость [3]. В то же время ксеноматериал склонен к деградации в условиях ферментативного, химического и физического воздействия среды организма (как крови, так и окружающих тканей) человека. По этой причине биологическую ткань предварительно подвергают обработке химическими агентами, стабилизирующими структуру, для минимизации иммунного ответа организма [4]. Принцип действия химических стабилизаторов заключается в их взаимодействии с аминокислотными группами коллагена – основного белка межклеточного матрикса биоматериала, и как следствие, формировании дополнительных поперечных связей-сшивок в структуре коллагеновой молекулы [5, 6]. Самым распространенным стабилизирующим агентом в мировой практике является глутаровый альдегид (ГА) [7], однако существуют и альтернативные соединения-консерванты, например, диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДЭЭ) [8]. Несмотря на комплексную обработку ксеноматериала биологических протезов и использование современных постобработок (антикальциевых, антитромботических), добиться полной свободы от дисфункций, сравнимой с механическими протезами – 20–30 лет, – в большинстве случаев не удается. В связи с чем по прошествии определенного времени такие клапаны требуют замены – сроки их функционирования ограничены прежде всего развитием кальцификации и структурной деградации биологической ткани. В литературе существует несколько гипотез, объясняющих механизм данного процесса, среди которых немаловажную роль играет консервант [9]. Однако, наиболее вероятно, минерализация (кальцификация) обусловлена комплексом событий, представляя собой мультифакторный процесс [10]. Для борьбы с кальцификацией биологических протезов клапана сердца предложены различные способы, в том числе использование нового консерванта [11], «маскировка» свободных альдегидных групп глутарового альдегида [12], модифицирование поверхности аминодифосфонатами [13], предварительная децеллюляризация ткани с целью удаления остатков альфа-галактозы, как элемента, провоцирующего иммунный ответ и развитие кальцификации [12], заполнение пустот в коллагеновом пространстве с целью ликвидации потенциальных участков развития пассивной минерализации [14] и др. Некоторые из предложенных

решений в настоящее время уже внедрены в производственную практику, однако полного устранения проблемы кальцификации добиться пока не удалось.

Проанализировав данные литературы, мы определили перспективное для исследований направление – модифицирование стабилизированных ксенотканей объемными полигидроксисоединениями. Ожидаемым результатом такой обработки является снижение кальцийсвязывающей активности материала за счет формирования дополнительного гидрофильного слоя, маскировки активных групп консерванта (ГА) и заполнения пустот в структуре ксеноткани [14, 15]. В качестве модифицирующих агентов были выбраны два полигидроксисоединения: поливиниловый спирт (ПВС, линейной структуры) и дубильная кислота (ДК, объемной, разветвленной структуры).

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования стал перикард крупного рогатого скота (КРС), консервированный по стандартным методикам – 5% ДЭЭ и 0,625% ГА. В качестве реагентов для модифицирования ксеноперикарда с целью снижения кальций-связывающей активности использовали дубильную кислоту (ACS reagent, Sigma Aldrich, США) и поливиниловый спирт Mw 67,000, степень гидролиза ацетатных групп 88% (Sigma-Aldrich, США). Модифицирование материала проводили двумя способами: в 5% растворе ПВС в изотоническом физиологическом растворе и в 3% растворе дубильной кислоты в изотоническом физиологическом растворе. Воздействие осуществляли в течение 24 часов при температуре 37 °С и постоянном перемешивании, в присутствии соляной кислоты в качестве катализатора реакции.

Для подтверждения присутствия в структуре модифицированных материалов дополнительных гидроксильных групп, введенных описанным методом, образцы ткани ($n = 2$, для каждой группы) высушивали и исследовали методом инфракрасной спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре «Инфралюм ФТ-801» (Россия). Анализ проводили по ИК-спектрам диффузного отражения.

В качестве критерия эффективности данных способов обработки ксеноперикарда выступили изменения его механических свойств – предела прочности, относительного удлинения до разрыва и модуля Юнга. Для этого образцы исходного и модифицированного биоматериала ($n = 5$, для каждой исследуемой группы) оценивали в условиях одноосного растяжения на универсальной испытательной машине Zwick/Roell (Zwick GmbH, Германия). Образцы готовили с применением ножа специальной формы (B083, соответствующий стандарту ISO 37:2017) на вырубном прессе ZCP 020 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Предел прочности биоткани определяли по максимальному напряжению при растяжении до

начала разрушения образца (МПа). Упруго-деформативные свойства оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (%) и модулю Юнга (МПа), который определяли в диапазонах малых деформаций, соответствующего диапазону физиологической нагрузки. Для измерения толщины образцов использовали толщиномер – ТР (ЗАО «Красный инструментальщик», Россия) с пределом допустимой погрешности $\pm 0,01$ мм (прижимное усилие не более 1,5 Н).

