



УДК 616.126

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-3-54-62

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛОВЫМ СПИРТОМ ЭПОКСИОБРАБОТАННОГО БЫЧЬЕГО ПЕРИКАРДА К КАЛЬЦИФИКАЦИИ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ДЕГРАДАЦИИ

А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, К.Ю. Клышников, М.А. Резвова, Т.Н. Акентьева,
П.С. Онищенко, Е.А. Овчаренко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Модификация эпоксиобработанного ксеноперикарда поливиниловым спиртом повышает его устойчивость к кальцификации и протеолитической деградации *in vitro*.
- Циклические нагрузки способствуют усталостному разрушению полимерного компонента модифицированного биоматериала, что сопровождается ухудшением его антикальциевых и антиферментных свойств. Требуется дополнительные исследования, которые следует нацелить на улучшение износостойкости гидрогеля, включенного в состав биоткани.

Цель

Изучить резистентность эпоксиобработанного бычьего перикарда, модифицированного криоструктурированным поливиниловым спиртом, к кальцификации и протеолитической деградации в коллагеназе после воздействия циклической нагрузки.

Материалы и методы

Эпоксиобработанные ксеноперикардальные лоскуты обрабатывали поливиниловым спиртом по оригинальной методике, после чего подвергали циклическому нагружению (70 млн циклов) в установке изучения циклостойкости HiCycle. Визуализацию поверхностной и внутренней структуры биоматериала выполняли посредством сканирующей электронной микроскопии. Резистентность образцов к кальцификации оценивали путем их инкубации в растворе, насыщенном ионами кальция и фосфат-ионами, в течение 3 и 6 нед. с последующим количественным измерением содержания кальция спектрофотометрическим методом. Подверженность образцов протеолитическому расщеплению определяли по потере массы после инкубации в растворе клостридиальной коллагеназы в течение 24 ч. Группой контроля при тестировании антикальциевых и антиферментных свойств модифицированной ткани выступали фрагменты немодифицированного эпоксиобработанного бычьего перикарда.

Результаты

После циклического нагружения образцы модифицированного поливиниловым спиртом ксеноперикарда демонстрировали признаки усталостного повреждения полимерного компонента (наличие трещин на поверхности и крупных полостей во внутренней структуре). Несмотря на то что циклическая нагрузка значительно ухудшила резистентность модифицированной ткани к кальцификации и протеолитической деградации (в 3 и 5 раз соответственно относительно значений, полученных для хранившихся в статических условиях фрагментов), образцы из этой группы показали лучшие результаты по сравнению с образцами немодифицированного ксеноперикарда. Так, они содержали в полтора-два раза меньше кальция после 3 и 6 нед. инкубации в насыщенном кальцием растворе. Потеря массы после инкубации в коллагеназе также была в полтора раза ниже для подвергнутых циклическому нагружению фрагментов модифицированного биоматериала по сравнению с фрагментами контрольного.

Заключение

Разработанный нами метод модификации эпоксиобработанного ксеноперикарда поливиниловым спиртом увеличивает резистентность биологической ткани к кальцификации и протеолитической деградации. Хотя циклическая нагрузка со временем ухудшает защитные свойства полимерного покрытия,

Для корреспонденции: Александр Евгеньевич Костюнин, rhabdophis_tigrina@mail.ru; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Alexander E. Kostyunin, rhabdophis_tigrina@mail.ru; address: 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

этот вид обработки потенциально способен замедлить дегенерацию биоматериала, используемого в производстве биопротезов клапанов сердца.

Ключевые слова Биопротезы клапанов сердца • Структурная дегенерация клапана • Протеолиз • Кальцификация • Поливиниловый спирт

Поступила в редакцию: 10.04.2024; поступила после доработки: 01.05.2024; принята к печати: 31.05.2024

IMPACT OF CYCLIC LOADING ON THE RESISTANCE OF EPOXY-TREATED BOVINE PERICARDIUM MODIFIED WITH POLYVINYL ALCOHOL TO CALCIFICATION AND PROTEOLYTIC DEGRADATION

A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, K.Yu. Klyshnikov, M.A. Rezvova, T.N. Akentyeva, P.S. Onishchenko, E.A. Ovcharenko

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- Epoxy-treated xenopericardium modified with polyvinyl alcohol has increased resistance to calcification and proteolytic degradation *in vitro*.
- Cyclic loads negatively affect fatigue life of studied material, moreover, this process is accompanied by deterioration of its anti-calcium and anti-enzyme properties. Additional studies aimed at improving the wear resistance of the hydrogel in the biological material are required.

