

УДК: 616.12-089.819.843-77:615.468.6

РОЛЬ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА В КАЛЬЦИФИКАЦИИ КАРДИОВАСКУЛЯРНЫХ БИОПРОТЕЗОВ

Ю. А. КУДРЯВЦЕВА, М. В. НАСОНОВА, Т. Н. АКЕНТЬЕВА,
А. Ю. БУРАГО, И. Ю. ЖУРАВЛЕВА

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, Россия*

Цель. Оценить влияние шовного материала и нефракционированного гепарина на кальцификацию биоматериала в эксперименте.

Материалы и методы. Использовали створки аортального клапана свиньи, консервированные глутаровым альдегидом и диглицидиловым эфиром этиленгликоля. Опытную группу образцов прошивали шовным материалом на основе полипропилена, полидиоксанона и нитинола (TiNi). Модификацию прошитых створок выполняли нефракционированным гепарином. Влияние шовного материала и гепарина на минерализацию биоткани изучали на модели ускоренной кальцификации путем имплантации образцов крысам-самцам сроком на 2 месяца.

Результаты. Через два месяца после имплантации во всех образцах были обнаружены кальциевые депозиты в перилигатурной зоне, при этом количество кальция в биоматериале, содержащем полипропиленовую нить, возросло в 31 раз ($p=0,0009$), при использовании TiNi – в 14 раз ($p=0,001$), а полидиоксанона – в 9 раз ($p=0,0049$) по сравнению с контролем. Модификация нефракционированным гепарином позволила значительно снизить количество кальция в биоматериале. Наибольший эффект был достигнут в отношении образцов, содержащих TiNi – концентрация кальция снизилась в 14,5 раза ($p=0,0013$), что сопоставимо с неимплантированными образцами.

Заключение. Кальцификация кардиоваскулярных биопротезов может быть инициирована шовным материалом вследствие воспалительного процесса в перилигатурной зоне. Количество кальция в биоматериале зависит от качества шовного материала. Полипропиленовая нить в наибольшей степени провоцирует кальцификацию эпоксиобработанных ксеностворок в эксперименте. Модификация нефракционированным гепарином биопротезов, содержащих шовный материал, позволяет эффективно ингибировать кальцификацию биоткани.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца, кальцификация биоткани, шовный материал, нефракционированный гепарин.

THE ROLE OF SUTURE MATERIAL IN THE CALCIFICATION OF CARDIOVASCULAR BIOPROSTHESIS

YU. A. KUDRYAVTSEVA, M. V. NASONOVA, T. N. AKENTIEVA,
A. YU. BURAGO, I. YU. ZHURAVLYOVA

*Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Kemerovo, Russia*

Purpose. Assess the impact of the sutures and unfractionated heparin on biomaterial calcification in an experiment.

Materials and methods. Porcine aortic valve cusps, preserved in glutardialdehyde and ethylene glycol diglycidyl ether, were used. The test models were sutured with polypropylene, polydioxanone and nitinol (TiNi) threads. The sutured cusps were modified with unfractionated heparin. The model of accelerated calcification was used to study the impact of suture material and heparin on biological tissue mineralization by implanting the test models into male rats for 2 months.

Results. Two months after the implantation all the test models had calcium deposits in the peri-suture region; the amount of calcium in the biomaterial with polypropylene threads was 31-fold higher ($p=0,0009$), with TiNi threads it was 14-fold higher ($p=0,001$) and with polydioxanone threads it was 9-fold higher ($p=0,0049$) as compared to the controls. The modification with unfractionated heparin significantly decreased the amount of calcium in the biomaterial. The maximum effect was observed in the test models containing TiNi: the amount of calcium was 14.5-fold lower ($p=0,0013$), which was comparable with non-implanted models.

Conclusion. Cardiovascular bioprosthetic heart valves calcification can be initiated by the suture material due to inflammation in the peri-suture region. The amount of calcium in the biomaterial depends on the quality of the latter. Polypropylene threads precipitated the calcification of epoxy-treated xenocusps in the experiment. The modification with unfractionated heparin can effectively inhibit biological tissue calcification.

Key words: bioprosthetic heart valves, biological tissue calcification, suture material, unfractionated heparin.

