

УДК: 616.12-089.819.843
БАК 14.01.26

ПРИМЕНЕНИЕ АМИНОДИФОСФОНАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КАЛЬЦИФИКАЦИИ ЭПОКСИОБРАБОТАННЫХ БИОПРОТЕЗОВ

И.Ю. Журавлева, Т.В. Глушкова, А.В. Веремеев, О.Н. Хрячкова, С.В. Лосева*, Л.С. Барбараш

УРАМН «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН», 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6, bio.tv@gmail.ru
* Научный Центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135

Цель исследования – изучение возможности использования аминодифосфоната для снижения кальций-связывающей активности эпоксиобработанных кардиоваскулярных биологических протезов. В эксперименте использовали перикард крупного рогатого скота (КРС), створки аортального клапана (АК) и стенку аорты свиньи, консервированные глутаровым альдегидом (ГА) и диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ). Модификацию ДЭЭ-обработанного биоматериала осуществляли 3-амино-1-оксипропилиден-дифосфоновой кислотой (АОПДФК). Кальций-связывающую активность биоматериала изучали на модели подкожной имплантации крысам субпопуляции «Vistar». Структуру модифицированного биоматериала исследовали методом световой микроскопии, физико-механические свойства оценивали по прочности, эластичности и модулю Юнга. По результатам исследования в перикарде, створках АК и стенке аорты, консервированных ДЭЭ, уровень кальция к 180 суткам имплантации превысил уровень кальция в неимплантированных образцах в 6, 4 и 200 раз, соответственно ($p < 0,05$). Модификация АОПДФК позволила снизить кальций-связывающую активность ДЭЭ-обработанного перикарда в 3,93 раза, створок АК – в 2,75 раза и сегментов стенки аорты в 1,5 раза ($p < 0,05$). Отека, разрыхления и фрагментации коллагеновых волокон в образцах, обработанных АОПДФК, не выявлено. По показателям прочности, эластичности и модулю Юнга статистически значимых различий между модифицированными и немодифицированными образцами не выявлено ($p > 0,05$). Использование 3-амино-1-оксипропилиден-дифосфоновой кислоты для модификации перикарда КРС и створок АК, консервированных ДЭЭ, способствует статистически значимому снижению кальций-связывающей активности, не оказывая влияния на структуру и физико-механические свойства биоматериала. Эффективность антикальциевой защиты АОПДФК иммобилизованной на стенке аорты со временем снижается и становится не эффективной. Исключение стенки аорты из состава биологического протеза можно рассматривать как способ для предупреждения кальцификации биопротезов клапанов сердца.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца; кальцификация; аминодифосфонаты.

USE OF AMINODIPHOSPHONATES FOR PROPHYLAXIS OF CALCIFICATION OF EPOXY-TREATED BIOPROSTHESES

I.Y. Zhuravleva, T.V. Glushkova, A.V. Veremeev, O.N. Hryachkova, S.V. Loseva*, L.S. Barbarash

RAMS Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases Siberian branch of the Russian Academy of Medical Sciences»,
6, Sosnovy blvd., 650002, Kemerovo, Russia, bio.tv@gmail.ru

* A.N. Bakulev Scientific Center of cardiovascular surgery RAMS, 135, Rublevskoye sh., 121552, Moscow, Russia

Studied were the prospects of aminodiphosphonate (AOPDPA) in reducing calcium-linking activity of epoxy-treated cardiovascular biological prostheses. Bovine pericardium, porcine aortic valve leaflets and walls of aorta preserved with glutaraldehyde (GA) and ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) were used in the experiment. Calcium-linking activity, structure and physical and mechanical properties of the biomaterial were estimated. The use of AOPDPA to modify bovine pericardium and aortic valve leaflets preserved with EGDE results in significant reduction of calcium-linking activity without any effect on the structure and mechanical properties of the biomaterial. The efficacy of anticalcification protection with AOPDPA immobilized on the aortic wall tends to decrease with time and is nullified in the end. Exclusion of the aortic wall from bioprosthetic structure may be considered a way to prevent calcification of heart valve bioprostheses.

Key words: heart valve bioprostheses; calcification; aminodiphosphonates.