Aim	To study the resistance of epoxy-treated bovine pericardium modified with polyvinyl alcohol to calcification and proteolytic degradation in collagenase after exposure to cyclic loading.
Methods	The epoxy-treated patches made with xenopericardium were treated with polyvinyl alcohol according to the original method, after that they were subjected to cyclic loading (70 million cycles) using the HiCycle wear tester system. Visualization of the surface and internal structure of the biomaterial was performed by scanning electron microscopy. The resistance to calcification was assessed by incubating the samples in a solution saturated with calcium ions and phosphate ions for 3 and 6 weeks, followed by quantitative measurement of the calcium by spectrophotometry. The susceptibility of the samples to proteolytic degradation was determined by weight loss after incubation in a solution of clostridial collagenase for 24 hours. The control group consisted of patches of unmodified epoxy-treated bovine pericardium.
Results	After cyclic loading, patches of xenopericardium modified with polyvinyl alcohol showed signs of fatigue (cracks on the surface and large cavities in the internal structure). Although cyclic loading significantly worsened the resistance of the modified tissue to calcification and proteolytic degradation (by 3 and 5 times, respectively, relative to the values obtained for patches stored under static conditions), patches from this group showed better results compared to unmodified patches. Thus, they contained 1.5 to 2 times less calcium after 3 and 6 weeks of incubation in a calcium-saturated solution. Mass loss after incubation in collagenase was 1.5 times lower for patches of modified biomaterial undergoing cyclic loading compared to unmodified patches.
Conclusion	The proposed modification method of the epoxy-treated xenopericardium with polyvinyl alcohol increases the resistance of biological tissue to calcification and proteolytic degradation. Although cyclic loading negatively affects the protective properties of the polymer coating over time, this type of modification can potentially slow down the degeneration of biomaterial used in manufacturing of bioprosthetic heart valves.
Keywords	Bioprosthetic heart valves • Structural valve degeneration • Proteolysis • Calcification • Polyvinyl alcohol

Received: 10.04.2024; received in revised form: 01.05.2024; accepted: 31.05.2024

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Список сокращений

БП – биологические протезы СД – структурная дегенерация
 ПВС – поливиниловый спирт

Введение

В последние десятилетия наблюдается увеличение распространенности приобретенных пороков сердца, что связано с демографическим старением населения [1]. Соответствующим образом растет и число пациентов, которые нуждаются в протезировании несостоятельных клапанов сердца. Уже сейчас в мире ежегодно выполняют более 400 тыс. таких операций, тогда как к 2050 г. эксперты прогнозируют двукратное увеличение их количества [1, 2].

При протезировании пораженных клапанов сердца у пациентов старшей возрастной группы (> 65 лет) зачастую применяют биологические протезы (БП), изготовленные из тканей животного происхождения (химически стабилизированного бычьего, свиного или лошадиного перикарда, а также аортальных комплексов свиньи) [3]. Ввиду низкой тромбогенности БП не требуют назначения реципиентам пожизненной антикоагулянтной терапии, чем выгодно отличаются от аналогов – механических протезов [4, 5]. В то же время долговечность БП ограничена: через 15 лет функционирования до 50% имплантатов этого типа требуют замены по причине структурной дегенерации (СД) их биологического элемента [4, 5].

Ключевыми проявлениями СД являются перфорирование, разрывы и кальцификация створчатого аппарата БП, которые приводят к гемодинамической несостоятельности клапана [6]. В соответствии с современными представлениями в качестве одного из наиболее значимых факторов развития СД выступает протеолитическая деградация биологического материала, способствующая нарушению целостности его коллагеновой основы и осаждению кальция на поврежденных участках [7]. Протеолиз БП обусловлен поступлением в биоматериал протеза матриксных металлопротеиназ и катепсинов из крови реципиента и от иммунных клеток, инфильтрирующих имплантат [8, 9]. Следует отметить, что в настоящее время исследователи и производители БП уделяют мало внимания проблеме аккумуляции протеаз в тканях клапанов. Между тем предотвращение взаимодействия ферментов крови с биоматериалом потенциально способно продлить сроки функционирования БП и снизить риск возникновения дисфункций этих медицинских изделий.

Перспективным методом, призванным устранить влияние циркулирующих факторов реципиента на БП, является связывание биологической ткани с биосовместимыми полимерами для включения в ее структуру полимерного геля [10]. В рамках обсуждаемого направления нашей командой разработана

оригинальная модификация эпоксиобработанного бычьего перикарда криоструктурированным поливиниловым спиртом (ПВС), которая повысила устойчивость биоматериала к кальцификации *in vitro*, не ухудшая его механические и гемосовместимые свойства [11]. ПВС образует поверхностный слой на биоматериале, а также заполняет пространство между коллагеновыми волокнами в его толще, выступая в качестве физической преграды для растворенных в крови химических соединений (включая протеазы и ионы кальция). В настоящей работе мы продолжили изучение потенциальных преимуществ предложенного метода обработки биоткани, для чего произвели *in vitro* оценку устойчивости ПВС-модифицированного ксеноперикарда к кальцификации и протеолитической деградации коллагена до и после воздействия циклической нагрузки. Полученные данные позволяют прогнозировать изменение антикальциевых и антиферментных свойств рассматриваемого материала при длительном функционировании БП в организме реципиента.

Материалы и методы

Исследуемый биоматериал

Материалом для исследования стали фрагменты стабилизированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля ксеноперикардальных лоскутов «Кем-ПерипласНео» (KPi7080M, ЗАО «НеоКор», Россия) толщиной 0,6–0,7 мм, обработанные 12% водным раствором ПВС согласно ранее описанной оригинальной методике [11]. В роли группы контроля при оценке антикальциевых и антиферментных свойств ПВС-модифицированного биоматериала использовали фрагменты немодифицированных ксеноперикардальных лоскутов.