В России ежегодно увеличивается количество реконструктивных вмешательств на сердце и сосудах [4, 9]. Однако ряд вопросов, посвященных тактике выбора протеза для восстановительной операции, остаются открытыми, в частности, использование биологических протезов лимитировано проблемой кальцификации. Одной из главных причин, вызывающих данное осложнение, является консервация биоткани раствором глутарового альдегида [12, 15, 16]. Применение в качестве сшивающего агента диглицидилового эфира этиленгликоля (ДЭЭ) позволило решить проблему кальцификации биопротезов артерий [5]. Но в отношении биопротезов клапанов сердца абсолютная резистентность к кальцификации не достигнута, хотя риск данного осложнения существенно снизился, в том числе у молодых пациентов [8].

Клинический опыт, накопленный при использовании бескаркасных биопротезов и клапаносодержащих кондуитов, показал, что первоначальные кальцинаты располагаются по линии фиксации биопротеза к тканям реципиента [7]. Данный факт позволяет предположить, что шовный материал может выступать в роли инициатора процессов минерализации. В то же время известно, что дополнительная модификация гепарином биопротезов, консервированных глутаровым альдегидом, способна ингибировать их кальцификацию [11, 13]. Таким образом, цель настоящего исследования – оценить влияние шовного материала и нефракционированного гепарина на кальцификацию биоматериала в эксперименте.

Материалы и методы

В эксперименте использовали створки аортального клапана свиньи, консервированные глутаровым альдегидом (ГА) – II контроль и диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ) – III контроль. В сравнительном аспекте исследовали хирургический шовный материал, изготовленный из полипропилена 6/0 и полидиоксанона 6/0 (ПДС), а также экспериментальные образцы лигатур из титанола (TiNi) 8/0 (НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, г. Томск).

Из створок вырезали кусочки размером $0,5 \times 0,5$ см. На каждый образец, консервированный ДЭЭ, накладывали 4 шва одним из трех видов шовного материала. Перед имплантацией с половины образцов швы снимали (IV контроль). Модификацию прошитых створок выполняли нефракционированным гепарином (НПО «Синтез», Россия).

Влияние шовного материала на минерализацию биологической ткани изучали на стандартной модели ускоренной кальцификации путем подкож-

ной имплантации образцов крысам-самцам субпопуляции Wistar сроком на 2 месяца ($n=180$). 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, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003.

Морфологическое исследование удаленного биоматериала выполняли методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилин-эозином для анализа клеточных структур и пикрофуксином по Ван Гизону – для оценки структуры коллагеновых волокон. Для идентификации отложений кальция применяли специфичную окраску азотно-кислым серебром по Коссу. Гистологические препараты исследовали с помощью микроскопа МИКМЕД-2 («ЛОМО», Санкт-Петербург) при увеличении $\times 200$.

Для определения количества кальция удаленные образцы очищали от окружающих тканей, отмывали в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида, после чего высушивали в термостате при 37°C до постоянной массы. Гидролиз образцов проводили на песочной бане ($t=150^\circ\text{C}$) в 0,5 мл раствора 50 %-ной хлорной кислоты. Количество кальция определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Perkin Elmer»-5100 (USA) с расчетом на 1 г сухой ткани. Прирост кальция оценивали относительно неимплантированного материала, консервированного ДЭЭ (I контроль).

Обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Me (25%;75%). Для проверки гипотезы о равенстве законов распределений использовали критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что биоматериал, обработанный ГА, после имплантации в организм человека или лабораторного животного подвергается кальцификации [12, 15]. Действительно, полученные в настоящей работе результаты показали, что створки, консервированные ГА (II контроль), по истечении двух месяцев после подкожной имплантации содержали многочисленные массивные кальцинаты, отчетливо идентифицируемые при визуальном

осмотре. Данный феномен, многократно и полно описанный в литературе, расценивали как подтверждение нормального кальциевого обмена у лабораторных животных, что крайне важно для получения корректных результатов.

При микроскопическом исследовании удаленных образцов наблюдали сформированную рыхлую фиброзную капсулу с большим количеством капилляров, с очаговыми лимфоцитарными инфильтрациями, что свидетельствует о воспалительном процессе вокруг имплантированного образца. Во всех слоях ткани створок отмечены крупно- и мелкогранулярные отложения кальция (рис. 1а).