Для коррекции врожденных и приобретенных пороков сердца широко применяют биологические протезы, изготовленные из аортального комплекса свиньи и перикарда крупного рогатого скота (КРС). Несмотря на то, что биологические протезы имеют ряд преимуществ перед механическими, биоматериал, из которого они изготовлены, подвергается прогрессивным дегенеративным изменениям, препятствующим их более широкому распространению. Одной из основных причин дегенеративных изменений ткани является кальцификация [7, 12]. Большинство производителей биологических протезов используют для консервации ксеноткани раствор

глутарового альдегида (ГА). Ранее было показано, что свободные альдегидные группы ГА, не вступившие в реакцию поперечной сшивки коллагена, вызывают кальцификацию биоматериала [1, 11]. В связи с этим самые многообещающие профилактические стратегии включали иммобилизацию ингибиторов кальцификации на поверхности ГА-обработанного биоматериала или использование для консервации аналогов ГА [10].

Замена ГА на диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДЭЭ) способствовала значительному снижению риска дисфункций, связанных с кальцификацией биопротезов клапанов сердца у взрослых пациентов (линеаризованный показатель кальцификации со-

ставил лишь 0,81%) [6]. Однако у детей в возрасте от 1,5 месяцев до 12 лет частота развития кальцификации остается высокой даже при использовании эпоксидной консервации – до 20% от общего количества имплантаций [5]. Данный факт делает очевидным необходимость поиска путей снижения кальций-связывающей активности ДЭЭ-обработанного биоматериала.

В мировой практике известен опыт применения соединений из класса дифосфонатов для антикальциевой обработки биоматериала, консервированного ГА. Доказано, что в иммобилизованном состоянии дифосфонаты в значительной степени препятствуют кальцификации ГА-обработанного биоматериала [1, 9, 13–15].

Цель исследования – изучение возможности использования аминодифосфоната для снижения кальций-связывающей активности эпоксиобработанных кардиоваскулярных биологических протезов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании использовали перикард крупного рогатого скота (КРС), створки аортального клапана (АК) и стенку аорты свиньи. Биоматериал консервировали глутаровым альдегидом (ГА) и диглицидиловым эфиром этиленгликоля (ДЭЭ) [2]. Для антикальциевой обработки ДЭЭ-обработанного биоматериала использовали препарат из группы дифосфонатов, имеющий в составе аминогруппу – 3-амино-1-оксипропилиден-дифосфоновую кислоту (АОПДФК). Образцы модифицировали 0,15% раствором АОПДФК по оригинальной методике [4]. Исследование кальций-связывающей активности проводили на стандартной модели ускоренной кальцификации путем подкожной имплантации исследуемого материала крысам-самцам субпопуляции «Vistar» с массой тела 60–70 г. Имплантированный материал удаляли через 60, 120 и 180 суток. Количество кальция в образцах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Perkin Elmer–5100» (USA) и рассчитывали на 1 г сухой ткани. Полученные результаты сравнивали с уровнем кальция в неимплантированном биоматериале.

Влияние антикальциевой обработки на структуру биоматериала изучали методом световой микроскопии с окраской препаратов гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. Влияние АОПДФК на физико-механические свойства биоматериала оценивали по прочности, эластичности и модулю Юнга ($E_{\text{мод}}$). Испытания физико-механических свойств выполняли на разрывной машине «Zwick/roell-2.5H» (Германия) в условиях продольного растяжения образцов, однотипно приготовленных при помощи вырубной матрицы специальной формы в соответствии с ГОСТ: 11262-80. Прочность оценивали по максимальному напряжению при растяжении (МПа), расчет производили по формуле $\sigma = F_{\text{max}}/S$, где σ – разрушающее

напряжение при растяжении, F_{max} – разрушающая нагрузка (Н), S – площадь поперечного сечения образца (см^2). Эластичность оценивали по максимальному удлинению при разрыве (%), скорректированному с учетом степени разрушения образца: $\varepsilon = ((L_{\text{max}} - L_0)/L_0) * 100\%$, где ε – относительное удлинение (%); L_0 – исходная длина образца (мм); L_{max} – максимальное удлинение образца до разрушения (мм). Испытания проводили со скоростью 10 мм/мин, предельные значения нагрузок подобраны экспериментально. $E_{\text{мод}}$ определяли при напряжении 0,1–0,2 МПа и скорости нагрузки 5 мм/мин.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «Statistica 6.0». Все данные представлены как средние значения (М) и стандартная ошибка среднего ($\pm m$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

К 180 суткам имплантации уровень кальция в перикарде, створках АК и стенке аорты, консервированных ГА, увеличился в сотни раз по сравнению с неимплантированными образцами данных биоматериалов ($p < 0,01$) (табл.). Полученные результаты свидетельствуют об интенсивном процессе накопления кальция в биоматериале, консервированном ГА.