Тестирование циклостойкости полимерного компонента ПВС-модифицированного ксеноперикарда

Для оценки циклостойкости ПВС из лоскутов модифицированного перикарда вырезали фрагменты диаметром 4,5 см. Далее их фиксировали в специальных формах, которые крепили в установке исследования циклостойкости HiCycle (ViVitro Labs, Канада) согласно методике, описанной F. Stieglmeier с соавт. [12]. Формы для фиксации образцов были изготовлены из полилактида (4627095770265, REC) методом послойного наплавления (FDM) на 3D-принтере CreateBot D600 (CreateBot, Китай) (рис. 1).

Исследование проводили с частотой 20 Гц (20

ударов в секунду) в течение 70 млн циклов, что соответствует двум годам функционирования БП в организме реципиента. Во время испытаний образцы находились при 37 °C в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида с добавлением антибиотика/антимикотика (15240062, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 1:50. Среднее пиковое давление, воздействующее на образцы, было установлено на уровне 120 мм рт. ст. для имитации артериального давления человека.

После завершения испытаний из лоскутов перикарда с помощью специального ножа вырубали фрагменты квадратной формы площадью 0,25 и 1 см² для оценки антикальциевых и антиферментных свойств соответственно. Часть фрагментов использовали для анализа сохранности их поверхностной и внутренней структуры (см. ниже).

Визуализация поверхности и внутренней структуры исследуемых образцов

С целью визуализации поверхностной и внутренней структуры ПВС-модифицированного биоматериала после циклического нагружения применяли метод сканирующей электронной микроскопии. Для этого подготавливали фрагменты ксеноперикарда площадью 1 см², а также криосрезы толщиной 14 мкм, размещаемые на предметные стекла (оценка поверхностной и внутренней структуры соответственно). Последние готовили с использованием микротом-криостата HM 525 (Thermo Scientific, США). Далее образцы отмывали в бидистиллированной воде в течение 2 ч, замораживали при –80 °C и сутки лиофилизировали в установке FreeZone 2.5

Plus (Labconco, США) при –40 °C и давлении менее 0,04 мбар. Затем образцы монтировали на специальные столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее (Au-Pd) покрытие при использовании системы EM ACE200 (Leica Microsystems, Германия). Визуализацию и анализ сохранности структуры образцов проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ в режиме вторичных электронов.

Тестирование образцов на подверженность кальцификации

Чтобы изучить подверженность исследуемых образцов биоматериала кальцификации, их инкубировали в растворе, имитирующем физиологическую среду организма с повышенным уровнем ионов кальция и фосфатов. Для этого по 10 фрагментов биоматериала из группы контроля и двух групп ПВС-модифицированного ксеноперикарда (без и после циклического нагружения) площадью 0,25 см² помещали индивидуально в 2 мл раствора, содержащего 10 ммоль кальция. Инкубацию осуществляли при 37 °C в углекислотном инкубаторе с экспозицией 3 и 6 нед. При приготовлении раствора использовали 1,65 мл питательной среды для выращивания клеточных культур (D0697, Sigma-Aldrich, США), 0,20 мл эмбриональной бычьей сыворотки (F2442, Sigma-Aldrich, США), 0,1 мл моногидрофосфата натрия и 0,05 мл кальция хлорида.

Количественное содержание кальция в образцах определяли спектрофотометрическим методом. С этой целью образцы лиофилизировали в течение суток, далее измеряя их массу. После их подвергали гидролизу в 0,5 мл 65% хлорной кислоты при температуре 160–180 °C на песчаной бане LH-402 (Loip, Россия) до полного растворения. Объем полученной смеси доводили до 5 мл стерильной водой для инъекций. Количество кальция в растворе определяли на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 575 нм с использованием коммерческого набора Calcium Assay Kit (ab102505, Abcam, Великобритания) согласно протоколу производителя.

Тестирование образцов на подверженность протеолитической деградации

Исследование образцов на подверженность протеолитической деградации выполняли путем их инкубации в трис-буфере (Трис 0,1 моль/л, CaCl₂ 0,05 моль/л, pH 7,4), содержащем 125 ЕД/мл клостридиальной коллагеназы I типа (C0130-500MG, Sigma-Aldrich, США). При этом использовали по 10 фрагментов биоматериала из группы контроля и двух групп ПВС-модифицированного ксеноперикарда (без и после циклического нагружения) площадью 1 см².

