



УДК 616.12-089

DOI 10.17802/2306-1278-2025-14-4-77-89

СПОСОБ «СУХОГО» ХРАНЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОТЕЗОВ ДЛЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ

Ю.А. Кудрявцева, Е.А. Овчаренко, К.Ю. Клышников, В.Г. Матвеева, А.Ю. Каноныкина, Т.Н. Акентьева, П.С. Онищенко, О.Л. Барбараш

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

Основные положения

• Технология предимплантационного хранения биопротезов играет ключевую роль в профилактике послеоперационных осложнений в сердечно-сосудистой хирургии. Разработанный способ «сухого хранения» с применением глицерола позволяет исключить водную фазу, тем самым снижая риск повреждения коллагеновой матрицы при хранении и транспортировке биоматериала. Глицеролизация сохраняет ключевые физико-механические и гемосовместимые характеристики биоткани, не оказывая негативного влияния на ее биосовместимость.

ORIGINAL STUDIES

Цель

Разработка технологии «сухого хранения» биологической ткани с использованием глицерола и оценка эффективности технологии в эксперименте.

Материалы и методы

Ксеноперикардальные лоскуты, консервированные диглицидиловым эфиром этиленгликоля, предоставленные АО «НеоКор», погружали в 57%-ый раствор глицерина на 24 часа, затем выдерживали в вакуумной камере при отрицательном давлении 700 мбар в течение 6 часов. После полного высыхания лоскуты ксеноперикарда подвергали стерилизации этиленоксидом при температуре 37 °С. Оценивали: физико-механические, гемосовместимые, цитотоксические свойства, кальций связывающий потенциал биоматериала после этапа глицеризации, а также циклостойкость и гидродинамические характеристики в динамике до 200 млн. циклов.

Результаты

Процесс глицеролизации не оказал негативного влияния на свойства биоматериала. Относительно удлинение биоматериала увеличилось на 27,6% ($p = 0,02$), при этом жесткость биоткани не изменилась. При подкожной имплантации биоматериала крысам на сроках имплантации до 60 суток в образцах, обработанных глицерином, очагов кальцификации не обнаружено. Величина гемолиза эритроцитов после контакта с глицеролизированными образцами не превысила 0,2%, при допустимом показателе 2%. Процесс глицеролизации и последующей сушки не оказывает негативного влияния на тромбоциты и позволил значительно снизить цитотоксическое действие при условии кратковременной, в течение 5 минут, отмывки биоматериала в физ. растворе. Биопротезы клапана сердца «Юнилайн» 25 и 30 типоразмеров успешно прошли испытания в 200 млн. циклов. В тоже время для обоих протезов 19 размера отмечено исходно относительно высокие показатели среднего транспротезного градиента, которые увеличились в 3–4,7 раза к отметке 200 млн. циклов.

Заключение

Разработанная технология «сухого» хранения, основанная на глицеролизации биоматериала, не оказывает негативного влияния на физико-механические, био- и гемосовместимые свойства биопротезов, не вызывает кальцификации биоткани в эксперименте на лабораторных животных и не снижает устойчивость к циклическим нагрузкам в динамике до 200 млн. циклов.

Ключевые слова

Биопротезы • Сердечно-сосудистая хирургия • Глицерол • Гемосовместимость • Кальцификация • Циклостойкость • Гидродинамические показатели

Поступила в редакцию: 14.04.2025; поступила после доработки: 21.05.2025; принята к печати: 16.06.2025

Для корреспонденции: Юлия Александровна Кудрявцева, kudryavtseva_yulia@list.ru; адрес: бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Yulia A. Kudryavtseva, kudryavtseva_yulia@list.ru; address: 6, Academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

METHOD OF “DRY” STORAGE OF BIOLOGICAL PROSTHESES FOR CARDIOVASCULAR SURGERY

**Yu.A. Kudryavtseva, E.A. Ovcharenko, K.Yu. Klyshnikov, V.G. Matveeva, A.Yu. Kanonykina,
T.N. Akentyeva, P.S. Onishchenko, O.L. Barbarash**

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

Highlights

- The technology of pre-implantation storage of bioprostheses plays a key role in the prevention of postoperative complications in cardiovascular surgery. The developed method of “dry storage” using glycerol allows to exclude the aqueous phase, thereby reducing the risk of damage to the collagen matrix during storage and transportation of the biomaterial. Glycerolization preserves the basic physical, mechanical and hemocompatible characteristics of the biotissue, without having a negative effect on its biocompatibility.

Aim

Development of a technology for “dry storage” of biological tissue using glycerol and evaluation of the effectiveness of the technology in an experiment.

Methods

Xenopericardial patches preserved with ethylene glycol diglycidyl ether, provided by NeoCor JSC, were immersed in a 57% glycerol solution for 24 hours, then kept in a vacuum chamber at a negative pressure of 700 mbar for 6 hours. After complete drying, the xenopericardial flaps were sterilized with ethylene oxide at a temperature of 37 °C. The following were assessed: physicomachanical, hemocompatible, cytotoxic properties, calcium-binding potential of the biomaterial after the glycerolization stage, as well as cycle resistance and hydrodynamic characteristics in dynamics up to 200 million cycles.

Results

The glycerolization process did not have a negative effect on the properties of the biomaterial. Relative elongation of the biomaterial increased by 27.6% ($p = 0.02$), while the rigidity of the biotissue did not change. During subcutaneous implantation of the biomaterial in rats at implantation periods of up to 60 days, no calcification foci were found in the samples treated with glycerol. The amount of hemolysis of erythrocytes after contact with glycerolized samples did not exceed 0.2%, with an acceptable rate of 2%. The process of glycerolization and subsequent drying does not have a negative effect on platelets and made it possible to significantly reduce the cytotoxic effect, provided that the biomaterial is briefly washed in saline for 5 minutes. The Uniline heart valve bioprostheses of sizes 25 and 30 have successfully passed tests of 200 million cycles. At the same time, for both size 19 prostheses, initially relatively high values of the average transprosthetic gradient were noted, which increased by 3–4.7 times to the 200 ml cycles mark.

Conclusion

The developed technology of “dry” storage, based on glycerolization of biomaterial, does not have a negative effect on the physical and mechanical, bio- and hemocompatible properties of bioprostheses, does not cause calcification of biotissue in an experiment on laboratory animals and does not reduce resistance to cyclic loads in dynamics up to 200 million cycles.

Keywords

Bioprostheses • Cardiovascular surgery • Glycerol • Hemocompatibility • Calcification • Cycle resistance • Hydrodynamic parameters

Received: 14.04.2025; received in revised form: 21.05.2025; accepted: 16.06.2025

Список сокращений

АДФ – аденозиндифосфат

БТП – бедная тромбоцитами плазма

НАТ – гипоксантин, аминоптерин, тимидин

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

Введение

При хирургическом лечении врожденных и приобретенных пороков сердца, а также в сосудистой хирургии активно и успешно применяют

биологические протезы из тканей животного происхождения [1–5]. У биологических протезов есть ряд преимуществ перед искусственными заменителями из синтетических материалов – низкий

риск тромбозомболических осложнений, протезного эндокардита, острых дисфункций, а также отсутствует необходимость в пожизненном приеме антикоагулянтов [6–8]. Длительность и успешность функционирования биопротеза в организме пациента зависит от многих факторов, и частности, от технологий консервации биоматериала и предимплантационного хранения [8].