При макроскопическом исследовании ксеностворок, консервированных ДЭЭ (III контроль), визуальные признаки кальцификации биоматериала отсутствовали. При микроскопическом исследовании вокруг образца створки отмечали рыхлую фиброзную капсулу с мелкими капиллярами. В створках коллагеновые волокна сохраняли извитость и компактное расположение; фиброциты – мелкие, с вытянутыми нормохромными ядрами, признаков воспаления не наблюдали (рис. 1б).

При макроскопическом исследовании эпокси-обработанных створок, прошитых полипропиленовыми, полидиоксаноновыми и нитиноловыми

нитьями, в толще биоматериала во всех имплантированных образцах были обнаружены кальциевые отложения. При микроскопическом исследовании наблюдали рыхлую фиброзную капсулу с большим количеством мелких капилляров. В ткани створок были выявлены крупно- и мелкогранулярные отложения кальция, в основном в перилигатурной зоне (рис. 2). Следует отметить, что характер кальциевых депозитов различался в зависимости от использованного шовного материала. В образцах, прошитых нитинолом (рис. 2б) и ПДС (рис. 2в), мелкозернистые отложения кальция были выявлены преимущественно вокруг шовного материала и в некоторых образцах в спонгиозном слое. За пределами кальцинатов коллагеновые волокна сохраняли извитость и компактное расположение.

При использовании полипропиленовой нити были выявлены крупные кальциевые депозиты не только в области шовного материала, но и в спонгиозном слое, и в поверхностных отделах створки (рис. 2а). Местами вокруг лигатуры наблюдали скопления клеточных элементов. Расположение коллагеновых волокон зависело от размеров кальциевых депозитов. В тех образцах, где кальциевые депозиты не превышали средних размеров, коллагеновые волокна были извиты, расположены

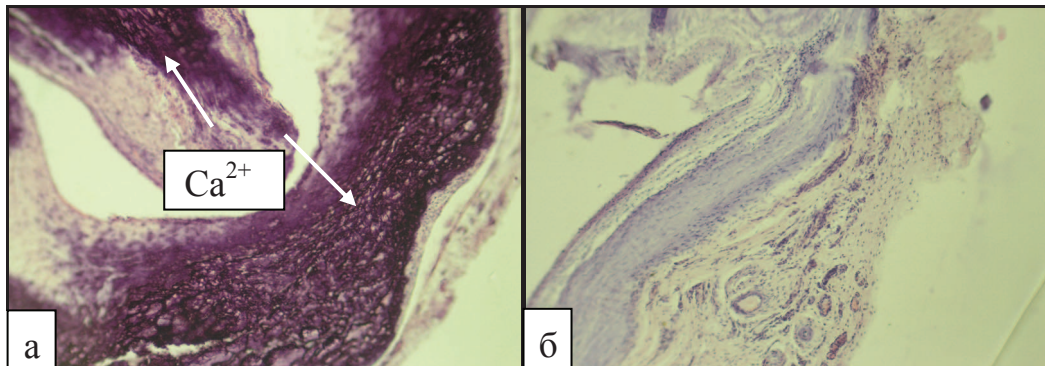


Рис. 1. Структура удаленных ксеностворок, консервированных ГА (а) и ДЭЭ (б). Окраска гематоксидин-эозином. Ув. $\times 200$

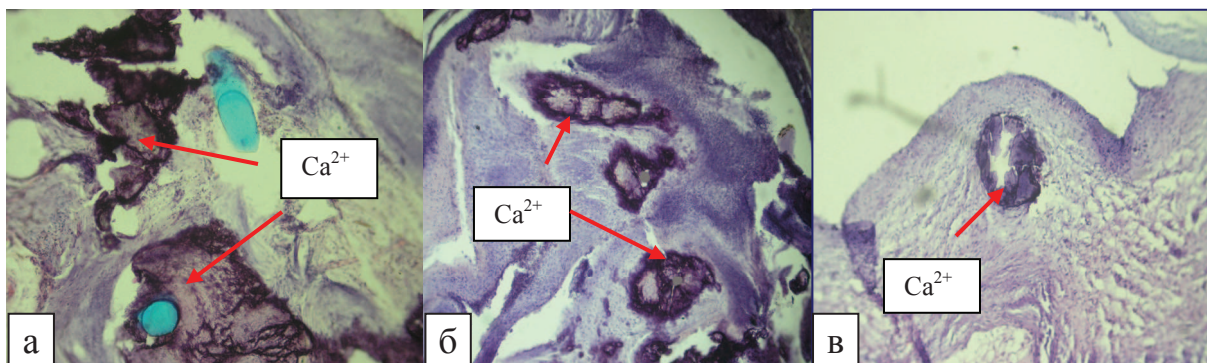


Рис. 2. Отложения кальция вокруг шовного материала: а – полипропиленовая нить, б – ПДС, в – TiNi. Окраска гематоксидин-эозином. Ув. $\times 200$