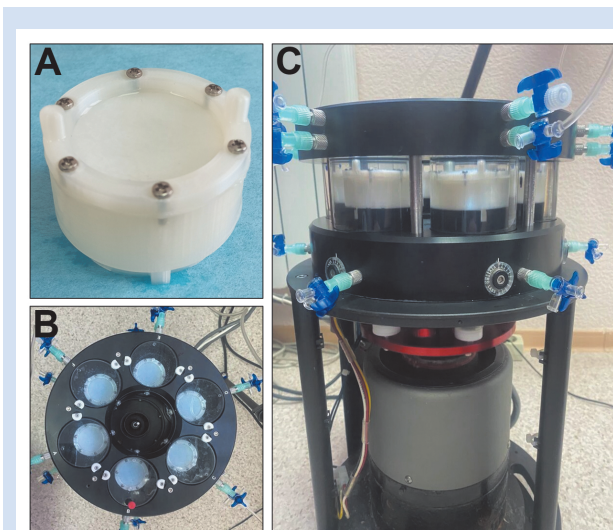


Рисунок 1. Оборудование, использованное для выполнения циклического нагружения исследуемых образцов биоматериала: **A** – форма для крепления лоскутов ксеноперикарда с закрепленным в ней исследуемым образцом; **B, C** – установка исследования циклостойкости HiCycle с закрепленными лоскутами ксеноперикарда (вид сверху и сбоку соответственно)
Figure 1. Equipment used for durability testing: **A** – a fixture for securing xenopericardial patches with the test sample attached; **B, C** – HiCycle fatigue testing machine with xenopericardial patches secured (top and side views, respectively)

Образцы инкубировали при 37 °С и постоянном перемешивании в течение 24 ч. После этого в течение суток производили отмывку от разрушенных фрагментов биоматериала в растворе трис-буфера с этилендиаминтетрауксусной кислотой при комнатной температуре с двукратной сменой раствора. Перед началом инкубации и после ее завершения фрагменты биоматериала лиофилизировали и взвешивали, а степень протеолитической деградации оценивали по потере массы в % от исходной массы сухого образца. Для фрагментов ПВС-модифицированного ксеноперикарда применена поправка на массу полимера (поскольку ПВС не подвержен действию коллагеназы), которая составляет 24% массы образца.

Статистический анализ

Статистическая обработка данных выполнена в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Тип распределения данных определяли по критерию Колмогорова – Смирнова. Поскольку распределение в группах отличалось от нормального, данные представлены в виде медианы, процентилей, минимальных и максимальных значений (Me [25–75%; min-max]). 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

Визуальная оценка лоскутов ПВС-модифицированного ксеноперикарда, подвергнутых циклическому нагружению, не показала макроскопически видимых дефектов. Тем не менее дальнейшее их изучение посредством сканирующей электронной микроскопии показало признаки усталостного повреждения полимерного компонента (рис. 2). Последние были представлены микротрещинами в покрывающем поверхность биоматериала гидрогеле, которые не были характерны для контрольных ПВС-модифицированных образцов, хранившихся в статических условиях. Также тестируемые на циклоустойкость лоскуты имели рыхлую внутреннюю структуру, отличающуюся от таковой контрольных образцов присутствием большего количества полостей в межфибрилярном пространстве.

Оценка антикальциевых и антиферментных свойств ПВС-модифицированного бычьего перикарда продемонстрировала негативное влияние циклической нагрузки на защитные характеристики предложенного нами метода обработки биоматериала. Так, фрагменты ПВС-модифицированной ткани, полученные от подвергнутых циклическому нагружению лоскутов, содержали значительно больше кальция через 3 и 6 нед. инкубации в на-

сыщенном кальцием растворе, чем образцы с аналогичной обработкой, но хранившиеся в статических условиях (4,43 [3,03–5,73; 0,7–8,13] против 1,52 [1,26–1,8; 1,04–3,18] мг/г ($p = 0,037$) и 14,96 [13,32–17,24; 11,33–21,02] против 7,37 [5,84–8,11; 5,72–8,57] мг/г соответственно ($p = 0,002$)) (рис. 3). Сходная тенденция выявлена и в отношении потери массы при инкубации в коллагеназе: после циклического нагружения фрагменты ПВС-модифицированного перикарда теряли 5,7 [5,08–5,96; 4,42–6,23] % массы, тогда как не испытывавшие механического воздействия фрагменты – только 1,17 [0–2,67; 0–3,64] % ($p = 0,012$) (рис. 4).

Необходимо отметить, что в обоих вышеупомянутых экспериментах подвергавшиеся циклической нагрузке образцы ПВС-модифицированной ткани показали лучшие результаты по сравнению с образцами немодифицированного эпоксиобработанного ксеноперикарда. В частности, первые содержали в полтора-два раза меньше кальция, чем вторые, в двух временных точках инкубации (4,43 [3,03–5,73;