Доставка биологических протезов в сердечно-сосудистые центры и хранение до момента имплантации пациенту, в большинстве случаев, осуществляется в различных растворах – глутаровый альдегид [9], 2-3-бис(гидроксиметил)-хиноксалин-1,4-диоксид [10], парабены [11] и т.п. Применение водных растворов требует строгого соблюдения температурного режима, т.к. температура ниже +5 °C может приводить к образованию кристаллов льда, и, как следствие, к риску повреждения коллагеновой матрицы биопротеза и стать причиной дисфункции биопротеза в отдаленной послеоперационном периоде. Помимо этого, при хранении в растворе консерванта или его аналогов, перед имплантацией необходима тщательная и длительная отмывка биопротеза от консервирующего раствора. Данный этап предимплантационной подготовки увеличивает время наркоза и искусственного кровообращения. В связи с этим, разработка технологий предимплантационной обработки и хранения биопротезов для сердечно-сосудистой хирургии с целью снижения риска повреждения биопротеза и сокращению времени подготовки к имплантации остается актуальной в настоящее время. В связи с этим разработка технологии «сухого хранения» без использования водной фазы представляет актуальное направление, способное упростить логистику, сократить время подготовки и снизить риски деградации материала.

В разработке биопротезов нашел свое применение глицерол/глицерин, который используется как для консервации тканей, так и для длительного хранения предварительно обработанного биоматериала. Разработаны технологии консервации в растворе глицерола различных тканей для применения в сердечно-сосудистой хирургии [12–15]. Глицерол также применяли для консервации и хранения сосудистых заменителей в эксперименте на крысах [15]. Известно о применении глицерола для длительного хранения биопротезов, в том числе и для транскатетерной имплантации [14].

Таким образом, **целью настоящего исследования** стало разработка технологии «сухого хранения» биологической ткани с использованием глицерола и оценка эффективности технологии в эксперименте.

Материалы и методы

Эксперименты проводили с использованием ксеноперикардальных лоскутов крупного рогато-

го скота, консервированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля, предоставленные АО «НеоКор» (Кемерово, Россия). Ксеноперикардальные лоскуты предварительно отмывали трижды в течение 15 мин 3-х кратным количеством дистиллированной воды. Далее лоскуты подвергали глицеролизации по разработанной технологии [16], для чего биоматериал погружали в 57%-ый раствор глицерола на 24 часа. После завершения процесса глицеролизации образцы биоматериала выдерживали в вакуумном эксикаторе (камере) при отрицательном давлении 700 мбар при комнатной температуре в течение 6 часов. После полного высыхания лоскуты ксеноперикарда помещали в двойную упаковку для стерилизации и подвергали стерилизации этиленоксидом при температуре 37 °C.

В качестве контроля использовали ксеноперикардальные лоскуты без дополнительного этапа глицеролизации.

Оценка физико-механических свойств

Испытания биоматериала проведены на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), с использованием датчика с номинальной силой 50 Н с пределом допустимой погрешности $\pm 1\%$, скорость перемещения траверсы при испытании 50 мм/мин. Предел прочности материала оценивали, как максимальное напряжение при растяжении (МПа) до начала разрушения. Упруго-деформативные свойства материала оценивали по относительному удлинению до начала разрушения образца (%) и модулю Юнга (МПа), который определяли в диапазонах физиологического давления (80–120 мм рт. ст.).

Оценка гемосовместимости глицеролизованных лоскутов ксеноперикарда

Определение величины гемолиза эритроцитов

Оценку гемолиза эритроцитов проводили после контакта с поверхностью глицеролизованных образцов ксеноперикарда. Для этого использовали свежую донорскую кровь с добавлением 3,8% цитрата натрия в соотношении 1:9 (цитрат: кровь). Исследуемые образцы размером 25 см² в количестве 10 шт. для каждого вида материала помещали в полипропиленовые емкости (бюксы), содержащие 10 мл физиологического раствора. Бюксы ставили в термостат на 120 мин. при температуре 37 °C. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали физиологический раствор и дистиллированную воду, соответственно. Через два часа после инкубации в каждый бюкс добавляли по 200 мкл цитратной крови и снова помещали в термостат на один час при 37 °C. После инкубации полимерные образцы изымали из бюксов в соответствующие пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 2 800 об/мин с целью осаждения эритроцитов.

Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo SCIENTIFIC, США) при длине волны 545 нм.

Степень гемолиза (H) в % определяли по формуле [15, 16]:

$$H (\%) = \frac{D_t - D_{ne}}{D_{pe} - D_{ne}} \times 100\%$$

где, D_t – оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым материалом;

D_{ne} – оптическая плотность положительного контроля;

D_{pe} – оптическая плотность пробы после 100% гемолиза.

За полное отсутствие гемолиза принимали среднее значение показателя оптической плотности при измерении физиологического раствора с кровью (положительный контроль), равное 0. За 100% гемолиз принимали среднее значение оптической плотности прибора при измерении дистиллированной воды с кровью (отрицательный контроль), которое составило 0,279.

Агрегация тромбоцитов

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) свежую донорскую цитратную кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1 000 об/мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали при помощи повторного центрифугирования ОТП в течение 20 минут при 4 000 об/мин. БТП использовали для калибровки прибора. В качестве положительного контроля использовали интактную обогащенную тромбоцитами плазму.

В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 0,2 мМ/л (НПО «РЕНАМ», Россия). Соотношение пробы и реагента составило 250 мкл ОТП + 25 мкл АДФ. Время контакта исследуемых образцов с ОТП составило 3 минуты.

Максимум агрегации и максимальную скорость агрегации тромбоцитов крови измеряли на полуавтоматическом 4-канальном анализаторе агрегации тромбоцитов «APACT 4004» (LABiTec, Германия).

Оценка адгезии тромбоцитов

Степень адгезии тромбоцитов оценивали после инкубации исследуемых образцов 0,25 см² в течение одного часа при 37 °С с 300 мкл ОТП. С целью удаления неадгезированных тромбоцитов исследуемые образцы промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4), затем препараты в течение 10 минут фиксировали в 4% растворе параформальдегида. Далее образцы инкубировали с кроличьими антителами к CD41 (ab134131, Abcam, Cambridge, UK) и мышинными антителами к CD62P (ab54427, Abcam, Cambridge, UK) в течение 12 часов при 4 °С. После

этого матриксы отмывали ФСБ с добавлением 0,1% Tween 20. Затем образцы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488-conjugated (A11034, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) и антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 555-conjugated (A31570, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Срезы повторно отмывали ФСБ с добавлением 0,1% Tween 20. Для анализа препаратов использовали конфокальный микроскоп (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Оценка цитотоксичности образцов

Цитотоксичность биоматериала оценивали на различных группах образцов:

1. Контроль – ксеноперикардialные пластины клинические, предоставленные АО «НеоКор».
2. Глицеролизованные образцы ксеноперикарда (24 час) без отмывки
3. Экстракт образцов группы 3 (п. 10.3.1. ГОСТ 10993-12-2011)
4. Глицеролизованные образцы ксеноперикарда (24 час) после отмывки (однократно в физ. растворе 5 минут)
5. Контроль клеток.

Исследование проводили на культуре клеток Ea.hy 926, которая представляет собой линию гибридомы, полученную из эндотелия человека и клеток A549/8, и демонстрирует стабильные характеристики эндотелия. В течение всего эксперимента клетки культивировали в стандартной питательной среде DME/F12 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, антибиотиков, глутамина, НАТ, амфотерицина.