Эффективность снижения кальций-связывающей активности оценивали *in vitro* и *in vivo* тестами. Для определения *in vitro* резистентности исходного и модифицированного материала к кальцификации образцы биоткани выдерживали в растворе, имитирующем физиологическую среду организма человека. Для чего лоскуты перикарда размером 5×5 мм ($n = 5$) помещали индивидуально в раствор объемом 2 мл, содержащий стерильную питательную среду для выращивания культур клеток человека и животных (DMEM, Sigma-Aldrich, США), эмбриональную бычью сыворотку (FBS, Sigma-Aldrich, США), хлорид кальция и моногидрофосфат натрия. Уровень кальцификации определяли после 2-й и 3-й недели инкубации при 37°C в CO_2 -инкубаторе, концентрация углекислого газа составила 5%. Криосрезы инкубированных образцов, предварительно окрашенные ализариновым красным С, исследовали с помощью метода световой микроскопии на приборе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Устойчивость материалов к кальцификации оценивали также *in vivo*, методом подкожной имплантации крысам-самцам ($n = 5$) субпопуляции Wistar (вес 55–70 г). Срок наблюдения составил 2 месяца. Все вмешательства проводили под общим наркозом с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123), приказом

Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Межгосударственным стандартом ГОСТ 33044-2014. По истечении установленного срока животных выводили из исследования передозировкой наркоза. Образцы биоматериала эксплантировали, удаляли окружающие ткани и высушивали до постоянного веса, после чего подвергали действию 50% хлорной кислоты при нагревании с целью полного гидролиза до получения прозрачного раствора. Разбавленные дистиллированной водой пробы исследовали на содержание кальция на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой icap 6300 (Thermo Scientific, США).

Количественные данные анализировали с использованием статистических методов в программе для обработки медицинской и биологической информации «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., США). С помощью критерия Колмогорова–Смирнова модель распределения в выборках была определена как непараметрическая, вследствие чего результаты представлены как медианы (М), квартили (25 и 75%), минимальные и максимальные значения. Для оценки статистической значимости различий двух независимых групп использовали U-критерий Манна–Уитни, достоверность различий фиксировали при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка механических свойств

По результатам проведенного эксперимента предел прочности на разрыв модифицированных образцов в обеих исследуемых параллелях (ДЭЭ- и ГА-консервированный ксеноперикард) оказался значимо выше контрольных значений ($p < 0,05$) (табл.). В случае модифицирования ПВС данный показатель превысил контрольную величину в 2,7 и 1,6 раза для

Таблица

Механические свойства исследуемых модифицированных и контрольных материалов

Mechanical properties of modified and control materials

Наименование	Прочность, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
Контроль ГА	12,34 (7,75; 9,38; 14,00; 14,63) [#]	54,12 (45,73; 48,30; 58,75; 60,83)	1,69 (1,12; 1,25; 2,01; 2,13)
Контроль ДЭЭ	3,48 (3,12; 3,14; 4,06; 4,96)*	54,51 (47,38; 47,98; 64,16; 65,79)	1,720 (1,67; 1,68; 1,80; 1,82)
ГА + ДК	21,67 (20,64; 20,92; 23,11; 23,79)*	61,18 (57,94; 58,78; 64,72; 65,89)	1,66 (1,47; 1,49; 1,72; 1,76)
ДЭЭ + ДК	8,48 (4,40; 6,23; 8,75; 9,00) [#]	48,23 (39,89; 43,35; 62,26; 62,89)	1,63 (1,47; 1,53; 2,00; 2,04)
ГА + ПВС	19,35 (16,04; 16,36; 24,58; 26,72)*	57,00 (47,87; 49,29; 65,38; 73,25)	1,56 (1,06; 1,29; 1,60; 1,63)
ДЭЭ + ПВС	9,55 (5,07; 6,89; 10,50; 10,65) [#]	58,34 (42,49; 48,80; 65,06; 66,81)	2,04 (1,94; 1,97; 2,38; 2,50) [#]

Примечание. * – статистически значимо отличается от контроля ГА ($p < 0,05$); [#] – статистически значимо отличается от контроля ДЭЭ ($p < 0,05$).

Note. * – statistically significantly different from the GA control ($p < 0.05$); [#] – statistically significantly different from the EGDE control ($p < 0.05$).

ДЭЭ- и ГА-перикарда соответственно. Прочность на разрыв ксеноперикарда, обработанного ДК, была в 2,4 раза выше для ДЭЭ-консервированного материала и в 1,8 раза выше для ГА-стабилизированного.

По показателям относительного удлинения и модуля Юнга достоверных различий между группами обнаружено не было, за исключением модуля Юнга для образца, предварительно фиксированного ДЭЭ и модифицированного поливиниловым спиртом.

ИК-спектроскопия

Спектры диффузного отражения, полученные для модифицированных образцов (ПВС и ДК обработанного ксеноперикарда), обнаружили изменения в характере (ширина и форма) полосы, обусловленной валентными колебаниями взаимодействующих связей O–H– в области 3200–3600 см⁻¹ [16] (рис. 1). Область спектра, полученного для каждого из исследуемых образцов, до 1800 см⁻¹ содержит характеристические полосы, относящиеся к белковым

структурам перикардальной ткани, в частности коллагену. Как правило, полосы амида I (~1700 см⁻¹) возникают в результате валентных колебаний C=O, связанных с изгибным колебанием N–H. Полосы амида II (~1575 см⁻¹) возникают в результате деформационных колебаний N–H, связанных с валентными колебаниями C–N [17]. Полосы колебаний C–O–C, обуславливающих присутствие эпокси-групп, лежат в области 800–900 см⁻¹ [18]. По данным литературы, присутствие карбонильной группы определяет появление полосы в инфракрасном спектре соединения в области 1660–1770 см⁻¹ [19]. В нашем случае очевидно происходит перекрытие указанной полосы с полосой амида I.