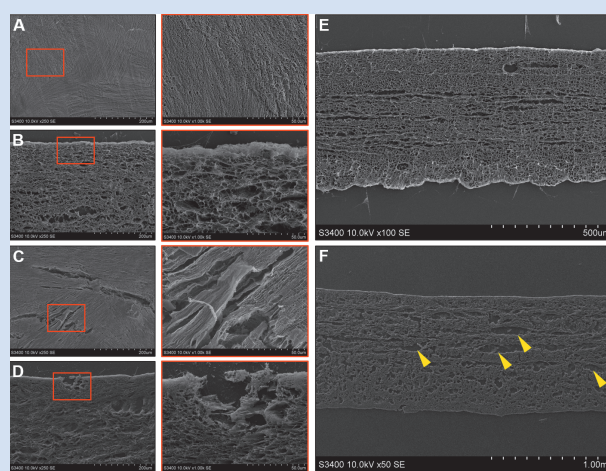


Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия модифицированных поливиниловым спиртом фрагментов ксеноперикарда без и после циклического нагружения, соответствующего двум годам функционирования биопротеза клапана *in vivo*: **A, B** (поверхность и срез соответственно) – структура контрольного, не подвергавшегося циклической нагрузке, образца; **C, D** (поверхность и срез соответственно) – структура образца после циклического нагружения (обращает внимание повреждение полимерного покрытия); **E** – внутренняя структура модифицированного перикарда, не подвергавшегося циклической нагрузке; **F** – внутренняя структура модифицированного перикарда после циклического нагружения (обращает внимание более рыхлое заполнение гидрогелем межфибрилярного пространства биоткани с присутствием многочисленных полостей – отмечены желтыми стрелками)

Figure 2. Scanning electron microscopy of xenopericardial fragments modified with polyvinyl alcohol before and after cyclic loading equivalent to two years of valve bioprosthesis functioning *in vivo*: **A and B** (surface and cross-section, respectively) – structure of the control sample not subjected to cyclic loading; **C and D** (surface and cross-section, respectively) – structure of the sample after cyclic loading. Note the damaged polymer coating; **E** – internal structure of the modified pericardium not subjected to cyclic loading; **F** – internal structure of the modified pericardium after cyclic loading. Note the looser filling of the inter-fibrillar space of the biotissue with hydrogel, with numerous voids present (indicated by yellow arrows)

0,7–8,13] против 8,22 [7,25–9,21; 6,63–10,38] мг/г ($p = 0,016$) через 3 нед. и 14,96 [13,32–17,24; 11,33–21,02] против 23,07 [17,96–24,0; 14,04–25,32] мг/г ($p = 0,019$) через 6 нед. инкубации в насыщенном кальцием растворе). Потеря массы при воздействии коллагеназы на ПВС-модифицированный биоматериал после циклического нагружения также была в полтора раза ниже по сравнению с неизменной тканью (5,7 [5,08–5,96; 4,42–6,23] против 9,67 [9,41–10,51; 8,98–12,30] % ($p = 0,012$)).

Обсуждение

Клапаны сердца и их БП подвержены циклическим нагрузкам. Каждый клапан открывается и закрывается приблизительно 40 млн раз в течение года [13]. В ходе сердечного цикла на створчатый аппарат действуют механические нагрузки, обусловленные пристеночным напряжением сдвига при открытом положении клапана, изгибными деформациями ткани, возникающими во время его открытия и закрытия, а также натяжением створок под действием обратного давления крови при их закрытом положении [14]. Циклические нагрузки неизбежно приводят к развитию усталостных повреждений в створчатом аппарате БП, что предъявляет высокие требования к прочности и износостойкости материала, из которого он изготовлен.

Предложенный нашей группой метод модификации биоткани криоструктурированным ПВС основан на включении гидрогеля в структуру последней [11]. Гидрогель формирует слой на поверх-

ности биоматериала и обволакивает коллагеновые волокна в его толще, препятствуя поступлению во внеклеточный матрикс модифицированной ткани веществ из окружающей жидкости. Потенциально этот подход может решить проблему аккумуляции в створках БП циркулирующих в крови прокальцифицирующих и матрикс-деградирующих факторов реципиента, таких как ионы кальция, кальций-связывающие остеогенные белки, липиды крови и матриксные металлопротеиназы [8, 9, 15]. Впрочем необходимо принять во внимание, что ПВС-гидрогель проявляет барьерные свойства по отношению к растворенным в крови веществам только при сохранении своей структурной целостности [11].

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что циклическое нагружение ПВС-модифицированного перикарда ведет к значительному усталостному разрушению его полимерной составляющей уже после 70 млн циклов, что эквивалентно всего двум годам функционирования БП в организме реципиента. При этом мы наблюдали резкое снижение эффективности рассматриваемой модификации: согласно данным тестирования *in vitro*, резистентность обработанного ПВС биоматериала к кальцификации и протеолизу после циклического нагружения снижалась в 3 и 5 раз соответственно по сравнению с исходными значениями. Из этого следует, что потенциальные преимущества предложенной технологии при ее использовании в производстве БП могут быть реализованы лишь в первые 2–3 года функционирования имплантатов.