Для проведения эксперимента выкраивали фрагменты биоматериала размером 0,5 × 0,5 см. Образцы группы 1 отмывали в стерильном физиологическом растворе 3 раза с 5-минутной экспозицией. Образцы 4 группы отмывали в стерильном физиологическом растворе однократно с 5-минутной экспозицией.

Для приготовления экстрактов из образцов группы 3 (без отмывки) выкраивали фрагменты размером 1 × 1,5 см, помещали в лунки стерильного культурального планшета с 0,5 мл стандартной питательной среды и инкубировали в течение 24 ч. при 37 °С. Соотношение размера образца и культуральной среды подбирали в соответствии с ГОСТ 10993-12-2011.

В лунки специального планшета клеточного анализатора xCelligence (Agilent, США) вносили питательную среду, измеряли базовое сопротивление. Затем в лунки добавляли клетки Ea.hy926 в количестве 10 000/лунку. Инкубировали в течение часа для осаждения и прикрепления клеток. Регистрация клеточного индекса происходила автоматически каждые 15 минут. После этого в вставки

помещали предварительно подготовленные образцы в количестве 4 шт. для каждого вида образца. Вставки устанавливали в планшеты с клетками. Экстракты вносили непосредственно в лунки планшета с клетками в соотношении 1:1 к объему имеющейся в лунке культуральной среды. Контроль представляли лунки с клетками, культивированными в аналогичном объеме питательной среды. Время культивирования клеток с образцами составило 72 часа. Регистрация клеточного индекса происходила автоматически каждые 15 минут.

Оценка кальций связывающего потенциала биоматериала после этапа глицеролизации

Оценку риска кальцификации проводили на модели ускоренной кальцификации с использованием лабораторных крыс линии Wistar. Все манипуляции лабораторным животным проводили под ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правил по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденными МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977) и в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., №267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.

Для изучения кальций связывающего потенциала образцы ксеноперикарда имплантировали подкожно крысам весом 60–70 г на сроки 14, 30 и 60 суток. На каждую точку было использовано по 5 животных. Через всю толщину кожи вдоль позвоночника производили 4 разреза длиной 0,5 см, тупым способом формировали слепые каналы длиной 1 см. В каждый канал помещали образец биоматериала размером 7 × 7 мм (глицеролизованный без отмывки и с предварительной 5-ти минутной отмывкой). После окончания эксперимента образцы пленок биоптировали вместе с окружающими тканями, и по 2 образца помещали в криосреду и по два фиксировали в 10% растворе забуференного формалина.

Гистологический анализ биоптатов

Оптимальным подходом к приготовлению срезов для флуоресцентного окрашивания является моментальное замораживание образца в криосреде с последующей криотомной резкой. Вышеуказанные комплексы тканей замораживали в специальной металлической форме с криогелем Tissue-Tek (4583, Sakura) при температуре –195 °С путем погружения в сосуд Дьюара с жидким азотом. Полученные замороженные блоки хранились при температуре –80 °С до этапа подготовки серийных гистологических срезов. Серийные срезы (по 4 стекла в серии) толщиной 7 мкм готовили при помощи криотома (CryoStar NX50, Thermo Scientific). До момента окрашивания стекла хранились в пласти-

ковых контейнерах при температуре –80 °С.

Для анализа объема микрокальцификации криосрезы окрашивали ализариновым красным и контрастировали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, D9564, Sigma-Aldrich). При окрашивании ализариновым красным незафиксированные криосрезы подогревали до комнатной температуры и обезживали в 95% этаноле 30 минут с дальнейшей отмывкой в 3 сменах бидистиллированной воды по 10 секунд. После отмывки на срезы наносили ализариновый красной: 1% 70 секунд. После красителя срезы отмывали в 3 сменах бидистиллированной воды по 10 секунд и в дальнейшем инкубировали с DAPI в течение 30 минут в закрытом коробе. После заключительной отмывки стекла были заключены в монтирующую среду на водной основе (ab64230, Abcam).

Визуализацию результатов проводили на флуоресцентном микроскопе (AxioImager.A1, Carl Zeiss) при помощи светофильтров Fs09 – LP515 и объективов EC-Plan-NEOFLUAR 10x/0,3 Ph1 (Carl Zeiss) и EC-Plan-NEOFLUAR 20x/0,5 Ph2 (Carl Zeiss).

Оценка циклоустойкости и гидродинамических характеристик в динамике

Испытания биопротезов клапанов сердца, предоставленные АО «НеоКор», проводили на стенде испытаний на циклоустойкость HighCycle (Vivitro Labs, Канада). В индивидуальные камеры помещали исследуемые биопротезы клапана сердца, заполняли раствором, поддерживающим осмолярность и стерильность, герметично закрывали и настраивали: среднее обратное давление равное 120 мм рт. ст., температура рабочего контура 37 °С, частота 20 Гц. Ежедневно проверяли параметры испытаний – температуру, завоздушненность камер, частоту и каждые три дня проводили проверку обратного давления.

Каждые 50 миллионов циклов биопротезы клапана сердца извлекали и проводили оценку изменений функциональных (гидродинамических) свойств экспериментальных протезов в установке гидродинамического испытания Pulse Duplicator («Vivitro Labs», Канада). Оборудование представляет собой модель «левой половины сердца», имитирующей работу желудочка и предсердия. Исследование проводили при воспроизведении физиологического режима работы «сердца», определенного ГОСТ 31618.1-2012: ударный объем – 70 мл; минутный объем – 5 л/мин; частота «сердечных» сокращений – 70 уд/мин; среднее обратное давление на протез – 120 мм рт. ст. В качестве среды для испытания использован физиологический раствор. В ходе исследования регистрировали количественно: средний транспротезный градиент; эффективную площадь отверстия; объем регургитации. Все показатели оценивали в течение 10 «сердечных» циклов в установившемся режиме для каждого протеза.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0 (ООО «СтатСофт», Россия). Описательная статистика представлена как среднее и ошибка среднего. При сравнении двух групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты подкожной имплантации биоматериала крысам подтвердили, что на всех сроках имплантации в образцах, обработанных глицерином, как с отмывкой, так и без, не обнаружено очагов кальцификации (рис. 1).

Полученные результаты доказывают безопасность разработанной технологии глицеролизации (режим – 24 часов глицеролизация/ 6 часов сушка/стерилизация этиленоксидом) (сухое хранение) при изготовлении биопротезов для сердечно-сосудистой хирургии.

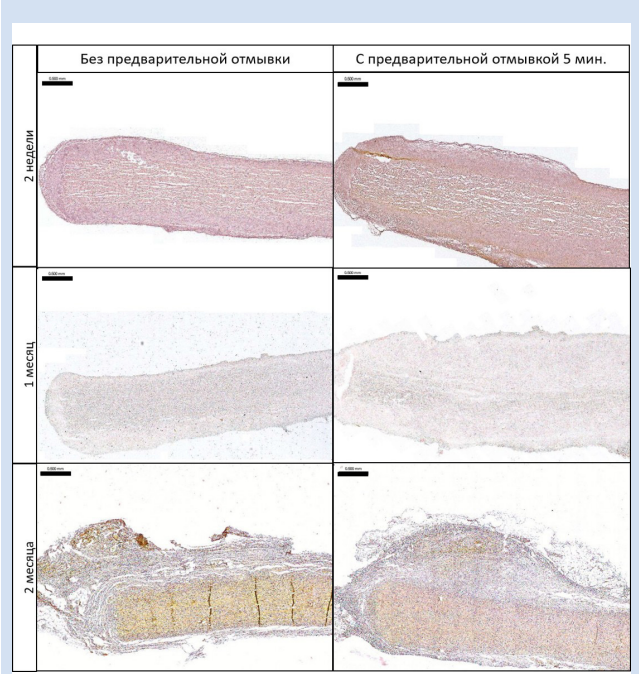


Рисунок 1. Гистологические срезы биоматериала. Срок имплантации 14 суток, 1 и 2 месяца. Образцы без отмывки и с 5-ти минутной отмывкой. Окраска Ализариновым красным. Шкала 500 мкм
Figure 1. Histological sections of biomaterial. Implantation period 14 days, 1 and 2 months. Samples without washing and with a 5-minute wash. Staining with Alizarin red. Scale 500 μm

Оценка гемосовместимости и цитотоксичности образцов

Определение величины гемолиза эритроцитов.