Оценка кальцификации *in vitro*

При микроскопическом анализе срезов, окрашенных на присутствие кальция и полученных после инкубации образцов в растворе для моделирования ускоренной кальцификации *in vitro*, обнаружили уве-

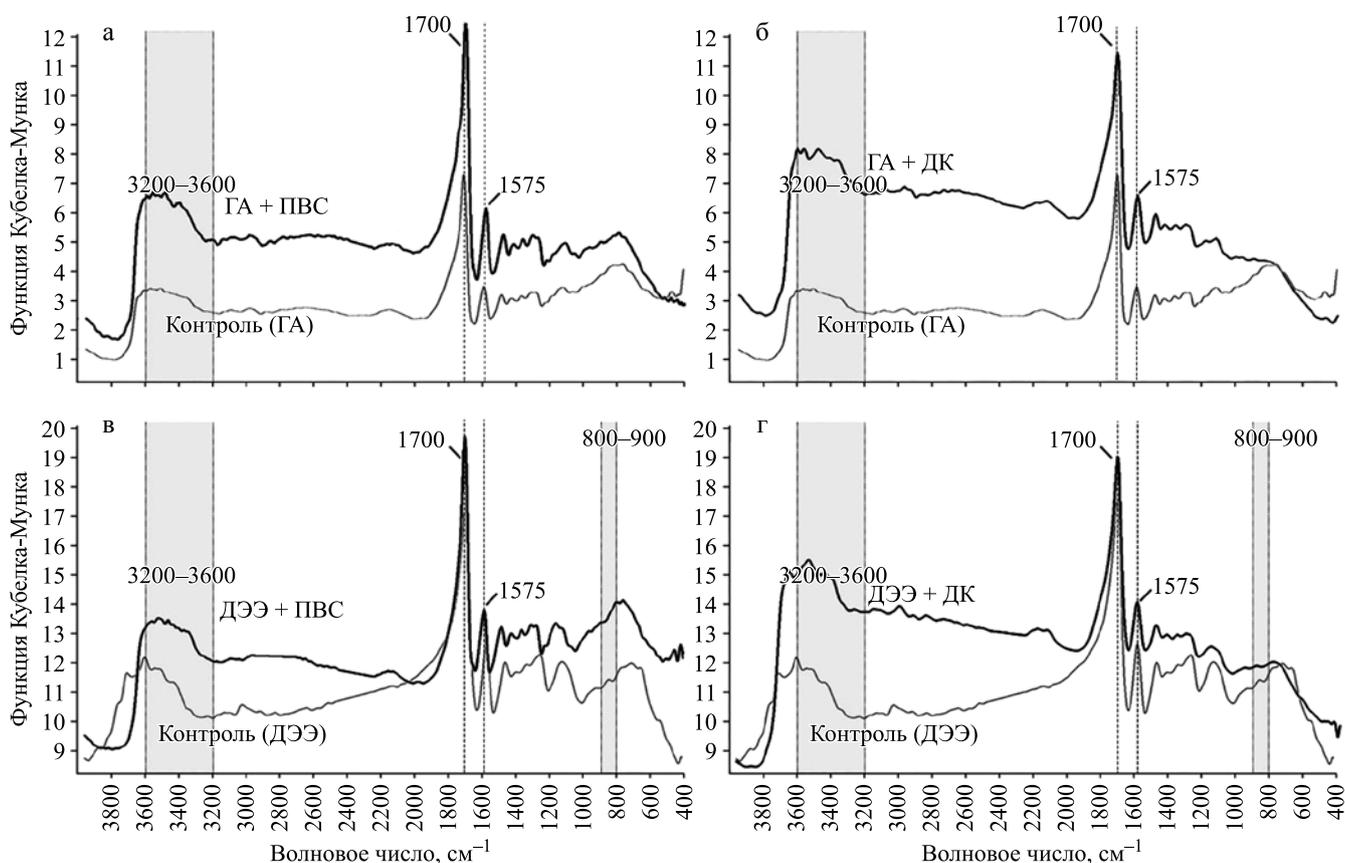


Рис. 1. ИК-спектры диффузного отражения биологического материала, консервированного ДЭЭ и ГА и модифицированного ПВС и ДК: а – сравнение спектров ГА-перикарда, обработанного ПВС, с контролем; б – сравнение спектров ГА-перикарда, обработанного ДК, с контролем; в – сравнение спектров ДЭЭ-перикарда, обработанного ПВС, с контролем; г – сравнение спектров ДЭЭ-перикарда, обработанного ДК, с контролем

Fig. 1. Diffuse reflectance IR spectra of biomaterial stabilized with EDGE and GA, and modified with PVA and TA: а – comparison of the spectra of GA-pericardium treated with PVA with the control; б – comparison of the spectra of GA-pericardium treated with TA with the control; в – comparison of the spectra of EDGE pericardium treated with PVA with the control; г – comparison of the spectra of EDGE pericardium treated with TA with the control

личение резистентности к минерализации всех модифицированных ПВС и ДК материалов по сравнению с контрольными группами (рис. 2). При этом визуально не наблюдали различий в количестве кальция в образцах, обработанных ПВС и ДК, однако отметили большую склонность к формированию кальцификатов для всей параллели тканей, предварительно стабилизированных ГА (рис. 2).