Уровень кальция в перикарде КРС и створках АК, консервированных ДЭЭ, к 180 суткам имплантации составил $4,92 \pm 1,5$ и $2,89 \pm 1,03$ мг/г сухой ткани, что превышает уровень кальция в неимплантированных образцах в 6 и 4 раза, соответственно ($p < 0,05$). В то же время в стенке аорты, консервированной ДЭЭ, уровень кальция к 180 суткам имплантации достигал $157,94 \pm 5,04$ мг/г сухой ткани, что превышает уровень кальция в неимплантированных образцах более, чем в 400 раз ($p < 0,01$) (табл.). Эти результаты согласуются с данными других авторов, доказавших как в эксперименте [14], так и в клинических условиях [5], что стенка аорты является частью биопротеза, наиболее подверженной кальцификации. При этом данное положение справедливо как для ГА-консервированных [14], так и для эпоксиобработанных [5] биологических клапанных заменителей. Таким образом, исключение аортальной стенки из конструкции биопротеза уже само по себе может явиться фактором, способствующим снижению риска кальциевой дегградации биопротезов.

Обработка ДЭЭ-консервированного биоматериала раствором АОПДФК по оригинальной методике позволила дополнительно снизить его кальций-связывающую активность. АОПДФК – дифосфонат второго поколения; является аналогом пирофосфата – природного ингибитора кальция, подавляет преципитацию фосфата кальция из раствора, блокирует его трансформацию в гидроксипатит, тем

Количество кальция (мг/г сухой ткани) в биологическом материале после подкожной имплантации крысам

Обработка биоматериала	Срок имплантации, сутки						
	Контроль*		60		120		180
		р		р		р	
Перикард							
ГА	0,64±0,18	0,001	71,9±15,8	0,047	130,26±5,46	0,001	172,51±9,37
ДЭЭ	0,68±0,18	0,087	3,28±1,67	0,11	2,03±0,1	0,014	4,92±1,51
ДЭЭ+АОПДФК	0,68±0,18	0,27	0,81±0,08	0,38	0,85±0,1	0,06	1,25±0,22
Створки аортального клапана							
ГА	0,37±0,06	0,0001	73,35±12,94	0,001	158,26±11,12	0,2	171,76±11,22
ДЭЭ	0,76±0,13	0,03	1,62±0,48	0,21	2,79±1,31	0,48	2,89±1,03
ДЭЭ+АОПДФК	0,76±0,13	0,06	1,14±0,13	0,48	1,15±0,12	0,3	1,05±0,16
Стенка аорты							
ГА	0,25±0,03	0,0004	70,27±2,14	0,0002	97,73±3,66	0,0005	100,37±6,03
ДЭЭ	0,32±0,01	0,0002	81,62±2,77	0,0001	150,69±3,78	0,46	157,94±5,04
ДЭЭ+АОПДФК	0,32±0,01	0,004	28,81±9,47	0,003	67,44±4,52	0,2	98,71±11,61

* неимплантированный биоматериал; р – достоверность отличий между соседними точками

самым предотвращая кристаллизацию [10]. Данное соединение представлено на российском фармацевтическом рынке препаратом Аредиа и может быть использовано для антикальциевой обработки кардиоваскулярных биопротезов.

В перикарде КРС на протяжении всего периода наблюдения уровень кальция в модифицированных образцах был в 3,93 раза ниже, чем в немодифицированных ($p=0,018$). К 180 суткам уровень кальция составил $1,25\pm0,22$ мг/г сухой ткани. В створках АК, модифицированных АОПДФК, к 180 суткам имплантации было обнаружено $1,05\pm0,16$ мг/г сухой ткани, что в 2,75 раза ниже уровня кальция в немодифицированных створках ($p=0,049$) (табл.). Следует отметить, что ни один из исследуемых образцов перикарда и створок АК, модифицированных АОПДФК, не имел кальциевых отложений, которые можно было бы определить визуально.