Результаты исследования: после контакта с глицеролизованными и высушенными образцами величина гемолиза была в среднем $0,2 \pm 0,06\%$, при допустимом показателе – 2%. Полученные результаты подтверждают, что процесс глицеролизации и последующей сушки не оказывает негативного влияния на эритроциты.

Агрегация тромбоцитов

Показатели агрегации тромбоцитов до и после контакта с глицеролизованными образцами указаны в табл. 1.

Как показывают результаты исследования, процесс глицеролизации и последующей сушки не оказывает негативного влияния на тромбоциты, различия между группами недостоверны.

Оценка цитотоксичности образцов

Время культивирования клеток с образцами составило 72 часа. Регистрация клеточного индекса происходила автоматически каждые 15 минут. В ходе исследования наблюдали нормальный график жизнеспособности клеток в контрольных образцах (рис. 2).

По результатам исследования выявили, что об-

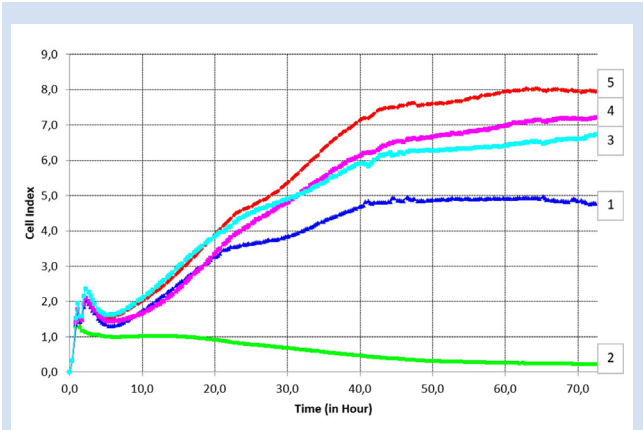


Рисунок 2. График жизнеспособности клеток после контакта с образцами. Обозначение: 1) перикард контроль; 2) перикард глицеролизованный; 3) экстракт группы 2; 4) перикард глицеролизованный с однократной 5-ти минутной отмывкой; 5) контроль клеток
Figure 2. Graph of cell viability after contact with samples. Designation: 1) pericardium control; 2) glycerolized pericardium; 3) group 2 extract; 4) glycerolized pericardium after 5-minute wash; 5) cell control

Таблица 1. Показатели агрегации тромбоцитов
Table 1. Platelet aggregation indices

Показатель / Indicator	Интактные тромбоциты / Intact platelets	Тромбоциты после контакта с опытными образцами / Platelets after contact with experimental samples	p
Максимум агрегации / Maximum aggregation, %	$70,79 \pm 2,61$	$68,86 \pm 4,14$	0,756
Максимальная скорость агрегации, %/мин / Maximum aggregation rate, %/min	$68,06 \pm 7,36$	$66,51 \pm 3,74$	0,616

разцы ксеноперикарда (1) обладали умеренным цитотоксическим эффектом, выражавшемся в снижении жизнеспособности клеточной культуры. Образцы ксеноперикарда после 1 ч. глицеролизации без отмывки (2) вызывали гибель культуры. При этом даже небольшая отмывка, в течение 5 минут, нивелировала отрицательное воздействие: образцы этой группы (4) демонстрировали удовлетворительную жизнеспособность в течение всего эксперимента. Экстракты из этих образцов также не оказывали выраженного цитотоксического действия (3).

Полученные результаты демонстрируют, что глицеролизация образцов ксеноперикарда позволяет значительно снизить их цитотоксическое действие, при условии использования после нее кратковременной, в течение 5 минут, отмывки в физ. растворе. Для данного исследования не существует нормативов, которые бы позволяли определить допустимый уровень цитотоксичности исследуемого материала. Нормальный уровень жизнеспособности клеточной культуры можно считать показателем, полученные в группах 1,3 и 4.

Оценка механических свойств глицеролизованного биоматериала

Механические испытания биоматериала проводили с целью изучения его упруго-деформативных свойств. Оценивали такие параметры как: прочность на разрыв, относительное удлинение до момента разрыва и модуль юнга (жесткости). Результаты испытаний представлены в табл. 2 и демонстрируют, что процесс глицеролизации оказал положительный эффект на прочность и относительно удлинение биоматериала, при этом не увеличивая жесткость биоткани. Эластичность биоматериала достоверно увеличилась после этапа глицеролизации ($p = 0,02$).

Испытания глицеролизованного биоматериала на циклические нагрузки

Всего оценивали по два образца каждого из следующих типоразмеров протеза: 30, 25, 19 мм – как наибольший, промежуточный и минимальный (итоговое $n = 6$). Предварительно, для всех протезов оценивали гидродинамические показатели в установке Pulse Duplicator (Vivitro Labs, Канада) в

условиях, аналогичных физиологическим.

Все образцы отработали в ускоренном режиме 200 млн. циклов. У одного протеза с посадочным диаметром 19 на отметке 84 млн. циклов обнаружили небольшую ($d 2 \text{ мм}$) перфорацию в куполе створки (рис. 3).

Наличие перфорации привело к изменению гидродинамических показателей при промежуточном испытании протезов на этапе 100 млн. циклов, что негативно сказалось на объеме регургитации – она в два раза превысила допустимые значения, регламентированные ГОСТом (табл. 3). Несмотря на перфорацию, протез оставлен для прохождения испытаний далее, до полного разрушения створки. Однако необходимо отметить, что при достижении 200 млн. циклов перфорация несколько увеличилась в размере, но тем не менее, полного разрыва створки не произошло. Раскрытие створок было равномерным, что не привело к изменению эффективной площади открытия протеза. Второй протез 19 типоразмера успешно прошел испытания.