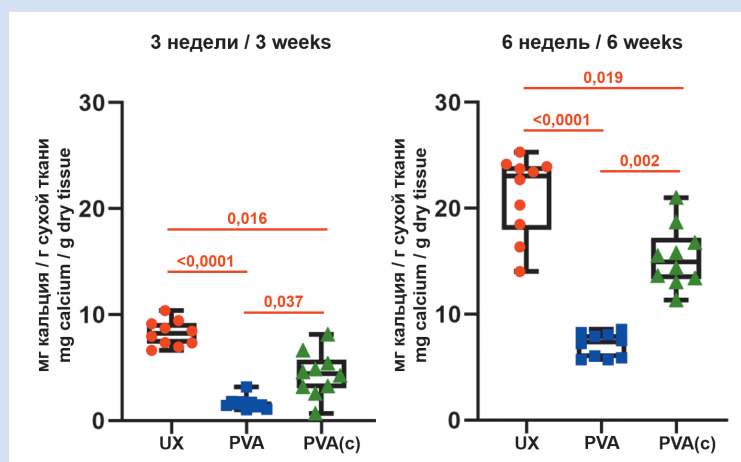


Рисунок 3. Количественная оценка содержания кальция в исследуемых образцах после 3 и 6 нед. инкубации в насыщенном кальцием растворе: UX – немодифицированный эпоксиобработанный ксеноперикард; PVA – ксеноперикард, обработанный поливиниловым спиртом и хранившийся в статических условиях; PVA(c) – ксеноперикард, обработанный поливиниловым спиртом и подвергнутый циклическому нагружению, соответствующему двум годам функционирования биологического протеза клапана *in vivo*

Figure 3. Quantitative assessment of calcium content in the tested samples after three and six weeks of incubation in a calcium-saturated solution: UX – unmodified epoxy-treated xenopericardium; PVA – xenopericardium treated with polyvinyl alcohol and stored under static conditions; PVA(c) – xenopericardium treated with polyvinyl alcohol and subjected to cyclic loading equivalent to two years of *in vivo* functioning of a biological valve prosthesis

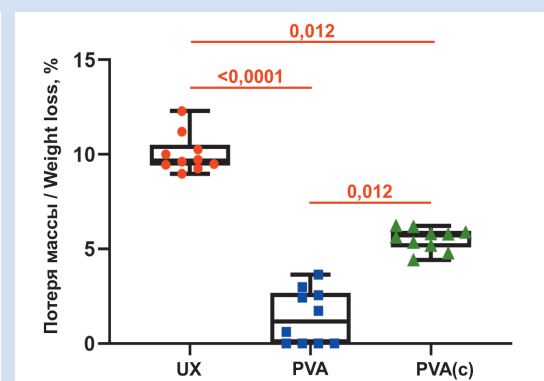


Рисунок 4. Потери сухой массы исследуемых образцов после 24 ч инкубации в растворе клостридиальной коллагеназы I типа: UX – немодифицированный эпоксиобработанный ксеноперикард; PVA – ксеноперикард, обработанный поливиниловым спиртом и хранившийся в статических условиях; PVA(c) – ксеноперикард, обработанный поливиниловым спиртом и подвергнутый циклическому нагружению, соответствующему двум годам функционирования биологического протеза клапана *in vivo*

Figure 4. Dry mass loss of the tested samples after 24 hours of incubation in a type I clostridial collagenase solution: UX – unmodified epoxy-treated xenopericardium; PVA – xenopericardium treated with polyvinyl alcohol and stored under static conditions; PVA(c) – xenopericardium treated with polyvinyl alcohol and subjected to cyclic loading equivalent to two years of *in vivo* functioning of a biological valve prosthesis

Низкая износостойкость полимерного компонента ПВС-модифицированной биоткани не позволяет рекомендовать описанную нами методику к внедрению в производство БП, по крайней мере в текущем исполнении [11]. Тем не менее нами получено экспериментальное подтверждение эффективности концепции включения в состав ксеноперикарда полимерного геля для профилактики кальцификации и протеолитической деградации, что позволяет сфокусировать дальнейшие исследования на разработке различных вариантов такого рода модификации. В частности, решить проблему недостаточной прочности и износостойкости гидрогеля на основе ПВС может изменение протокола гелеобразования, например путем увеличения числа циклов замораживания/оттаивания [16, 17]. Другим направлением исследований, нацеленных на повышение прочности ПВС-гидрогеля, может стать включение в его состав углеродных нанотрубок или комбинирование с другими полимерами [18, 19].

Заключение

Разработанная нашей командой модификация эпоксиобработанного бычьего перикарда криоструктурированным ПВС снижает кальцификацию

биоматериала и его протеолитическую деградацию в коллагеназе при тестировании *in vitro*. Тем не менее полимерный компонент модифицированной ткани неустойчив к действию циклических нагрузок, что значительно ухудшает его антикальциевые и антиферментные свойства. Таким образом, требуются дополнительные исследования, которые следует нацелить на улучшение износостойкости ПВС-гидрогеля, включенного в состав биологической ткани.

Конфликт интересов

А.Е. Костюнин заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.В. Глушкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. К.Ю. Клышников заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.А. Резова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.Н. Акентьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. П.С. Онищенко заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Овчаренко заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

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

Информация об авторах

Костюнин Александр Евгеньевич, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Глушкова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Клышников Кирилл Юрьевич, кандидат медицинских наук научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-3211-1250

Резова Мария Александровна, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4405-8904

Акентьева Татьяна Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0033-9376

Author Information Form

Kostyunin Alexander E., PhD, Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6099-0315

Glushkova Tatyana V., PhD, Senior Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4890-0393

Klyshnikov Kirill Yu., PhD, Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-3211-1250

Rezova Maria A., Junior Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4405-8904

Akentyeva Tatyana N., Junior Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0033-9376