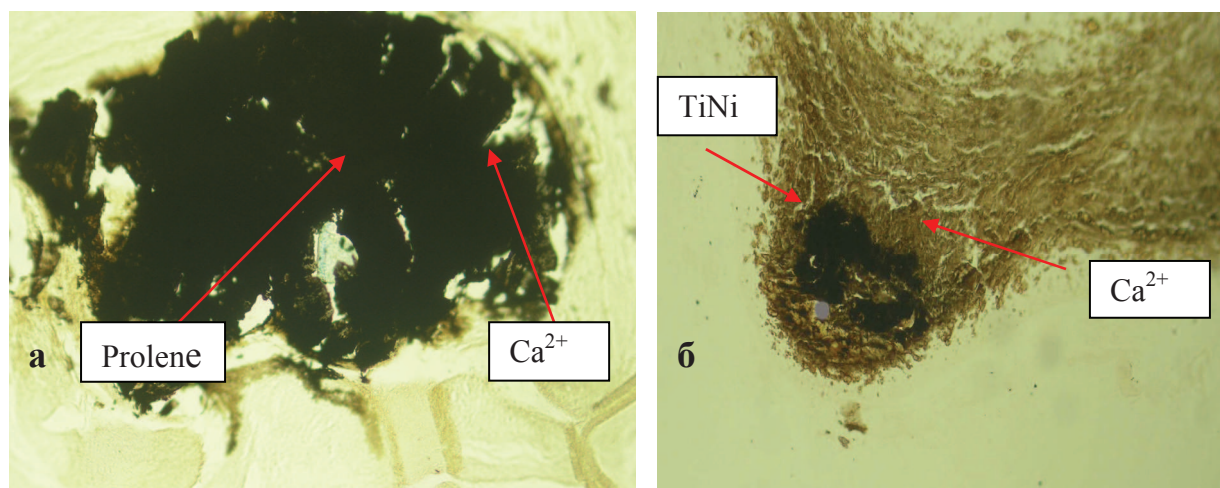


Рис. 3. Отложения кальция вокруг шовного материал:
а – полипропиленовая нить; б – нить TiNi. Окраска по Коссу. Ув. $\times 200$

плотно. При наличии крупных кальцинатов коллагеновые волокна приобретали рыхлое расположение, местами были фрагментированы. Окраска серебром по Коссу подтверждает наличие фосфорнокислого кальция, при этом кальциевые депозиты окрашиваются в черный цвет (рис. 3).

Сложно объяснить причины отложения фосфатов кальция в зоне локализации шовного материала. Известно, что при дистрофической кальцификации отложения солей кальция обычно обнаруживаются в тканях с пониженным уровнем жизнедеятельности [3, 10]. С этой точки зрения консервированный сшивающими агентами биоматериал можно рассматривать как девитализированный и, соответственно, подверженный дистрофической кальцификации. Необходимо отметить, что в створках, прошитых шовным материалом, который был удален из биоткани перед имплантацией (IV контроль), признаки кальцификации отсутствовали, как и в контрольных образцах, консервированных ДЭЭ (рис. 4).

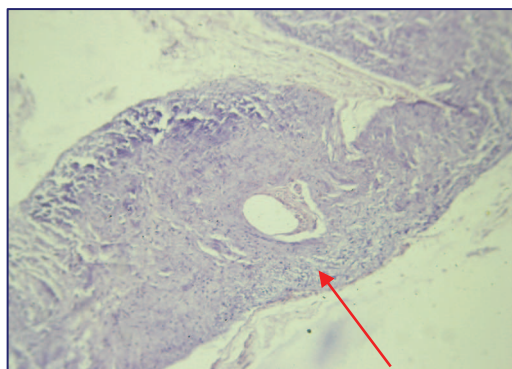


Рис. 4. Структура удаленной ксеностворки, консервированной ДЭЭ. Стрелкой указано место прокола после прошивания шовным материалом. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 200$

Таким образом, повреждение коллагена при прошивании шовным материалом не инициирует процесс минерализации биоткани. В то же время наличие нити в биоматериале на протяжении всего срока имплантации провоцирует его кальцификацию.