Кальцификация *in vivo*

В результате оценки содержания кальция в образцах ксеноперикарда, имплантированных крысам, обнаружили прежде всего статистически значимо более высокий уровень кальцификации для материала, предварительно стабилизированного ГА, $p < 0,05$ (рис. 3). При этом дополнительная обработка ГА-фиксированной ткани полигидроксисоединени-

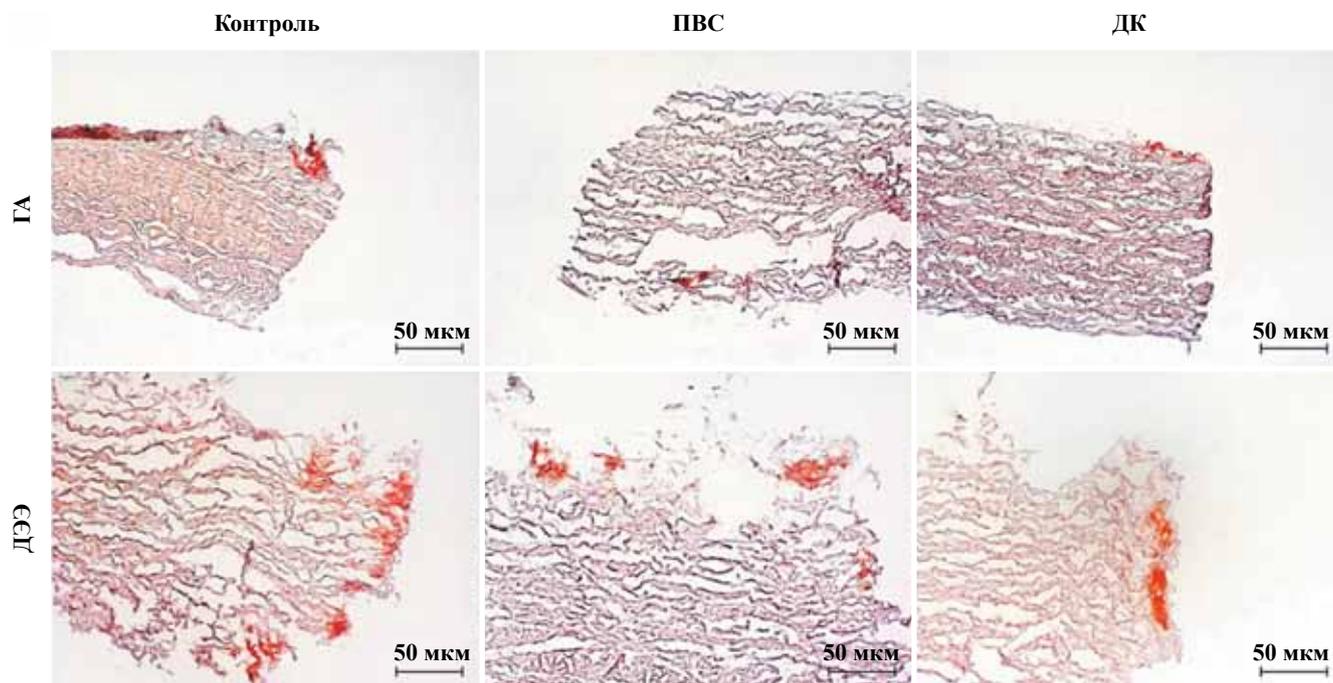


Рис. 2. Гистологические срезы образцов биоматериала, консервированного ДЭЭ и ГА и модифицированного ПВС и ДК. Оценка кальцификации *in vitro*. $\times 200$

Fig. 2. Histological sections of biomaterial samples, stabilized with EDGE and GA, and modified with PVA and TA. Evaluation of *in vitro* calcification. $200\times$

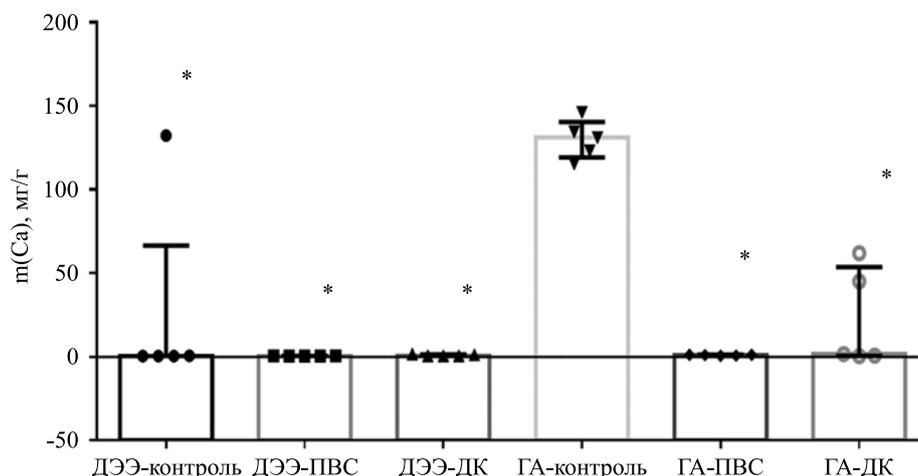


Рис. 3. Количество кальция в образцах, имплантированных крысам на 60 дней.