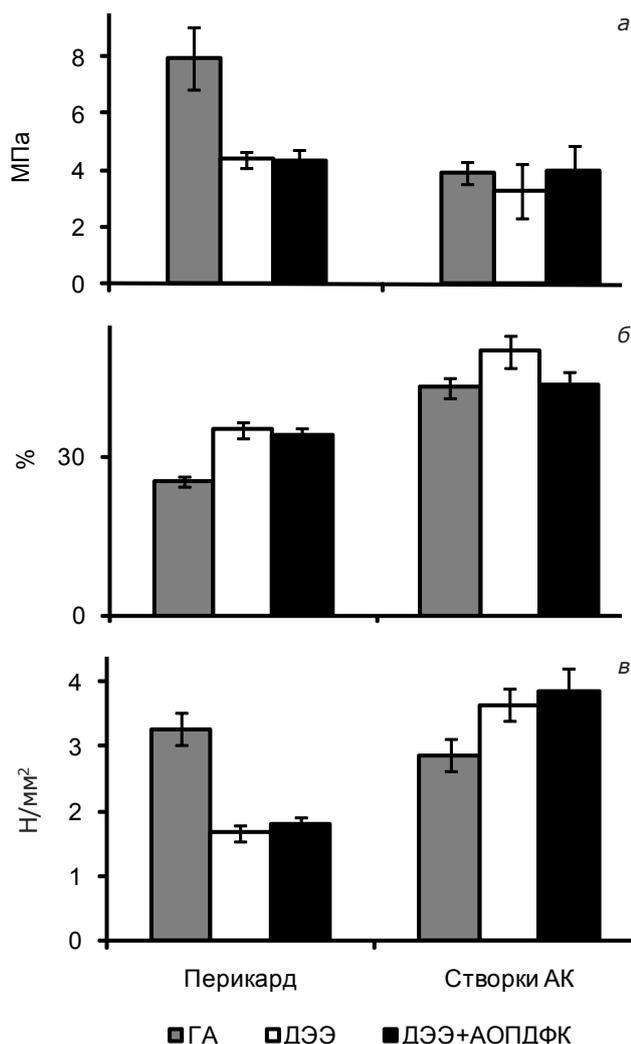
Однако стенка аорты, модифицированная АОПДФК, на протяжении всего исследования демонстрировала высокую кальций-связывающую активность. К 180 суткам имплантации уровень накопленного кальция достигал $91,28\pm13,01$ мг/г сухой ткани, что в 285 раз превысило уровень кальция в неимплантированных образцах ($p<0,01$). Кроме того, основываясь на характере кривой накопления кальция, можно предполагать временные ограничения антикальциевого эффекта дифосфоната для данного вида биоматериала. Так, на 60 сутки уровень кальция в стенке аорты, обработанной АОПДФК, был в 5 раз ниже по сравнению с необработанными образцами, тогда как к 180 суткам – лишь в 1,5 раза ($p<0,001$) (табл.). Данное наблюдение еще раз доказывает, что в случаях высокого риска кальцификации биопротеза следует отдавать предпочтение конструкциям, не содержащим в составе аортальной стенки.

При разработке новой технологии обработки биологического материала следует учитывать, что лю-

бое химическое воздействие на биологическую ткань может привести к деструктивным изменениям отдельных элементов. Результаты настоящего исследования, полученные методом световой микроскопии, продемонстрировали, что модификация АОПДФК не оказывает отрицательного влияния на структуру эпоксиобработанного биоматериала. Как в немодифицированном, так и в модифицированном биоматериале деление на слои и извитость коллагеновых волокон сохраняется. Деструктивных изменений в виде отека, разрыхления и фрагментации коллагеновых волокон не выявлено.

Помимо сохранения структуры ткани, одним из основных требований к предимплантационной химической обработке биоматериала является сохранение или улучшение его физико-механических свойств. Согласно результатам настоящего исследования, прочность эпоксиобработанного перикарда уступает прочности ГА-обработанного в 1,8 раза ($p=0,01$), тогда как между показателями прочности ДЭЭ и ГА-обработанных створок статистически значимых различий не было ($p=0,27$) (рисунок). Между модифицированными и немодифицированными образцами статистически значимых отличий не было ($p>0,05$): прочность перикарда КРС и створок АК, модифицированных АОПДФК, составила $4,38\pm0,4$ МПа и $3,98\pm0,88$ МПа, соответственно.