Изучение удаленных образцов биоматериала методом атомно-абсорбционной спектроскопии показало, что количество кальция в образцах, прошитых различным шовным материалом, значительно различается (рис. 5). Через два месяца после имплантации количество кальция в биоматериале, содержащем полипропиленовую лигатуру, возросло в 31 раз ($p=0,0009$) по сравнению с контрольными (неимплантированными) образцами. В то же время при использовании TiNi данный показатель увеличился только в 14 раз ($p=0,001$), а нити на основе полидиоксана – в 9 раз ($p=0,0049$).

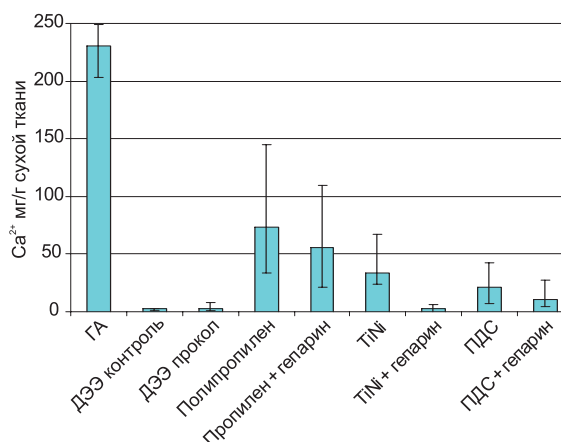


Рис. 5. Количество кальция в ДЭЭ-обработанных образцах, прошитых нитями Prolene, TiNi и PDS (до и после модификации гепарином)

Модификация нефракционированным гепарином образцов, прошитых различными нитями, существенно уменьшила кальцийсвязывающую активность биоматериала. В образцах, содержащих полипропиленовые лигатуры, уровень кальция снизился на 25 % – до 55,42 мг/г ($p=0,825$), полидиоксаноновые – на 50 % – до 10,6 мг/г ($p=0,024$). Наибольший эффект был достигнут в отношении образцов, содержащих нитинол – концентрация кальция в них снизилась в 14,5 раза (до 2,35 мг/г, $p=0,0013$), что сопоставимо с неимплантированными образцами (I контроль). При этом необходимо отметить, что в образцах, предварительно прошитых шовным материалом, удаленным перед имплантацией (IV контроль), количество кальция достоверно не отличалось от такового в группе I контроля ($p=0,455$).

Полученные результаты убедительно доказывают, что шовный материал способен провоцировать минерализацию биоматериала. Можно предполагать, что кальцификация является следствием асептического воспалительного процесса, поддерживаемого инородным телом и приводящего к миграции гладкомышечных клеток в зону шва, формированию рубцовой ткани, гиалиновой дегенерации, а затем – к обызвествлению [6]. Вероятно, этим можно объяснить, что кальцификация биопротезов происходит не в зоне швов, наложенных при производстве биопротеза, а именно по линии его фиксации к тканям пациента.

Полученные результаты свидетельствуют, что интенсивность кальцификации зависит от вида шовного материала – полипропиленовая нить провоцирует образование кальцинатов наиболее интенсивно по сравнению с биорезорбируемой нитью на основе полидиоксана, а также нитинолом. Интенсивную воспалительную реакцию на полипропиленовую нить наблюдали и другие исследователи [2]. Микроскопические исследования процессов трансформации зоны анастомозов, наложенных полипропиленом и ПДС на сонные артерии у собак, показали, что воспалительная реакция и тканевой ответ на инородное тело при использовании полипропиленовой нити сохранялись на протяжении 12 месяцев, хотя и носили вялотекущий характер [2]. Интенсивность тканевого ответа при использовании ПДС снижалась в сроки от 1 до 3 месяцев, полностью исчезая к 4-му месяцу.