* – отличается статистически значимо от группы ГА-контроль

Fig. 3. Calcium quantity in samples implanted in rats for 60 days.

* – statistically significantly different from the GA control group

ями (ПВС и ДК) позволила добиться существенного снижения количества кальция в образцах, $p < 0,05$. Уровень кальцификации образцов, предварительно стабилизированных ДЭЭ и обработанных ПВС и ДК, не отличался от контрольной группы ($p = 0,063$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе модифицирования полигидроксисоединениями ксеноперикарда, предварительно стабили-

зированного химическими агентами, лежит принцип взаимодействия свободных групп консерванта с гидроксильными группами модификатора. Помимо ковалентных химических связей поливиниловый спирт (I) и дубильная кислота (II) способны к образованию менее стабильных водородных связей с функциональными группами аминокислот молекул коллагена, а также к физической адсорбции в пустотах биоматериала и на его поверхности. Рис. 4 и 5

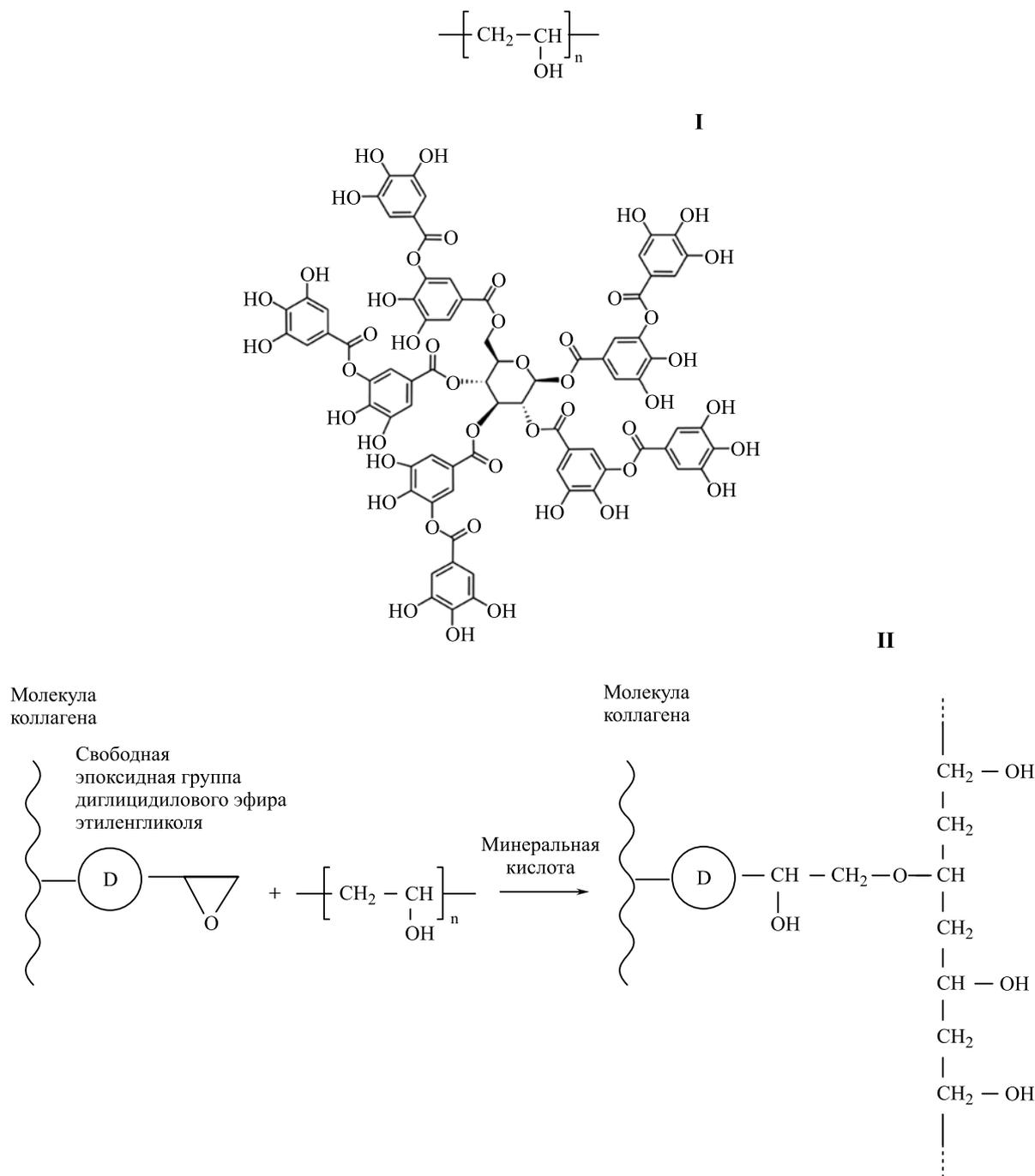


Рис. 4. Взаимодействие эпоксидных групп ДЭЭ-стабилизированного ксеноперикарда с гидроксильными группами поливинилового спирта

Fig. 4. Interaction between epoxy groups in EDGE-stabilized xenopericardium and hydroxyl groups in polyvinyl alcohol

иллюстрируют химические процессы, протекающие в ходе модифицирования на примере реакции с поливиниловым спиртом.