В тоже время для обоих протезов 19 размера отмечено исходно относительно высокие показатели среднего транспротезного градиента, которые увеличились в 3 раза для протеза клапана без перфорации, и в 4,7 раза для протеза с таковой. Несмотря на то, что для данной гидродинамической характеристики биопротеза клапана сердца нет требова-

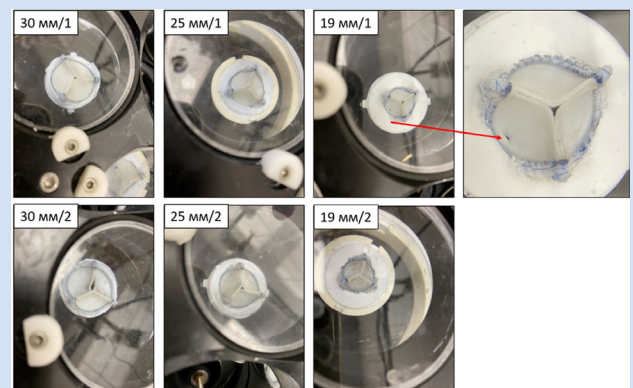


Рисунок 3. Перфорация в куполе створки протеза клапана сердца ЮниЛайн 19/1 с дополнительной глицеролизацией через 84 млн циклов

Figure 3. Perforation in the dome of the UniLine 19/1 heart valve prosthesis with additional glycerolization after 84 million cycles

Таблица 2. Результаты физико-механических испытаний ксеноперикардиальных лоскутов до и после этапа глицеролизации
Table 2. Results of physical and mechanical tests of xenopericardial flaps before and after the glycerolization stage

Показатель / Indicator	До глицеролизации / Before glycerolization, $M \pm m$	После глицеролизации / After glycerolization, $M \pm m$	p
Прочность (разрушающее напряжение при растяжении), Мпа / Strength (tensile strength at break), MPa	$8,77 \pm 1,03$	$9,28 \pm 1,28$	0,754
Эластичность (относительное удлинение при растяжении) / Elasticity (relative elongation under tension), %	$48,10 \pm 2,34$	$61,38 \pm 3,95^*$	0,020
Модуль Юнга (жесткости), Мпа / Young's modulus (rigidity), MPa	$9,87 \pm 1,62$	$7,12 \pm 0,52$	0,131

ний в ГОСТ 31618.1-2012, полученные результаты считаем неудовлетворительными и связываем их с особенностями конструкции и моделирования створчатой конструкции на протез столь малого диаметра.

Протезы 25 и 30 типоразмеров успешно прошли испытания в 200 млн. циклов (табл. 3). Для одного протеза 25 диаметра на отметке 200 млн. циклов увеличился средний транспротезный градиент и превысил на 10% допустимые 10 мл за цикл. При этом на отметке 150 млн. циклов данный показатель не превышал 4 мл/цикл.

Полученные результаты свидетельствуют, что глицеролизация не оказывает негативного влияния на гидродинамические показатели биопротезов в динамике до наработки ими 200 млн. циклов.

Обсуждение

Совершенствование технологий консервации и предимплантационного хранения биопротезов остается актуальным направлением, особенно в условиях роста применения биологических имплантатов, включая изделия для транскатетерной имплантации [17]. Технология «сухого хранения», исключающая наличие водной фазы, обладает рядом

преимуществ: снижение рисков при транспортировке, упрощение логистики и исключение необходимости строгого температурного контроля. Выход за пределы допустимого температурного диапазона, особенно ниже +5 °С, способен вызвать микроструктурные повреждения коллагеновых волокон, не видимые при макроскопическом исследовании, что в клинической практике может привести к дисфункции клапана после имплантации. Использование глицерина в качестве заменителя водной фазы снижает вероятность повреждения коллагеновых волокон при нарушении температурного режима.

Глицерол (глицерин) широко применяется в фармацевтической промышленности и представляет интерес при хранении биотканей [12, 13, 23], хотя необходимо отметить, что большинство технологий пока не вышли за рамки экспериментов. В ходе экспериментов нами зафиксирован умеренный цитотоксический эффект при прямом контакте глицеролизованной поверхности с эндотелиальными клетками. Аналогичные эффекты наблюдались при варьировании параметров экспозиции в растворах криопротекторов, включая глицерол. Известно, что 50%-й глицерол способен индуцировать окислительный стресс, апоптоз и митохондриальную

Таблица 3. Гидродинамические показатели протезов клапана сердца на основе глицеролизованного ксеноперикарда						
Table 3. Hydrodynamic parameters of heart valve prostheses based on glycerolized xenopericardium						
	До испытания / Before the test	50 млн. циклов / 50 million cycles	100 млн. циклов / 100 million cycles	150 млн. циклов / 150 million cycles	200 млн. циклов / 200 million cycles	Допустимый показатель по ГОСТ 31618.1-2012 / Permissible indicator according to GOST 31618.1-2012
Типоразмер 19 мм / Size 19 mm						
Эффективная площадь отверстия, см² / Effective orifice area, cm²	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	Не менее 0,7 / Not less than 0.7
	1,0	1,0	0,90	1,1	0,9	
Средний транспротезный градиент, мм рт. ст. / Average transprosthetic gradient, mmHg	12,6	29,0	20,4	35,5	57,2	Нет требований / No requirements
	12,0	28,5	15,9	33,0	37,0	
Объем регургитации, мл/цикл / Regurgitant volume, ml/cycle	2,1	1,1	12,9	40,3	34,2	Не более 6 / No more than 6
	2,0	1,3	2,0	3,8	5,0	
Типоразмер 25 мм / Size 25 mm						
Эффективная площадь отверстия, см² / Effective orifice area, cm²	1,8	2,0	1,7	2,0	1,8	Не менее 1,2 / Not less than 1.2
	1,8	2,0	1,7	1,7	2,1	
Средний транспротезный градиент, мм рт. ст. / Average transprosthetic gradient, mmHg	4,1	7,4	4,9	6,6	7,3	Нет требований / No requirements
	3,8	7,4	5,2	9,0	7,8	
Объем регургитации, мл/цикл / Regurgitant volume, ml/cycle	3,2	4,3	3,4	3,8	11,0	Не более 10 / No more than 10
	3,6	2,5	3,2	3,4	7,5	
Типоразмер 30 мм / Size 30 mm						
Эффективная площадь отверстия, см² / Effective orifice area, cm²	2,1	2,0	2,7	2,2	1,9	Не менее 1,8 / Not less than 1.8
	2,4	2,1	2,6	2,0	2,6	
Средний транспротезный градиент, мм рт. ст. / Average transprosthetic gradient, mmHg	3,7	2,5	2,5	5,4	2,7	Нет требований / No requirements
	2,6	2,0	1,8	4,3	2,0	
Объем регургитации, мл/цикл / Regurgitant volume, ml/cycle	3,2	3,2	3,6	7,4	3,5	Не более 12 / No more than 12
	3,3	2,9	8,6	10,1	9,2	

дисфункцию клеток [21, 22]. В то же время при минимизации концентрации или кратковременной отмывке токсическое воздействие значительно ослабевает, что подтверждают полученные нами результаты. Следовательно, при кратковременной отмывке (в течение 5 минут) или при использовании экстрактов, глицерол не оказывает выраженного цитотоксического действия. При этом, глицерол широко применяют в качестве криопротектора при заморозке эритроцитарной массы – защитный эффект которого определяется модификацией механических характеристик плазматической мембраны эритроцита [23].

Вышеописанные эффекты объясняют различие в полученных нами данных – цитотоксический эффект при контакте с эндотелиальными клетками и минимальные показатели гемолиза при контакте с эритроцитами. Вероятно, это также связано и с количеством жидкости при проведении тестов – чем больше жидкости, тем меньше концентрация глицерола и меньше его токсический эффект. Это доказывает и отсутствие токсического воздействия глицерола при использовании однократной отмывки образцов перед экспериментом и при предварительной экстракции образцов.

В тоже время мы не отметили различий от наличия отмывки от глицерола при имплантации образцов биоматериала подкожно крысам – во всех образцах не было отмечено кальцификации и признаков воспаления. Учитывая, что протезы для сердечно-сосудистой хирургии размещаются в потоке крови, полученная нами цитоксичность глицеролизованных образцов без предварительной отмывки не будет оказывать каких-либо негативных последствий для пациента.