При меньшей прочности, ДЭЭ-обработанный перикард в 1,4 раза эластичнее ГА-обработанного показатель относительного удлинения которого составляет $25,4\pm0,86\%$ ($p<0,001$). Эластичность створок АК, обработанных ДЭЭ, в 1,2 раза выше эластичности ГА-обработанных ($p=0,04$). Большая эластичность способствует рассеиванию ударных нагрузок, что, в свою очередь, увеличивает долговечность биологического материала. К тому же механические свойства протезов со временем меняются в сторону повы-



Физико-механические свойства биологического материала: а – прочность; б – эластичность; в – Емод.

шения их жесткости, и через 5 лет после операции деформационная способность створок биопротеза составляет 52% от исходных значений [3]. Антикальциевая модификация не изменяет эластичности перикарда КРС и створок АК, консервированных ДЭЭ ($p < 0,05$). Эластичность модифицированного перикарда КРС и створок АК составила $34,27 \pm 1,22$ и $43,7 \pm 2,43\%$, соответственно (рисунок).

Модуль Юнга, характеризующий жесткость материала, находится в диапазоне от 1 до 5 Н/мм², что указывает на способность биоматериалов к большим обратимым деформациям [8]. Значение модуля Юнга для модифицированного и немодифицированного биоматериала не имеет статистических значимых отличий ($p > 0,05$) (рисунок).

ВЫВОДЫ

1. Использование 3-амино-1-оксипропилиден-дифосфоновой кислоты для модификации перикарда КРС и створок АК, консервированных ДЭЭ, способствует статистически значимому снижению кальций-

связывающей активности, не оказывая отрицательного влияния на структуру и физико-механические свойства биоматериала. Полученные результаты являются основанием для внедрения данной технологии в практику производства кардиоваскулярных биопротезов.

2. Имобилизация АОПДФК на стенку аорты обеспечивает незначительный, ограниченный во времени антикальциевый эффект. Исключение стенки аорты из состава биологического протеза можно рассматривать как один из вариантов профилактики кальцификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барбараш Л.С., Барбараш Н.А., Журавлева И.Ю. Биопротезы клапанов сердца, проблемы и перспективы // Кемерово, 1995. 399 с.
2. Барбараш Л.С., Новикова С.П., Журавлева И.Ю. и др. Способ консервации биоткани для протезирования клапанов сердца и сосудов // Пат. 2008767 РФ опубл. Б.И. № 5. 1994.
3. Бокерия Л.А., Каграманов И.И., Кокшкнев И.В., Бритиков Д.В. Биоматериалы в сердечно-сосудистой хирургии. М., 2009. 325 с.
4. Журавлева И.Ю., Барбараш Л.С., Глушкова Т.В. Способ антикальциевой обработки биологических протезов клапанов сердца // Пат. 2374843 РФ опубл. 10.12.2009 Бюл. № 34.
5. Латыпов А.К. Клинико-функциональная оценка биологических клапаносодержащих кондуитов в послеоперационном периоде у детей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2005. 23 с.
6. Нохрин А.В., Одаренко Ю.Н., Кокорин С.Г. и др. Тезисы докладов и сообщений Пятнадцатого Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов. Москва 2009. С. 27
7. Рындина Н.И. Исследование механизма инициации кальциноза трансплантатов клапанов сердца и разработка способов его предотвращения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 2006. 22 с.
8. Федорова В.Н., Степанова Л.А. Краткий курс медицинской и биологической физики с элементами реабилитологии. М., 2008. 622 с.
9. Dewanjee M.K., Solis E., Lanker J. et al. // ASAIO Trans. 1986. V. 32, № 1. P. 24–29.
10. Gasser A.B., Morgan D.B., Fleisch H.A. et al. // Clin. Sci. 1972. V. 43, № 1. P. 31–45.
11. Grabenwoger M., Sider J., Fitzal F. et al. // Ann. Thorac. Surg. 1996 V. 62, № 3. P. 772–777.
12. Schoen F.J., Levy R.J. // Ann. Thorac. Surg. 2005. V. 79, № 3. P. 1072–1080.
13. Webb C.L., Nquyen N.M., Schoen F.J. et al. // Am. J. Pathol. 1992 V. 141, № 2. P. 487–496.
14. Webb C.L., Phelps L.L., Schoen F.J. et al. // ASAIO Trans. 1988. V. 34, № 3. P. 851–854.
15. Webb C.L., Benedict J.J., Schoen F.J. et al. // Ann. Thorac. Surg. 1988. V. 46, № 3. P. 309–316.

Поступила в редакцию 4 марта 2010 г.