ПВС благодаря особенностям химической структуры основной цепи и наличию гидроксильных групп является нетоксичным и высокогидрофильным соединением. Пленки и гидрогели, изготовленные на его основе, используются, в том числе, в экспериментах при создании полимерного клапана сердца [20]. Дубильная кислота, в свою очередь, была исследована ранее как индивидуальное вещество, стабилизирующее биологическую ткань [21], и как дополнительный компонент при фиксации перикарда глутаровым альдегидом [22]. В результате проведенных работ было обнаружено снижение иммунного ответа организма (эксперимент с крысами) и снижение кальций-связывающей активности биоматериала, а также сохранность коллагеновых волокон биологической ткани [21, 22].

Механические свойства

Полученные в эксперименте показатели прочности образцов контрольных групп в целом схожи с данными литературы [23], где, в том числе, отмечена более высокая прочность материалов, стабилизированных глутаровым альдегидом, по сравнению с ДЭЭ, что коррелирует с результатами, полученными нами ранее.

Повышение прочностных характеристик перикарда, модифицированного ПВС и ДК, может свидетельствовать об образовании дополнительных межфибриллярных сшивок в коллагене [24]. При этом отсутствие статистически значимых различий прочностей между группами ДК и ПВС хоть и не позволяет однозначно утверждать, но указывает на равнозначность данных соединений в химическом

аспекте. Однако представленная схема химического взаимодействия отражает лишь предполагаемый механизм реакции, вероятно, помимо предложенного объяснения возможны и другие пути, что связано со сложностью исследуемых систем. В то же время при отсутствии критического влияния на модуль Юнга и эластичность модифицирования материала можно судить и об отсутствии негативного влияния на структуру перикарда используемых реагентов и условиях реакции.

ИК-спектроскопия

Изменение характера полосы в области спектра, обусловленной валентными колебаниями O–H-связей взаимодействующих гидроксильных групп, может быть обусловлено разрывом связей непрореагировавших эпоксидных групп консерванта, образованием вследствие этого новых гидроксильных групп, новых ковалентных и водородных связей в случае ДЭЭ-консервированных образцов. При этом основной вклад в увеличение ширины полосы вносит непосредственное прилегание к поверхности биологической ткани полигидроксильных соединений (ПВС и ДК). Неоднозначность интерпретации ИК-спектров обусловлена сложностью состава и строения биологических структур исследуемого материала. В то же время отсутствие значимых изменений в расположении характеристических полос спектра свидетельствует о сохранности структуры ткани, в частности, третичных молекул коллагена и эластина. На основании вышесказанного можно судить об отсутствии негативного влияния модифицирования на архитектуру биологического материала.

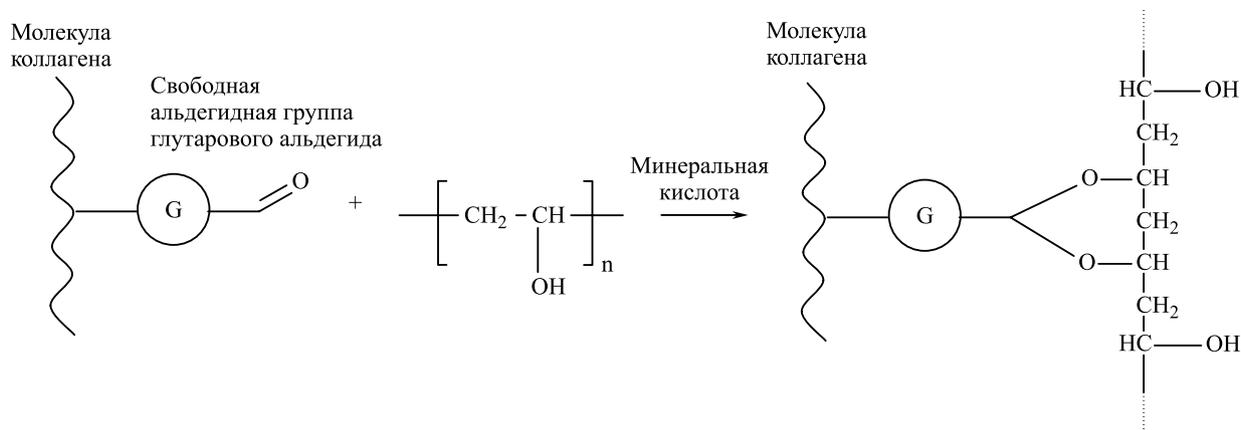


Рис. 5. Образование полуацеталей в результате взаимодействия альдегидной группы глутарового альдегида и двух ближайших гидроксильных групп поливинилового спирта

Fig. 5. Hemiacetal formation as a result of interaction between the aldehyde group in glutaraldehyde and two nearest hydroxyl groups in polyvinyl alcohol

Кальцификация *in vitro*

Количество осадка фосфата кальция в модельной системе *in vitro* ограничено и зависит от исходных концентраций рабочего раствора. При этом в токе крови на поверхности имплантата образуется относительно неограниченное количество соли. Более того, осадок фосфата кальция в системе *in vitro* является случайным по сравнению с патологической кальцификацией. Следовательно, природа кристаллической минеральной фазы в системе *in vitro* мало предсказуема и может отличаться от *in vivo*. Кроме того, есть убедительные доказательства, подтверждающие роль клеток в кальцификации [25]. Однако предложенная модель *in vitro* может быть использована для объяснения образования пассивных отложений, которые не подразумевают клеточного вовлечения [26].