В то же время модификация прошитых образцов гепарином позволяет значительно снизить накопление кальция. Предупреждение кальцификации биоматериала путем модификации гепарином было показано и в работах других авторов [1,

11, 13]. Механизм данного эффекта может быть различен. С одной стороны, наряду с антикоагулянтной активностью гепарин обладает также противовоспалительными свойствами, ингибируя медиаторы воспаления [14]. По-видимому, гепарин, ковалентно связанный с биоматериалом, может сохранять эти свойства. Кроме того, гепарин, молекула которого имеет отрицательный заряд высокой плотности, выполняет ионообменную функцию, защищая участки коллагеновой матрицы и препятствуя кальцификации.

Заключение

В ряде случаев кальцификация кардиоваскулярных биопротезов может быть инициирована шовным материалом вследствие воспалительного процесса в перилигатурной зоне. Количество кальция в биоматериале зависит от качества шовного материала. Полипропиленовая нить в наибольшей степени провоцирует кальцификацию эпоксиобработанных ксеностороков в эксперименте. Модификация нефракционированным гепарином биопротезов, содержащих шовный материал, позволяет эффективно ингибировать кальцификацию биоткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барбараш Л. С., Барбараш Н. А., Журавлева И. Ю. Биопротезы клапанов сердца. Проблемы и перспективы. Кемерово, 1995. 400 с.
2. Белоярцев Д. Ф., Тимина И. Е. Ближайшие результаты реконструкций внутренней сонной артерии рассасывающимся шовным материалом // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2003. Т. 9, № 4. С. 79–88.
3. Биосовместимость / под ред. В. И. Севастьянова. М.: Медицина, 1999. 368 с.
4. Бокерия Л. А., Гудкова Р. Г. Сердечно-сосудистая хирургия-2011. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М., 2012. 196 с.
5. 12-летний опыт использования биопротезов для замещения инфраингвинальных артерий / Л. С. Барбараш [и др.] // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2006. № 3. С. 91–97.
6. Клинико-морфологическое изучение сосудистых анастомозов после реконструктивных операций / В. А. Лазаренко [др.] // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2003. № 3 (прил.). С. 185–186.
7. Латыпов А. К. Клинико-функциональная оценка биологических клапаносодержащих кондуитов в послеоперационном периоде у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2005. 23 с.
8. Отдаленные результаты применения эпоксиобработанных ксенопротезов в хирургии атриовентрикулярных пороков у лиц молодого возраста / Л. С. Барбараш [и др.] // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2012. № 2, т. 5. С. 77–81.
9. Покровский А. В., Гонтаренко В. Н. Состояние сосудистой хирургии в России в 2012 г. М., 2013. С. 95.

10. Струков А. И., Серов В. В. Патологическая анатомия: учебник по медицине. Раздел «Нарушения обмена кальция». URL: <http://www.medichelp.ru/posts/view/3057>.

11. Chanda J., Kuribayashi R., Abe T. Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses // *Biomaterials*. 1997. Vol. 18, № 16. P. 1109–1113.

12. Golomb G., Schoen F. J., Smith M. S. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis // *Am. J. Pathol.* 1987. Vol. 127. P. 122–130.

13. Improved calcification resistance and biocompatibility of tissue patch grafted with sulfonated PEO or heparin after glutaraldehyde fixation / W. K. Lee [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. Vol. 58, № 1. P. 27–35.

14. Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes / H. Hochart [et al.] // *Br. J. Haematol.* 2006. Vol. 133, № 1. P. 62–67.

15. Sacks M. S., Schoen F. J. Collagen fiber disruption occurs independent of calcification in clinically explanted bioprosthetic heart valve // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. Vol. 62, № 3. P. 359–371.

16. Schoen F. J., Levy R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention // *Ann. Thorac. Surg.* 2005. Vol. 79, № 3. P. 1072–1080.

Статья поступила 02.08.2013

Ответственный автор за переписку:

Кудрявцева Юлия Александровна –
заведующая лабораторией новых биоматериалов ФГБУ
«НИИ КПССЗ» СО РАМН, доктор биологических наук

Адрес для переписки:

Кудрявцева Ю. А., 650002,
г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6
Тел: 8 (3842) 64-42-38
E-mail: KudrUA@cardio.kem.ru

Corresponding author:

Yulia A. Kudryavtseva –
head of new biomaterials laboratory of FSBI RI for CICVD,
SB RAMS, Dr. Bio. Sci.

Correspondence address:

Yu. A. Kudryavtseva, 6, Sosnoviy blvd.,
Kemerovo, 650002
Tel.: +7 (3842) 64-42-38
E-mail: KudrUA@cardio.kem.ru