Устойчивость к циклическим нагрузкам является важным параметром для биопротезов клапана сердца и зависит от многих факторов – конструкция каркаса, дизайн и моделирование створчатой части, исходные упруго-деформативные характеристики материала. Требования к количеству миллионов циклов различаются по требованиям различных ГОСТ. Минимальным количеством является 200 млн. циклов, что равно 5 годам работы в сердце пациента. Полученные нами данные продемонстрировали перспективность разработанной технологии «сухого хранения» – через 200 млн. циклов протезы демонстрируют удовлетворительные гидродинамические показатели.

Представляется, что выявленные единичные перфорации у биопротезов 19 типоразмера обусловлены особенностями конструкции каркаса и структурной организацией ксеноперикарда, а не влиянием технологии глицеролизации. Морфологические параметры, такие как направление и плотность коллагеновых волокон, в сочетании с конструктивными элементами каркаса протеза, мо-

гут способствовать локальной перегрузке створок и формированию дефектов при длительном циклическом воздействии.

В отношении высоких показателей среднего транспротезного градиента у протезов 19 диаметра в литературе отсутствуют данные, какие показатели считать нормой. Для протезов, монтированных на жестком каркасе, доступны данные для размера 21 мм [24] и показатели, полученные ходе нашего исследования сопоставимы $16,25 \pm 0,62$ и $12,0-12,3$ мм рт. ст. соответственно, перед началом исследований на циклоустойкость. В динамике, до достижения 1 млрд циклов, Sadri V. с коллегами не отмечали увеличения среднего транспротезного градиента [24]. Но, при этом они указывают, что площадь эффективного открытия увеличивается в динамике и связывают это с тем, что створки становятся более гибкими из-за циклической нагрузки давлением в ускоренном тестере на износ с течением времени.

В исследовании Raghav V. с соавторами [24] подвергали исследованию на циклоустойкость биологические каркасные протезы 21 и 23 размера. В качестве критериев эффективности принимали сохранность площади эффективного открытия и объем регургитации. В ходе испытаний после отработки 100 млн. циклов на двух протезах 23 диаметра фиксировали формирование перфораций в области стоек каркаса и считают перфорации как артефакты теста, поскольку в клиническом сценарии, после имплантации поверхность биоматериала покрывается белковыми отложениями и клетками пациента, что служит изолирующим фактором, снижающим риск перфорации. Мы придерживаемся мнения, что перфорации связаны с особенностями конструкции протеза и производителю необходимо уделить пристальное внимание на данное событие.

Заключение

На основании проведенных исследований, можно утверждать, что разработанная технология «сухого» хранения, основанная на глицеролизации биоматериала, не оказывает негативного влияния на физико-механические, био- и гемосовместимые свойства биопротезов, не вызывает кальцификации биоткани в эксперименте на лабораторных животных и не снижает устойчивость к циклическим нагрузкам в динамике до 200 млн. циклов.

Конфликт интересов

Ю.А. Кудрявцева входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний». Е.А. Овчаренко заявляет об отсутствии конфликта интересов. К.Ю. Клышников заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Ю. Каноникина заявляет об отсутствии конфликта интересов. Т.Н. Акентье-

ва заявляет об отсутствии конфликта интересов. П.С. Онищенко заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.Л. Барбараш является главным редактором журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Результаты получены при поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий от «30» сентября 2022 г. № 075-15-2022-

1202, комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в областях разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания новых продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» (утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р).

Информация об авторах

Кудрявцева Юлия Александровна, доктор биологических наук главный научный сотрудник отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6134-7468

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

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

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Канонькина Анастасия Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

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

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

Author Information Form

Kudryavtseva Yulia A., Dr. Sci. (Biol), Chief Researcher, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institutes «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6134-7468

Ovcharenko Evgeny A., Ph.D., 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

Klyshnikov Kirill Yu., 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

Matveeva Vera G., Researcher at the Laboratory of Cellular technology, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Kanonykina Anastasia Yu., junior Research Scientist, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institutes «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2810-3100

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

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

Барбараш Ольга Леонидовна, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; ORCID 0000-0002-4642-3610

Barbarash Olga L., PhD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; ORCID 0000-0002-4642-3610

Вклад авторов в статью

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

ОЕА – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ККЮ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МВГ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАЮ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

АТН – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ОПС – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

АТН – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

Author Contribution Statement

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

OEA – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KKYu – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MVG – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAYu – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ATN – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

OPS – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ATN – contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aroz S.G., Spaggiari M., Jeon H., Oberholzer J., Benedetti E., Tzvetanov I. The use of bovine pericardial patch for vascular reconstruction in infected fields for transplant recipients // J Vasc Surg Cases Innov Tech. 2017 Mar 6;3(1):47-49. DOI: 10.1016/j.jvscit.2016.10.006.

2. Ивченко А.О., Шведов А.Н., Ивченко О.А. Сосудистые протезы, используемые при реконструктивных операциях на магистральных артериях нижних конечностей. Бюллетень сибирской медицины. 2017; 16 (1): 132–139. DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-132–139.

3. Kueri S., Kari F.A., Ayala Fuentes R., Sievers H.H., Beyersdorf F., Bothe W. The use of biological heart valves—types of prosthesis, durability and complications. Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 423–30. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0423

4. Iop L., Palmosi T., Dal Sasso E., Gerosa G. Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery. J Thorac Dis. 2018 Jul;10(Suppl 20):S2390-S2411. DOI: 10.21037/jtd.2018.04.27.

5. Кудрявцева Ю.А., Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Антонова Л.В., Сенокосова Е.А., Понасенко А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Биологические протезы для сердечно-сосудистой хирургии – полувековая история и перспективы развития. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(1):196-210. DOI:10.17802/2306-1278-2024-13-1-196-210

6. Рогулина Н.В., Горбунова Е.В., Кондюкова Н.В., Одаренко Ю.Н., Барбараш Л.С. Сравнительная оценка качества жизни реципиентов механических и биологических протезов при митральном пороке. Российский кардиологический журнал. 2015;(7):94-97. DOI:10.15829/1560-4071-2015-7-94-97

7. Singab H., Sami G. Mitral Valve Bioprosthesis Is Safer Than Mechanical Mitral Prosthesis in Young Women. The Heart Surgery Forum, 2020. 23(5), E677-E684. DOI:10.1532/hstf.3145

8. Барбараш Л.С., Журавлева И.Ю. Эволюция биопротезов

тезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2012;(1):4-11. DOI:10.17802/2306-1278-2012-1-4-11

9. Zvyagina A.I., Minaychev V.V., Kobyakova M.I., Lomovskaya Y.V., Senotov A.S., Pyatina K.V., Akatov V.S., Fadeev R.S., Fadeeva I.S. Soft Biomimetic Approach for the Development of Calcinosi-Resistant Glutaraldehyde-Fixed Biomaterials for Cardiovascular Surgery. *Biomimetics* (Basel) 2023 Aug 10;8(4):357. DOI:10.3390/biomimetics8040357.

10. Патент №2457867, Рос. Федерация: МКП A61L 2/16, A61L 27/00, A61K 31/498. Способ стерилизации и предимплантационного хранения биологических протезов из ксеногенной и аллогенной ткани для сердечнососудистой хирургии [Текст] / Костава В.Т., Бакулева Н.П., Лютова И.Г. и др.; патентообладатель: Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН (RU). №2011117782/15; заявл. 05.05.2011; опубли. 10.08.2012 г., бюл. №22

11. Патент № 2633062, Рос. Федерация: МКП A61F2/24. Способ предимплантационного хранения биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии [Текст] / Барбараш Л.С., Кудрявцева Ю.А. Патентообладатель: Барбараш Л.С., Кудрявцева Ю.А. №2016145488; заявл. 21.11.2016; 11.10.2017 Бюл. № 29.