Полигидроксильное покрытие, сформированное на поверхности биологических материалов, модифицированных поливиниловым спиртом и дубильной кислотой, представляет собой высокогидрофильную поверхность, которая в условиях физиологической среды имеет нейтральную реакцию в случае ПВС и слабокислую при использовании ДК. За счет нейтрализации свободных групп консервантов, способных провоцировать накопление кальция в ткани, а также ввиду заполнения пустот в структуре материала [27] такая модификация, вероятно, частично ограничивает проникновение ионов кальция и фосфат-ионов в толщу ткани, поскольку существующие пространства представляют собой потенциальные центры нуклеации кальцификатов [14].

Кальцификация *in vivo*

Снижение уровня кальцификации ГА-консервированного перикарда в результате модифицирования ПВС и ДК, вероятно, связано с уменьшением токсичности альдегидных групп консерванта, и как следствие, сокращением воспалительного ответа. Известно, что воспаление предшествует развитию минерализации имплантированных тканей [28]. Кроме того, согласно данным литературы [29], дубильная кислота способна связывать эластин, который также является промотирующим фактором в развитии кальцификации. Подобных сведений о поливинилово-спирте в литературе не обнаружено, поэтому данный вопрос требует экспериментального подтверждения. В то же время в группе ДЭЭ содержание кальция оказалось ниже, чем та же величина для контрольной группы ГА. Однако представленная модель имплантации крысам не дает полной картины, поскольку отдаленные клинические результаты свидетельствуют о развитии кальцификации биологических протезов клапана сердца, консервированных ДЭЭ [8]. По этой причине модифицирование необходимо и предложенные нами в настоящей работе способы

могут быть вполне перспективными, поскольку демонстрируют кальций-связывающую резистентность обработанных тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупный анализ результатов исследования продемонстрировал способность модифицированных ПВС и ДК тканей, предварительно консервированных ГА и ДЭЭ, к снижению кальций-связывающей активности и повышению прочности, что свидетельствует о перспективах клинического применения предложенных способов обработки. В то же время вопрос отдаленной реакции организма требует дальнейшего изучения долгосрочной стабильности модифицированного биоматериала в условиях физиологического кровотока.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «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».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hoerstrup SP, Weber B. Biological heart valves. *Eur Heart J*. 2015; 36: 325–332. doi: 10.1093/eurheartj/ehu483.
2. Chambers J. Prosthetic heart valves. *Int J Clin Pract*. 2014; 68: 1227–1230. doi: 10.1111/ijcp.12309.
3. Li KYC. Bioprosthetic Heart Valves: Upgrading a 50-Year Old Technology. *Front Cardiovasc Med*. 2019; 6: 47. doi: 10.3389/fcvm.2019.00047.
4. Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Hunt J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility of acellular human pericardium. *J Surg Res*. 2007; 143: 407–414. doi: 10.1016/j.jss.2007.01.026.
5. Sadowski J, Bartus K, Kapelak B, Chung A, Stapor M, Bochenek M. Aortic valve replacement with a novel anti-calcification technology platform. *Kardiologia Polska*. 2015; 73: 317–322. doi: 10.5603/KP.a2014.0214.
6. Barbarash O, Rutkovskaya N, Hryachkova O, Gruzdeva O, Uchasova E, Ponasenko A et al. Impact of recipient-related factors on structural dysfunction of xenoaortic bioprosthetic heart valves. *J Patient Preference and Adherence*. 2015; 9: 389–399. doi: 10.2147/PPA.S76001.
7. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction

- with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004; 37: 790–796, 798–802.
8. Козлов БН, Петлин КА, Пряхин АС, Середкина ЕБ, Панфилов ДС, Шипулин ВМ. Непосредственные и отдаленные результаты применения биопротезов «ЮниЛайн» в аортальной позиции. *Клиническая и экспериментальная хирургия*. 2017; 5: 37–42. Kozlov BN, Petlin KA, Pryakhin AS, Seredkina EB, Panfilov DS, Shipulin VM. Neposredstvennye i otdalennye rezul'taty primeneniya bioprotezov «YuniLayn» v aortal'noy pozitsii. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya*. 2017; 5: 37–42. doi: 10.24411/2308-1198-2017-00005.
 9. Shang H, Claessens SM, Tian B, Wright GA. Aldehyde reduction in a novel pericardial tissue reduces calcification using rabbit intramuscular model. *J Mater Sci Mater Med*. 2016; 28: 16. doi: 10.1007/s10856-016-5829-8.
 10. Bre LP, McCarthy R, Wang W. Prevention of bioprosthetic heart valve calcification: strategies and outcomes. *Curr Med Chem*. 2014; 21: 2553–2564. doi: 10.2174/0929867321666131212151216.
 11. Tam H, Zhang W, Feaver KR, Parchment N, Sacks MS, Vyavahare N. A novel crosslinking method for improved tear resistance and biocompatibility of tissue based biomaterials. *Biomaterials*. 2015; 66: 83–91. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.07.011.
 12. Lim HG, Kim GB, Jeong S, Kim YJ. Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase, space filler, organic solvent and detoxification. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015; 48: 104–113. doi: 10.1093/ejcts/ezu385.
 13. Rapoport HS, Connolly JM, Fulmer J, Dai N, Murti BH, Gorman RC, Gorman JH, Alferiev I, Levy RJ. Mechanisms of the *in vivo* inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate. *Biomaterials*. 2007; 28: 690–699. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.029.
 14. Jeong S, Yoon EJ, Lim HG, Sung SC, Kim YJ. The effect of space fillers in the cross-linking processes of bioprostheses. *BioResearch Open Access*. 2013; 2: 98–106. doi: 10.1089/biores.2012.0289.
 15. Lopez-Moya M, Melgar-Lesmes P, Kolandaivelu K, de la Torre Hernández JM, Edelman ER, Balcells M. Optimizing Glutaraldehyde-Fixed Tissue Heart Valves with Chondroitin Sulfate Hydrogel for Endothelialization and Shielding against Deterioration. *Biomacromolecules*. 2018; 19: 1234–1244. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00077.
 16. Chen Y-N, Peng L, Liu T, Wang Y, Shi S, Wang H. Poly(vinyl alcohol)-Tannic Acid Hydrogels with Excellent Mechanical Properties and Shape Memory Behaviors. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8: 27199–27206. doi: 10.1021/acsami.6b08374.
 17. Suchý T, Šupová M, Sauerová P, Verdánová M, Sucharda Z, Rýglová Š, Žaloudková M, Sedláček R, Kalbáčová MH. The effects of different cross-linking conditions on collagen-based nanocomposite scaffolds—an *in vitro* evaluation using mesenchymal stem cells. *Biomed Mater*. 2015; 10: 065008. doi: 10.1088/1748-6041/10/6/065008.
 18. Mallard I, Landy D, Fourmentin S. Evaluation of Polyethylene Glycol Crosslinked β -CD Polymers for the Removal of Methylene Blue. *Appl Sci*. 2020; 10: 4679. doi: 10.3390/app10134679.
 19. Gao S, Yuan Z, Guo W, Chen M, Liu S, Xi T, Guo Q. Comparison of glutaraldehyde and carbodiimides to crosslink tissue engineering scaffolds fabricated by decellularized porcine menisci. *Mater Sci Eng C*. 2017; 71: 891–900. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.074.
 20. Muppalaneni S, Omidian H. Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. *J Develop Drugs*. 2013; 2: 112. doi: 10.4172/2329-6631.1000112.
 21. Cwalina B, Turek A, Nozynski J, Jastrzebska M, Nawrat Z. Structural Changes in Pericardium Tissue Modified with Tannic Acid. *Int J Artif Organs*. 2005; 28 (6): 648–653. doi: 10.1177/039139880502800614.
 22. Wang D, Jiang H, Li J, Zhou JY, Hu SS. Mitigated calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium by tannic acid in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2008; 121: 1675–1679. doi: 10.1097/00029330-200809010-00017.
 23. Ovcharenko EA, Klyshnikov KU, Yuzhalin AE, Savrasov GV, Glushkova TV, Vasukov GU et al. Comparison of xenopericardial patches of different origin and type of fixation implemented for TAVI. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*. 2017; 25 (1): 44–59. doi: 10.1504/IJBET.2017.086551.
 24. Gu L, Shan T, Ma Y, Tay FR, Niu L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends Biotechnol*. 2018; 37: 464–491. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.10.007.
 25. D'Alessandro CC, Komninou MA, Badria AF, Korosis S, Koutsoukos P, Mavrilas D. Calcification assessment of bioprosthetic heart valve tissues using an improved *in vitro* model. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2020; 67: 2453–2461. doi: 10.1109/tbme.2019.2963043.
 26. Vasudev SC, Moses LR, Sharma CP. Covalently bonded heparin to alter the pericardial calcification. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2000; 28: 241–253. doi: 10.3109/10731190009119355.
 27. Vasudev SC, Chandy T. Polyethylene glycol-grafted bovine pericardium: a novel hybrid tissue resistant to calcification. *J Mater Sci: Mater*. 1999; 10: 121–128. doi: 10.1023/a:1008925204988.
 28. Hulin A, Hego A, Lancellotti P, Oury C. Advances in Pathophysiology of Calcific Aortic Valve Disease Propose Novel Molecular Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med*. 2018; 5: 21. doi: 10.3389/fcvm.2018.00021.
 29. Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, Vyavahare NR. Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins. *Biomaterials*. 2006; 27: 3645–3651. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.016.

Статья поступила в редакцию 17.11.2020 г.
The article was submitted to the journal on 17.11.2020