Онищенко Павел Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2404-2873

Овчаренко Евгений Андреевич, кандидат технических наук заведующий лабораторией новых биоматериалов отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-7477-3979

Onishchenko Pavel S., Junior Researcher at the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2404-2873

Ovcharenko Evgeny A., PhD, Head of the Laboratory of New Biomaterials, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-7477-3979

Вклад авторов в статью

КАЕ – вклад в дизайн исследования, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГТВ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ККЮ – получение, анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

РМА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

АТН – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ОПС – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ОЕА – вклад в дизайн исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

КАЕ – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

ГТВ – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ККЮ – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

РМА – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

АТН – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ОПС – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ОЕА – contribution to the design of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Velho T.R., Pereira R.M., Fernandes F., Guerra N.C., Ferreira R., Nobre Á. Bioprosthetic aortic valve degeneration: a review from a basic science perspective. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2022; 37(2):239-250. doi:10.21470/1678-9741-2020-0635
2. Bax J.J., Delgado V. Bioprosthetic heart valves, thrombosis, anticoagulation, and imaging surveillance. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2017; 10(4):388-390. doi:10.1016/j.jcin.2017.01.017
3. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P., Gentile F., Jneid H., Krieger E.V. 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. doi:10.1161/CIR.0000000000000923
4. Pibarot P., Dumesnil J.G. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009; 119(7):1034-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886
5. Tillquist M.N., Maddox T.M. Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Preference and Adherence*. 2011; 17(5):91-99. doi:10.2147/PPA.S16420
6. Dvir D., Bourguignon T., Otto C.M., Hahn R.T., Rosenhek R., Webb J.G., Treede H., Sarano M.E. et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018; 137(4):388-399. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729
7. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A., Glushkova T.V., Kutikhin A.G. Degeneration of bioprosthetic

heart valves: update 2020. *Journal of the American Heart Association*. 2020; 9(19):e018506. doi:10.1161/JAHA.120.018506

8. Shetty R., Pibarot P., Audet A., Janvier R., Dagenais F., Perron J., Couture C., Voisine P., Després J.P., Mathieu P. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009; 39(6):471-480. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x

9. Simionescu A., Simionescu D.T., Deac R.F. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovascular Pathology*. 1996; 5(6):323-332. doi:10.1016/s1054-8807(96)00043-9

10. Ding K., Zheng C., Huang X., Zhang S., Li M., Lei Y., Wang Y. 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 Biomaterialia*. 2022; 144:279-291. doi:10.1016/j.actbio.2022.03.026

11. Костюнин А.Е., Резцова М.А., Глушкова Т.В., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г., Аментьева Т.Н., Овчаренко Е.А. Модификация поливиниловым спиртом эпоксиобработанного ксеноперикарда повышает его резистентность к кальцификации *in vitro*. *Трансплантология* 2023; 15(1):34-45. doi:10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45.

12. Stieglmeier F., Grab M., König F., Büch J., Hagl C., Thierfelder N. Mapping of bovine pericardium to enable a standardized acquirement of material for medical implants. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2021; 118:104432. doi:10.1016/j.jmbbm.2021.104432

13. Dalgliesh A.J., Parvizi M., Noble C., Griffiths L.G. Effect of cyclic deformation on xenogeneic heart valve biomaterials. *PLoS One*. 2019; 14(6):e0214656. doi:10.1371/journal.pone.0214656

14. Soares J.S., Feaver K.R., Zhang W., Kamensky D., Aggarwal A., Sacks M.S. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc Eng Technol*. 2016; 7(4):309-351. doi:10.1007/s13239-016-0276-8

15. Shen M., Marie P., Farge D., Carpentier S., De Pollak C., Hott M., Chen L., Martinet B., Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*. 1997; 320(1):49-57. doi:10.1016/s0764-4469(99)80086-9

16. Nkhwa S., Kemal E., Gurav N., Deb S. Dual polymer networks: a new strategy in expanding the repertoire of hydrogels

for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019; 30:114. doi:10.1007/s10856-019-6316-9

17. Pazos V., Mongrain R., Tardif J.C. Polyvinyl alcohol cryogel: optimizing the parameters of cryogenic treatment using hyperelastic models. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2009; 2(5):542-549. doi:10.1016/j.jmbbm.2009.01.003

18. Tong X., Zheng J., Lu Y., Zhang Z., Cheng H. Swelling and mechanical behaviors of carbon nanotube/poly(vinyl alcohol) hybrid hydrogels. *Materials Letters*. 2007; 61(8-9):1704-1706. doi:10.1016/j.matlet.2006.07.115

19. Zheng Q., Javadi A., Sabo R., Cai Z., Gong S. Polyvinyl alcohol (PVA)-cellulose nanofibril (CNF)-multiwalled carbon nanotube (MWCNT) hybrid organic aerogels with superior mechanical properties. *RSC Advances*. 2013; 3(43):20816 doi:10.1039/c3ra42321b

REFERENCES

1. Velho T.R., Pereira R.M., Fernandes F., Guerra N.C., Ferreira R., Nobre Â. Bioprosthetic aortic valve degeneration: a review from a basic science perspective. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2022; 37(2):239-250. doi:10.21470/1678-9741-2020-0635