12. Fumoto H., Chen J-F., Zhou O., Massiello A.L., Desoffy R., Fukamachi K., Navia J.L Performance of Bioprosthetic Valves after Glycerol Dehydration, Ethylene Oxide Sterilization, and Rehydration. *Innovations: Technology and Techniques in Cardiothoracic and Vascular Surgery*. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 32–36. DOI: 10.1097/imi.0b013e31820a7cd6

13. Osinowo O, Monro J L, Ross J K. The use of glycerol-preserved homologous dura mater grafts in cardiac surgery: the Southampton experience. *Ann Thorac Surg* 1985 Apr;39(4):367-70. DOI: 10.1016/s0003-4975(10)62635-5.

14. Jin L., He H., Yang F., Xu L., Guo G., Wang Y. Tough pNAGA hydrogel hybridized porcine pericardium for the pre-mounted TAVI valve with improved anti-tearing properties and hemocompatibility / *Biomed Mater*. 2020 Oct 3;15(6):065013. doi: 10.1088/1748-605X/aba239

15. Fahner P.J., Legemate D.A., van der Wal A.C., van Marle J., Peters S.L.M., van Eck C.F., van Gulik T.M., Idu M.M. Comparison of Preserved Vascular Allografts Using Glycerol and University of Wisconsin Solution in a Goat Carotid Artery Transplantation Model. *Eur Surg Res* (2012) 48 (2): 64–72. DOI:10.1159/000334170

16. Патент № 2827028 «Способ предимплантационной обработки биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии». Кудрявцева Ю.А., Резвова М.А., Овчаренко Е.А., Барбараш Л.С. Опубликовано: 20.09.2024 Бюл. № 26. A61L 27/00; A61K 31/72; A01N 1/02

17. Бокерия Л.А., Милюевская Е.Б., Прянишников В.В., Орлов И.А. Сердечно-сосудистая хирургия – 2022. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М:НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава России; 2023. 344 с.

18. David T. How to decide between a bioprosthetic and mechanical valve, *Canadian Journal of Cardiology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.09.011>.

19. Глушкова Т.В., Овчаренко Е.А., Рогулина Н.В., Клышников К.Ю., Кудрявцева Ю.А., Барбараш Л.С. Дисфункции эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца. *Кардиология*. 2019;59(10):49–59. DOI: 10.18087/cardio.2019.10.n327

20. Larsen K., Petrovski G., Boix-Lemonche G. Alternative cryoprotective agent for corneal stroma-derived mesenchymal stromal cells for clinical applications. *Sci Rep*. 2024 Jul 9;14(1):15788. DOI: 10.1038/s41598-024-65469-4.

21. Best B.P. Correction to: Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res* 2015;18(5):422-436; DOI: 10.1089/rej.2014.1656.

22. Almansoori, K. A., Prasad, V., Forbes, J. F., Law, G. K., McGann, L. E., Elliott, J. A. W., & Jomha, N. M. (2012). Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes. *Cryobiology*, 64(3), 185–191. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.01.006

23. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Пространственно-конформационные модификации белков мембранно-цитоскелетного комплекса криоконсервированных эритроцитов. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2019, 36 (2):125-136. DOI: 10.1134/S0233475519010055

24. Sadri V., Trusty P.M., Madukauwa-David I.D.a, Yoganathan A.P. Long-term durability of a new surgical aortic valve: A 1 billion cycle in vitro study. *JTCVS* 2021 Nov 4;9:59-69. DOI: 10.1016/j.xjon.2021.10.056.

25. Raghav V., Okafor I., Quach M., Dang L., Marquez S., Yoganathan A.P. Long-Term Durability of Carpentier-Edwards Magna Ease Valve: A One Billion Cycle In Vitro Study. *Ann Thorac Surg*. 2016 May;101(5):1759-65. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.10.069.

REFERENCES

1. Aroz S.G., Spaggiari M., Jeon H., Oberholzer J., Benedetti E., Tzvetanov I. The use of bovine pericardial patch for vascular reconstruction in infected fields for transplant recipients // *J Vasc Surg Cases Innov Tech*. 2017 Mar 6;3(1):47-49. DOI: 10.1016/j.jvscit.2016.10.006.

2. Ивченко А.О., Шведов А.Н., Ивченко О.А. Сосудистые протезы, используемые при реконструктивных операциях на магистральных артериях нижних конечностей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (1): 132–139. DOI 10.20538/1682-0363-2017-1-132–139.

3. Kueri S., Kari F.A., Ayala Fuentes R., Sievers H.N., Beyersdorf F., Bothe W. The use of biological heart valves—types of prosthesis, durability and complications. *Dtsch Arztebl Int* 2019; 116: 423–30. DOI: 10.3238/arz.tebl.2019.0423

4. Iop L., Palmosi T., Dal Sasso E., Gerosa G. Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery. *J Thorac Dis*. 2018 Jul;10(Suppl 20):S2390-S2411. DOI: 10.21037/jtd.2018.04.27.

5. Кудрявцева Ю.А., Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Антонова Л.В., Сенокосова Е.А., Понасенко А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С. Биологические протезы для сердечно-сосудистой хирургии – полувековая история и перспек-

тивы развития. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024;13(1):196-210. DOI:10.17802/2306-1278-2024-13-1-196-210

6. Рогулина Н.В., Горбунова Е.В., Кондюкова Н.В., Одаренко Ю.Н., Барбараш Л.С. Сравнительная оценка качества жизни реципиентов механических и биологических протезов при митральном пороке. *Российский кардиологический журнал*. 2015;(7):94-97. DOI:10.15829/1560-4071-2015-7-94-97

7. Singab H., Sami G. Mitral Valve Bioprosthesis Is Safer Than Mechanical Mitral Prosthesis in Young Women. *The Heart Surgery Forum*, 2020. 23(5), E677-E684. DOI:10.1532/hstf.3145

8 Барбараш Л.С., Журавлева И.Ю. Эволюция биопротезов клапанов сердца: достижения и проблемы двух десятилетий. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2012;(1):4-11. DOI:10.17802/2306-1278-2012-1-4-11

9. Zvyagina A.I., Minaychev V.V., Kobyakova M.I., Lomovskaya Y.V., Senotov A.S., Pyatina K.V., Akatov V.S., Fadeev R.S., Fadeeva I.S. Soft Biomimetic Approach for the Development of Calcinosi-Resistant Glutaraldehyde-Fixed

Biomaterials for Cardiovascular Surgery. Biomimetics (Basel) 2023 Aug 10;8(4):357. DOI:10.3390/biomimetics8040357.

10. Патент №2457867, Рос. Федерация: МКП A61L 2/16, A61L 27/00, A61K 31/498. Способ стерилизации и предимплантационного хранения биологических протезов из ксеногенной и аллогенной ткани для сердечнососудистой хирургии [Текст] / Костава В.Т., Бакулева Н.П., Лютова И.Г. и др.; патентообладатель: Учреждение Российской академии медицинских наук Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН (RU). №2011117782/15; заявл. 05.05.2011; опубл. 10.08.2012 г., бюл. №22

11. Патент № 2633062, Рос. Федерация: МКП A61F2/24. Способ предимплантационного хранения биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии [Текст] / Барбараш Л.С., Кудрявцева Ю.А. Патентообладатель: Барбараш Л.С., Кудрявцева Ю.А. №2016145488; заявл. 21.11.2016; 11.10.2017 Бюл. № 29.

12. Fumoto H., Chen J-F., Zhou O., Massiello A.L., Dessoffy R., Fukamachi K., Navia J.L. Performance of Bioprosthetic Valves after Glycerol Dehydration, Ethylene Oxide Sterilization, and Rehydration. Innovations: Technology and Techniques in Cardiothoracic and Vascular Surgery. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 32–36. DOI: 10.1097/imi.0b013e31820a7cd6

13. Osinowo O, Monro J L, Ross J K. The use of glycerol-preserved homologous dura mater grafts in cardiac surgery: the Southampton experience. Ann Thorac Surg 1985 Apr;39(4):367-70. DOI: 10.1016/s0003-4975(10)62635-5.

14. Jin L., He H., Yang F., Xu L., Guo G., Wang Y. Tough pNAGA hydrogel hybridized porcine pericardium for the pre-mounted TAVI valve with improved anti-tearing properties and hemocompatibility / Biomed Mater. 2020 Oct 3;15(6):065013. doi: 10.1088/1748-605X/aba239

15. Fahner P.J., Legemate D.A., van der Wal A.C., van Marle J., Peters S.L.M., van Eck C.F., van Gulik T.M., Idu M.M. Comparison of Preserved Vascular Allografts Using Glycerol and University of Wisconsin Solution in a Goat Carotid Artery Transplantation Model. Eur Surg Res (2012) 48 (2): 64–72. DOI:10.1159/000334170

16. Патент № 2827028 «Способ предимплантационной обработки биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии». Кудрявцева Ю.А., Резцова М.А., Овчаренко Е.А., Барбараш Л.С. Опубликовано: 20.09.2024 Бюл. №

26. A61L 27/00; A61K 31/72; A01N 1/02

17. Бокерия Л.А., Милюевская Е.Б., Прянишников В.В., Орлов И.А. Сердечно-сосудистая хирургия – 2022. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М:НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава России; 2023. 344 с.

18. David T. How to decide between a bioprosthetic and mechanical valve, Canadian Journal of Cardiology (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.09.011>.

19. Глушкова Т.В., Овчаренко Е.А., Рогулина Н.В., Клышников К.Ю., Кудрявцева Ю.А., Барбараш Л.С. Дисфункции эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца. Кардиология. 2019;59(10):49–59. DOI: 10.18087/cardio.2019.10.n327

20. Larsen K., Petrovski G., Boix-Lemonche G. Alternative cryoprotective agent for corneal stroma-derived mesenchymal stromal cells for clinical applications. Sci Rep. 2024 Jul 9;14(1):15788. DOI: 10.1038/s41598-024-65469-4.

21. Best B.P. Correction to: Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. Rejuvenation Res 2015;18(5):422-436; DOI: 10.1089/rej.2014.1656.

22. Almansoori, K. A., Prasad, V., Forbes, J. F., Law, G. K., McGann, L. E., Elliott, J. A. W., & Jomha, N. M. (2012). Cryoprotective agent toxicity interactions in human articular chondrocytes. Cryobiology, 64(3), 185–191. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.01.006

23. Землянских Н.Г., Бабийчук Л.А. Пространственно-конформационные модификации белков мембранно-цитоскелетного комплекса криоконсервированных эритроцитов. Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2019, 36 (2):125-136. DOI: 10.1134/S0233475519010055

24. Sadri V., Trusty P.M., Madukauwa-David I.D.a, Yoganathan A.P. Long-term durability of a new surgical aortic valve: A 1 billion cycle in vitro study. JTCVS 2021 Nov 4;9:59-69. DOI: 10.1016/j.xjon.2021.10.056.

25. Raghav V., Okafor I., Quach M., Dang L., Marquez S., Yoganathan A.P. Long-Term Durability of Carpentier-Edwards Magna Ease Valve: A One Billion Cycle In Vitro Study. Ann Thorac Surg. 2016 May;101(5):1759-65. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.10.069.

Для цитирования: Кудрявцева Ю.А., Овчаренко Е.А., Клышников К.Ю., Матвеева В.Г., Канонькина А.Ю., Акентьева Т.Н., Онищенко П.С., Барбараш О.Л. Способ «сухого» хранения биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2025;14(4): 77-89. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-4-77-89

To cite: Kudryavtseva Yu.A., Ovcharenko E.A., Klyshnikov K.Yu., Matveeva V.G., Kanonykina A.Yu., Akentyeva T.N., Onishchenko P.S., Barbarash O.L. Method of “dry” storage of biological prostheses for cardiovascular surgery. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2025;14(4): 77-89. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-4-77-89

Комментарий к статье «Способ «сухого» хранения биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии»

А.Е. Костюнин

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

Биологические протезы клапанов сердца, изготовленные из стабилизированных тканей животного происхождения, являются самым часто используемым типом клапанных заменителей в мировой кардиохирургической практике. Популярность биопротезов обусловлена их значимыми преимуществами перед механическими клапанами: низкой тромбогенностью, не требующей назначения реципиенту пожизненной антикоагулянтной терапии, устойчивостью к инфекционным осложнениям и бесшумностью работы. Впрочем, биологические протезы не лишены недостатков, главным из которых является их ограниченная долговечность, составляющая в среднем 10–15 лет для большинства коммерчески используемых моделей. На сроки функционирования биопротезов влияет множество факторов, в том числе применяемые при их эксплуатации технологии и условия хранения.

В этом контексте работа Ю.А. Кудрявцевой с соавторами привлекает особое внимание, поскольку в ней описан оригинальный способ «сухого» хранения биологических клапанов, основанный на методе глицеризации. Потенциально, исключение водной фазы позволит существенно снизить риски при транспортировке этих медицинских изделий (например, исключить вероятность кристаллизации раствора для при выходе температурного режима в диапазон ниже 0 °C) и их длительном хранении (уменьшение вероятности контаминации бактериальными агентами). В перспективе, это может способствовать не только упрощению и удешевлению логистики, но и положительно сказаться на долговечности протезов.

Авторами выполнен ряд экспериментальных исследований для доклинической оценки безо-

пасности и эффективности разработанной технологии. В частности, было показано, что глицеризованный биоматериал обладает высокой гемосовместимостью *in vitro* и низкой склонностью к кальцификации в крысиной модели подкожной имплантации. Хотя при инкубации клеток Ea.hy926 в присутствии образцов (анализ xCelligence) авторы отмечают высокую токсичность глицеризованного биоматериала, этот негативный эффект устраняет непродолжительная (5 минут) отмывка в физиологическом растворе. Данные по оценке механических свойств глицеризованного биоматериала указывают на повышение его эластичности по сравнению с неизменной тканью при сохранении исходных прочностных характеристиках. Наконец, авторы рассматриваемой статьи демонстрируют удовлетворительную долговечность протезов модели «ЮниЛайн» (АО НеоКор, Россия), подвергнутых глицеризации и последующим испытаниям на циклостойкость в течение 200 млн. циклов. В целом, полученные авторами результаты показывают, что предложенная ими технология хранения не ухудшает свойства как самой биоткани, так и изготовленных на её основе протезов.

На мой взгляд, представленный Ю.А. Кудрявцевой с соавторами метод хранения имеет неплохие перспективы для внедрения в практику производства и хранения отечественных биопротезов клапанов сердца ввиду его неоспоримых преимуществ. Впрочем, для окончательного подтверждения возможности его внедрения в клиническую практику требуются дальнейшие испытания в модели ортотопической имплантации клапана крупному лабораторному животному (овце или свинье).