2. Bax J.J., Delgado V. Bioprosthetic heart valves, thrombosis, anticoagulation, and imaging surveillance. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2017; 10(4):388-390. doi:10.1016/j.jcin.2017.01.017

3. Otto C.M., Nishimura R.A., Bonow R.O., Carabello B.A., Erwin J.P., Gentile F., Jneid H., Krieger E.V. 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. doi:10.1161/CIR.0000000000000923

4. Pibarot P., Dumesnil J.G. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009; 119(7):1034-1048. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886

5. Tillquist M.N., Maddox T.M. Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement. *Patient Preference and Adherence*. 2011; 17(5):91-99. doi:10.2147/PPA.S16420

6. Dvir D., Bourguignon T., Otto C.M., Hahn R.T., Rosenhek R., Webb J.G., Treede H., Sarano M.E. et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018; 137(4):388-399. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729

7. Kostyunin A.E., Yuzhalin A.E., Rezvova M.A., Ovcharenko E.A., Glushkova T.V., Kutikhin A.G. Degeneration of bioprosthetic heart valves: update 2020. *Journal of the American Heart Association*. 2020; 9(19):e018506. doi:10.1161/JAHA.120.018506

8. Shetty R., Pibarot P., Audet A., Janvier R., Dagenais F., Perron J., Couture C., Voisine P., Després J.P., Mathieu P. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009; 39(6):471-480. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x

9. Simionescu A., Simionescu D.T., Deac R.F. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovascular Pathology*. 1996; 5(6):323-332. doi:10.1016/s1054-8807(96)00043-9

10. Ding K., Zheng C., Huang X., Zhang S., Li M., Lei Y., Wang Y. 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 Biomaterialia*. 2022; 144:279-291. doi:10.1016/j.actbio.2022.03.026

11. Kostyunin A.E., Rezvova M.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kutikhin A.G., Akentieva T.N., Ovcharenko E.A. Polyvinyl alcohol improves resistance of epoxy-treated bovine pericardium to calcification *in vitro*. *The Russian Journal of Transplantation*. 2023; 15(1):34-45. doi:10.23873/2074-0506-2023-15-1-34-45. (In Russian).

12. Stieglmeier F., Grab M., König F., Büch J., Hagl C., Thierfelder N. Mapping of bovine pericardium to enable a standardized acquirement of material for medical implants. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2021; 118:104432. doi:10.1016/j.jmbbm.2021.104432

13. Dalgliesh A.J., Parvizi M., Noble C., Griffiths L.G. Effect of cyclic deformation on xenogeneic heart valve biomaterials. *PLoS One*. 2019; 14(6):e0214656. doi:10.1371/journal.pone.0214656

14. Soares J.S., Feaver K.R., Zhang W., Kamensky D., Aggarwal A., Sacks M.S. Biomechanical behavior of bioprosthetic heart valve heterograft tissues: characterization, simulation, and performance. *Cardiovasc Eng Technol*. 2016; 7(4):309-351. doi:10.1007/s13239-016-0276-8

15. Shen M., Marie P., Farge D., Carpentier S., De Pollak C., Hott M., Chen L., Martinet B., Carpentier A. Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*. 1997; 320(1):49-57. doi:10.1016/s0764-4469(99)80086-9

16. Nkhwa S., Kemal E., Gurav N., Deb S. Dual polymer networks: a new strategy in expanding the repertoire of hydrogels for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019; 30:114. doi:10.1007/s10856-019-6316-9

17. Pazos V., Mongrain R., Tardif J.C. Polyvinyl alcohol cryogel: optimizing the parameters of cryogenic treatment using hyperelastic models. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2009; 2(5):542-549. doi:10.1016/j.jmbbm.2009.01.003

18. Tong X., Zheng J., Lu Y., Zhang Z., Cheng H. Swelling and mechanical behaviors of carbon nanotube/poly(vinyl alcohol) hybrid hydrogels. *Materials Letters*. 2007; 61(8-9):1704-1706. doi:10.1016/j.matlet.2006.07.115

19. Zheng Q., Javadi A., Sabo R., Cai Z., Gong S. Polyvinyl alcohol (PVA)-cellulose nanofibril (CNF)-multiwalled carbon nanotube (MWCNT) hybrid organic aerogels with superior mechanical properties. *RSC Advances*. 2013; 3(43):20816 doi:10.1039/c3ra42321b

Для цитирования: Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Клышников К.Ю., Резцова М.А., Акентьева Т.Н., Онищенко П.С., Овчаренко Е.А. Влияние циклической нагрузки на резистентность модифицированного поливиниловым спиртом эпоксиобработанного бычьего перикарда к кальцификации и протеолитической деградации. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2024;13(3): 54-62. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-54-62

To cite: Kostyunin A.E., Glushkova T.V., Klyshnikov K.Yu., Rezvova M.A., Akentyeva T.N., Onishchenko P.S., Ovcharenko E.A. Impact of cyclic loading on the resistance of epoxy-treated bovine pericardium modified with polyvinyl alcohol to calcification and proteolytic degradation. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024;13(3): 54-62. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-54-62